

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR Samuel Hilsdorf
Barbanti..... E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 15.07.20

Cecília Ab. Zavaglia
ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Polímeros Bioreabsorvíveis como Suportes na Engenharia de Tecidos

Autor: **Samuel Hilsdorf Barbanti**

Orientadora: **Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duck**

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Polímeros Bioreabsorvíveis como Suportes na Engenharia de Tecidos

Autor: Samuel Hilsdorf Barbanti

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek

Curso: Engenharia Mecânica

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Tese de Doutorado apresentada à comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

**Campinas, 2005
S.P. – Brasil**

UNIDADE	BC
CHAMADA	UNICAMP
B 232p	
EX	
OMBO BC	66215
ROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	10/22/05
CPD	

lib ID. 373528

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

Barbanti, Samuel Hilsdorf
B232p Polímeros bioreabsorvíveis como suportes na
engenharia de tecidos / Samuel Hilsdorf Barbanti.--
Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadores: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia,
Eliana Aparecida de Rezende Duek.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

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

Titulo em Inglês: Bioresorbable polymers as scaffolds in tissue engineering

Palavras-chave em Inglês: Biomedic materials, polymers, Biodegradation, Cell-culture
medium

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Doutor em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Célia Marina de Alvarenga Freire, Necésio
Gomes Costa, Paulo Roberto Mei e Selma Candelária Genari

Data da defesa: 15/07/2005

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Tese de Doutorado

**Polímeros Bioreabsorvíveis como Suportes na
Engenharia de Tecidos**

Autor: Samuel Hilsdorf Barbanti

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek



**Prof. Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, Presidente
FEM - UNICAMP**



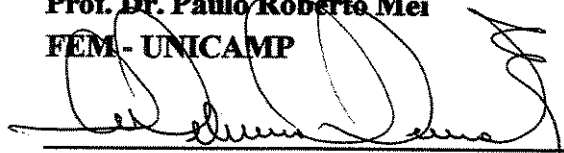
**Prof. Dra. Célia Marina de Alvarenga Freire
FEM - UNICAMP**



**Prof. Dr. Necésio Gomes Costa
UNIFEI**



**Prof. Dr. Paulo Roberto Mei
FEM - UNICAMP**



**Prof. Dra. Selma Candelária Genari
IB - UNICAMP**

Campinas, 15 de julho de 2005.

200524915

Agradecimentos

Durante os anos de graduação na UNICAMP lembro de percorrer as boas e numerosas bibliotecas da universidade em busca de uma temperatura ambiente um pouco mais amena. Ao longo dos anos me deparei com uma característica pessoal muito peculiar: ler a seção de agradecimentos e dedicatórias das teses e dissertações. Elas carregam consigo um valor emocional muito grande, e representavam uma leitura um pouco mais humana dentro da lógica da engenharia. Lia com muito prazer, e nos meus momentos de pura fantasia até ousava classificar o autor pela honestidade e intensidade deles. Especialmente me emocionavam aqueles que eram acompanhados do *in memorian*, pois mostravam que o tempo de desenvolvimento das teses é suficiente para mudar as pessoas.

Não sei como fazê-lo com a Profa. Eliana Duek. Enquanto escrevia o texto desta tese, algumas frases, ditas há alguns anos (e repetidas quando necessário) fizeram e farão sentido sempre: “discuta os dados com base nos artigos”, “releia os artigos buscando outras informações”, “escreva o texto relacionando os parágrafos”, etc. Esse trabalho é produto do seu exemplo e do meu aprendizado diário com as suas atividades. Talvez, a melhor forma será reproduzindo tudo aquilo que me foi ensinado.

Sou extremamente grato à Profa Cecília Zavaglia. O desenvolvimento dessa tese não poderia ter acontecido sem o seu auxílio e sua confiança. Sua presença e disponibilidade sempre serviram como um estímulo pessoal.

Jamais poderei esquecer a presença de Gisele van Amson. Seu companheirismo amoroso durante todos esses anos sempre foi inestimável.

Enfim, agradeço às pessoas e instituições que contribuíram de maneira decisiva:

à minha mãe, Maria Lúcia,

à minhas irmãs Cristina e Gabriela, meu pai, Luciano,

minhas tias e tios, Ana, Paula, Pilli, Aruy,

aos amigos do *Labiomec*, Alberto, Viviane, Emília e Claudenete,

ao André e Mariana,

à Michelle, Arnaldo e Débora,

à Sônia, Ana Paula e Érica da CPG,

à Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP, e finalmente,

ao CNPq, que através de dinheiro público, possibilitou que esse trabalho pudesse ser realizado.

Resumo

BARBANTI, Samuel Hilsdorf, *Polímeros Bioreabsorvíveis como Suportes na Engenharia de Tecidos*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2005. 138 p. Tese de Doutorado.

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 e caracterizar suportes densos e porosos de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (50/50) (PLGA50), preparados pelo método de fusão com adição e lixiviação de citrato de sódio. As amostras foram avaliadas em estudos de degradação *in vitro* para o estudo do efeito da retirada do sal, e em meio tampão fosfato (pH 7,4) e alcalino com NaOH (pH 12, 13 e 13,7). Os materiais foram utilizados como suporte para cultura de osteoblastos e o estudo *in vivo* foi realizado pelo implante em tibia de ratos. Os resultados obtidos através de análises morfológicas, térmicas e de propriedades mecânicas, mostram que amostras de PCL são mais estáveis quando comparadas às suas análogas de PLGA50. A cultura de células mostrou um padrão de adesão e proliferação satisfatório, com intensa atividade celular. No estudo *in vivo* as amostras de PCL mostram uma degradação mais acentuada quando comparada com os resultados obtidos no estudo *in vitro*. Os resultados mostraram que a técnica utilizada no preparo das amostras é útil na confecção de suportes altamente porosos. Em função do tempo de degradação e das propriedades mecânicas, as amostras de PLGA50 foram os suportes mais indicados para aplicações na engenharia de tecidos ósseos.

Palavras-chave

Materiais biomédicos, polímeros, biodegradação, cultura de células e meios de cultura, poli(ϵ -caprolactona), poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico).

Abstract

BARBANTI, Samuel Hilsdorf, *Bioresorbable Polymers as Scaffolds in Tissue Engineering*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2005. 138 p. Doctoral Thesis.

The use of bioresorbable polymers as scaffolds for the cells culture 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 and to characterize dense and porous scaffolds of poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) (50/50) (PLGA50), prepared by melting method with addition and leaching of sodium citrate. The samples were evaluated in studies of *in vitro* degradation, in phosphate buffer solution (pH 7.4) and alkaline medium of NaOH (pH 12, 13 and 13.7). Scaffolds samples were used in osteoblast culture and the *in vivo* study was evaluated by implant in mouse tibia. The results of morphologic, thermal and of mechanical analyses, showed that the PCL samples are stable compared to their similar of PLGA50. The culture of cells showed a satisfactory adhesion and proliferation, with intense cellular activity. In the *in vivo* study, the samples of PCL showed a higher degradation when it is compared to the results obtained *in vitro* study. The results showed that the proposed technique allowed the preparation of highly porous scaffolds and in function of time degradation and mechanics properties, the samples of PLGA50 were the most suitable scaffolds for applications in the bone tissue engineering.

Keywords

Biomedic materials, polymers, biodegradation, cell-culture medium, poly(ϵ -caprolactone), poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid).

Sumário

Lista de Figuras	ii
Lista de Tabelas	vii
Nomenclatura	x
1 Introdução	01
2 Revisão da literatura	04
3 Materiais e métodos	22
4 Estudo do efeito da lixiviação do sal	34
5 Degradação <i>in vitro</i> em tampão fosfato	50
6 Degradação <i>in vitro</i> em soluções de NaOH	81
7 Cultura de células	100
8 Estudo <i>in vivo</i>	108
9 Conclusões e sugestões para próximos trabalhos	117
Referências bibliográficas	119

Lista de Figuras

Figura 1 – Técnica da engenharia de tecido (Freed *et al.*, 1993).

Figura 2 – Estratégia I e II de seleção de polímeros bioreabsorvíveis aplicados à engenharia de tecidos (a linha vertical indica o momento de implante *in vivo*).

Figura 3 – Curvas genéricas mostrando a seqüência da diminuição das propriedades: massa molecular, tensão e massa durante a degradação de polímeros bioreabsorvíveis (Pietrzak *et al.*, 1997).

Figura 4 – Degradação/erosão de polímeros bioreabsorvíveis (Burkersroda *et al.*, 2002).

Figura 5 – Rota metabólica de bioreabsorção de polímeros bioreabsorvíveis.

Figura 6 – Perda de massa (em meses) de polímeros bioreabsorvíveis em função da composição química (adaptado de Miller *et al.*, 1977).

Figura 7 – Preparo de suporte de polímeros bioreabsorvíveis pela técnica da evaporação de solvente (*casting*).

Figura 8 – Preparo de suporte de polímeros bioreabsorvíveis pela técnica da fusão.

Figura 9 – Lixiviação do sal em amostras de polímeros bioreabsorvíveis.

Figura 10 – Fluxograma experimental.

Figura 11 – Variação de pH de amostras de PCL e PLGA50 em função do tempo de imersão em água destilada.

Figura 12 – Variação da massa normalizada de amostras de PCL e PLGA50 em função do tempo de imersão em água destilada.

Figura 13 – Micrografias eletrônicas de varredura de PCL e PLGA50 preparadas pelo processo de evaporação do solvente. (A) e (B) membrana densa PCL (C) membrana densa PLGA50 (D) membrana porosa PCL (E) membrana porosa PLGA50.

Figura 14 – Micrografias óticas com luz polarizada de amostras de PCL. (A) x 50 (B) x 100.

Figura 15 – Micrografias eletrônicas de varredura de PCL e PLGA50 preparadas pelo processo de fusão. (A) suporte denso e poroso de PCL (B) suporte denso de PLGA50 (C) e (D) suporte poroso de PCL (E) suporte poroso de PLGA50.

Figura 16 – Média do tamanho de poros para amostras de PCL e PLGA50 preparadas pelo processo de evaporação do solvente (*casting*) e fusão.

Figura 17 – Termogramas de DSC no estudo da lixiviação do sal em amostras de PCL (primeiro aquecimento) e PLGA50 (segundo aquecimento).

Figura 18 – Análises termogravimétricas de amostras de PCL e PLGA50 no estudo da lixiviação do sal.

Figura 19 – Microscopia eletrônica de varredura de suportes tubulares de PCL preparados pela técnica de fusão. (A) a (D) denso; (E) a (H) poroso. Os números indicam o tempo em semanas.

Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura de suportes tubulares de PLGA50 preparados pela técnica de fusão. (A) a (D) denso; (E) a (H) poroso. Números indicam o tempo em semanas.

Figura 21 – Tamanho de poros (μm) das amostras de PCL e PLGA50 durante a degradação *in vitro* em tampão fosfato.

Figura 22 – Termogramas de DSC de amostras tubulares de PCL na degradação *in vitro* em tampão fosfato. (T_g) obtidas no segundo aquecimento e, (T_m) obtidas no primeiro aquecimento. (%) indica o grau de cristalinidade.

Figura 23 – Termogramas de DSC de amostras tubulares de PLGA50 na degradação *in vitro* em tampão fosfato. (T_g) obtidas no segundo aquecimento.

Figura 24 – Temperatura de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m) obtidos por DSC de amostras de PCL e PLGA50 na degradação *in vitro* em tampão fosfato.

Figura 25 – Termogramas de TGA para amostras de PCL e PLGA50 durante degradação *in vitro* em tampão fosfato.

Figura 26 – Variação da temperatura de início de degradação térmica (*Tonset*) para amostras de PCL e PLGA50 durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

Figura 27 – Curvas de tensão x deformação no ensaio mecânico de flexão de suportes densos e porosos de PCL e PLGA50 sem degradação.

Figura 28 – Módulo de Young no ensaio mecânico de flexão de amostras densas e porosas de PCL e PLGA50 durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

Figura 29 – Massa molecular ponderal média (M_w), numérica média (M_n) e índice de polidispersão em amostras de PCL e PLGA50 durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

Figura 30 – Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de início de degradação térmica (*Tonset*) e módulo de flexão de amostras densas e porosas de PLGA50 em função da massa molecular ponderal média (M_w).

Figura 31 – Substituição nucleófila, reação de hidrólise ácida e alcalina dos ésteres.

Figura 32 – Variação da massa normalizada na degradação *in vitro* em NaOH (pH 7, 12, 13 e 13,7) de amostras densas de PCL e PLGA50.

Figura 33 – Taxa de decaimento da massa normalizada durante a degradação *in vitro* em solução alcalina de NaOH em função do pH.

Figura 34 – Taxa de decaimento calculada da massa normalizada em pH 7,4 comparada aos dados da literatura.

Figura 35 – Termogramas de DSC de amostras de PCL na degradação *in vitro* em NaOH. A coluna da esquerda mostra Tg no segundo aquecimento e a coluna da direita mostra Tm no primeiro aquecimento.

Figura 36 – (a) Variação de Tg , (b) taxa de decaimento em função do pH e (c) comparação da degradação *in vitro* de amostras de PCL em NaOH.

Figura 37 – (a) Variação de Tm , (b) taxa de decaimento em função do pH e (c) comparação da degradação *in vitro* de amostras de PCL em NaOH.

Figura 38 – (a) Variação do grau de cristalinidade no primeiro aquecimento, (b) taxa de aumento em função do pH e (c) comparação da degradação *in vitro* de amostras de PCL em NaOH.

Figura 39 – Termogramas de DSC de amostras de PLGA50 na degradação *in vitro* em NaOH (pH 7, 12, 13 e 13,7). A coluna da esquerda mostra Tg no primeiro e a da direita no segundo aquecimento.

Figura 40 – (a) Variação de Tg , (b) taxa de decaimento e (c) comparação de modelo com valores em tampão fosfato em amostras de PLGA50 na degradação *in vitro* em NaOH.

Figura 41 – Micrografias eletrônica de varredura de amostras densas de PLGA50 (A a H) e PCL (I a L) preparadas pela técnica de fusão e degradadas em meio NaOH. Barra de escala em (A) é igual as das figuras (B, C, D, I, J) e em (E) igual a (F, G, H, K, L).

Figura 42 – Teste de adesão celular das amostras de PCL e PLGA50 preparadas pelo método de fusão. (Controle negativo) membranas de Teflon®, (Controle positivo) placa de polipropileno.

Figura 43 – Micrografias eletrônica de varredura dos osteoblastos hFOB 1.19 cultivados sobre os diferentes suportes. Em (A) e (B) células sobre lamínulas de vidro; (C) e (D) PCL não processado; (E) e (F) PCL poroso; (G) e (H) PLGA50 poroso.

Figura 44 – Análise por espectrometria de energia dispersiva de raios-x (EDS).

Figura 45 - Corte longitudinal do implante de suportes PLGA50 em tíbia de ratos Wistar. (A, C, E, G) denso. (B, D, F, H) poroso. Aumento (A, F) 200x; (B, E, G, H) 100x; (C, D) 400x. Observa-se: (*) a falha para implante; (setas) células fusiformes provenientes do endósteo e linha cimentante; (C) capilares sanguíneos; (I) invasão celular; (a) elementos de medula óssea; (b) depósito de fibrina. HE.

Figura 46 - Corte transversal do implante de suportes de PCL em tíbia de ratos Wistar com 2 dias pós-operatórios. (A) denso, aumento 200x, (B) poroso, aumento 400x. Observa-se: (P) a presença do suporte polimérico; (setas) limite da falha para o implante; (F) malha de fibrina causada pela coagulação. Azul de toluidina.

Figura 47 - Corte longitudinal do implante de suportes PCL em tíbia de ratos Wistar. (A, C, E, G) denso. (B, D, F, H) poroso. Aumento (C, E, G) 100x; (A, B, D, H) 200x; (F); 400x. Observa-se: (*) vasos sanguíneos; (setas) células fusiformes provenientes do endósteo; (P) suporte polimérico. Azul de toluidina.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Polímeros sintéticos bioreabsorvíveis (Chu, 1999 e Middleton *et al.*, 2000).

Tabela 2 – Produtos preparados pela engenharia de tecidos e aprovados pelo FDA (dez/2002).

Tabela 3 – Tamanho de poros e regularidade dimensionais de amostras de PCL preparadas por evaporação do solvente e fusão.

Tabela 4 – Dados de DSC para amostras de PCL e PLGA50 em função do tempo de imersão em água destilada. (Tg) temperatura de transição vítrea, (Tm) temperatura de fusão, (ΔH_m) variação da entalpia de fusão.

Tabela 5 – Propriedades morfológicas de suportes tubulares densos e porosos de PCL preparados pela técnica de fusão durante a degradação em tampão fosfato.

Tabela 6 – Propriedades morfológicas de suportes tubulares densos e porosos de PLGA50 preparados pela técnica de fusão durante a degradação em tampão fosfato.

Tabela 7 – Dados de DSC de amostras tubulares densas e porosas de PCL na degradação *in vitro* em tampão fosfato. (Tg) temperatura de transição vítrea; (Tm) temperatura de fusão; (ΔH_m) variação de entalpia de fusão.

Tabela 8 – Dados de DSC de amostras tubulares densas e porosas de PLGA50 na degradação *in vitro* em tampão fosfato. (Tg) temperatura de transição vítrea; (Tm) temperatura de fusão.

Tabela 9 – Dados de TGA de amostras tubulares densas e porosas de PCL em função do tempo de degradação em tampão fosfato. (*Tonset*) temperatura de início de degradação térmica.

Tabela 10 – Dados de TGA de amostras tubulares densas e porosas de PLGA50 em função do tempo de degradação em tampão fosfato. (*Tonset*) temperatura de início de degradação térmica.

Tabela 11 – Módulo de Young (E) e tensão máxima de escoamento ($\sigma_{\text{máx}}$) no ensaio mecânico de flexão de amostras densas e porosas de PCL e PLGA50 em função do tempo de degradação em tampão fosfato.

Tabela 12 – Cromatografia de permeação em gel (GPC) de amostras densas e porosas de PCL na degradação em tampão fosfato. (Mw) massa molecular ponderal média; (Mn) massa molecular numérica média; (IP) índice de polidispersão.

Tabela 13 – Cromatografia de permeação em gel (GPC) de amostras densas e porosas de PLGA50 na degradação em tampão fosfato. (Mw) massa molecular ponderal média; (Mn) massa molecular numérica média; (IP) índice de polidispersão.

Tabela 14 – Massa normalizada (m) de amostras de PCL na degradação *in vitro* em NaOH.

Tabela 15 – Massa normalizada (m) de amostras de PLGA50 na degradação *in vitro* em NaOH.

Tabela 16 – Taxa de decaimento da massa normalizada em amostras de PCL e PLGA50 na degradação *in vitro* em meio alcalino NaOH.

Tabela 17 – Dados de DSC no primeiro aquecimento de amostras PCL na degradação *in vitro* em meio alcalino NaOH. (Tg) temperatura de transição vítrea; (Tm) temperatura de fusão; (ΔH_m) variação da entalpia de fusão.

Tabela 18 – Dados de DSC no segundo aquecimento de amostras PCL na degradação *in vitro* em meio alcalino NaOH. (T_c) temperatura de cristalização; (T_m) temperatura de fusão; (ΔH_m) variação da entalpia de fusão.

Tabela 19 – Dados de DSC de amostras PLGA50 na degradação *in vitro* em meio alcalino NaOH. (T_g) temperatura de transição vítrea; (T_m) temperatura de fusão.

Nomenclatura

Letras Latinas

E – Módulo de Young	[MPa]
T _c – Temperatura de cristalização	[°C]
T _g – Temperatura de transição vítrea	[°C]
T _m – Temperatura de fusão	[°C]
t – Tempo de degradação	[h] ou [semanas]
m/v – Relação massa/volume	[g/mL]
X _c – Grau de cristalinidade	[%]

Letras Gregas

$\sigma_{\text{máx}}$ – Tensão máxima de escoamento	[MPa]
ΔH_m – Variação da entalpia de fusão	[J/g]
ΔH_c – Variação da entalpia de cristalização	[J/g]

Abreviações

Eq. – Equação
Fig. – Figura(s)
Tab. – Tabela(s)

Siglas

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DEMA – Departamento de Engenharia de Materiais

DSC – Calorimetria Diferencial de Varredura

EDS – Espectrometria de energia dispersiva de raios-x

FDA – *Food and Drug Administration*

FDM – *Fused Deposition Modeling*

FEM – Faculdade de Engenharia Mecânica

GPC – Cromatografia de Permeação em Gel

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

IP – Índice de polidispersão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MIT – *Massachusetts Institute of Technology*

Mn – Massa molecular numérica média

MO – Microscopia Ótica

Mw – Massa molecular ponderal média

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

PCL – Poli(ϵ -caprolactona)

PDLLA – Poli(D,L-ácido láctico)

PGA – Poli(ácido glicólico)

PLA – Poli(ácido láctico)

PLGA – Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLLA – Poli(L-ácido láctico)

SFB – Soro Fetal Bovino

TEPs – *Tissue-Engineered Products*

TGA – Análise Termogravimétrica

Tonset – Temperatura de início da degradação térmica

Capítulo 1

Introdução

A perda de tecidos e órgãos por traumas ou doenças acomete 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.

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 à utilização de drogas imunossupressoras, para evitar a rejeição dos órgãos, e de outros medicamentos que neutralizem a possível contaminação microbiológica e viral. A segunda alternativa é a utilização de um implante, dispositivo médico feito de um biomaterial que é intencionalmente inserido dentro do corpo. Nestes casos, o biomaterial pode ter origem distinta: biológica ou sintética.

Para que um biomaterial possa ser utilizado como implante no corpo humano deve satisfazer uma série de exigências inerentes a ele: além de biocompatível (ter a capacidade e funcionar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica), deve ser atóxico, fácil de esterilizar e apresentar propriedades mecânicas adequadas, convenientes com o

propósito da aplicação. Em função do tempo de permanência no corpo humano, os implantes podem ser classificados em dois grandes grupos, *permanentes* ou *temporários*.

Implantes permanentes quase sempre geram fenômenos crônicos de inflamação. Essa resposta a um corpo estranho é tipicamente benigna, mas pode conduzir a complicações clínicas mais severas, como infecção ou contração dos tecidos. Dessa forma, estes são riscos a serem considerados e evitados em muitas aplicações.

Ao contrário dos permanentes, os implantes temporários são utilizados até que a recuperação tenha sido completada ou iniciada. 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 necessária uma segunda cirurgia para retirada do implante.

Dentre os materiais utilizados como implantes temporários, os polímeros bioreabsorvíveis apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de processar e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos. As indicações de uso dos polímeros bioreabsorvíveis são muito bem estabelecidas, e nos últimos anos verifica-se uma grande divulgação em novas aplicações como suporte para cultura de células na engenharia de tecidos. O material é preparado com características precisas que permitem o crescimento, a proliferação celular e a formação de um novo tecido.

Os desafios implicados na utilização dos polímeros bioreabsorvíveis como suporte para cultura de células na engenharia de tecidos envolvem desde o projeto e o processamento dos suportes, 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 literatura técnica

ainda tem limitações na caracterização desses suportes. Avaliar novas metodologias para o desenvolvimento desses suportes e caracterizá-los representa um avanço nas relações e interações entre o material sintético e o biológico.

Objetivos

O objetivo deste trabalho foi preparar suportes densos e porosos de poli(ϵ -caprolactona) e poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) através das técnicas de fusão e evaporação do solvente com adição e lixiviação de sal. Os materiais foram estudados através de ensaios de degradação *in vitro* em tampão fosfato e soluções alcalinas de NaOH. A interação biológica das amostras foi avaliada pela cultura de osteoblastos em relação a sua adesão e morfologia celular e o estudo *in vivo* foi realizado pelo implante em tíbias de ratos Wistar.

Capítulo 2

Revisão da literatura

2.1 A Engenharia de tecidos

Desde a década de 1960, implantes temporários, confeccionados de polímeros bioreabsorvíveis, ganharam uma importância crescente na área médica, sendo utilizados em um amplo número de aplicações no corpo humano, tais como: suturas cirúrgicas (Kulkarni *et al.*, 1966), sistemas para liberação controlada de drogas (Liu *et al.*, 2004), *stents* (telas tubulares) (Valimaa *et al.*, 2004) e dispositivos ortopédicos (Ambrose *et al.*, 2004). Atualmente esses dispositivos fazem parte do cotidiano dos centros cirúrgicos no mundo inteiro.

Embora muitos dispositivos protéticos artificiais estejam disponíveis, poucos podem substituir completamente todas as complexas funções biológicas. Em situações clínicas mais severas somente o transplante do órgão retoma as atividades orgânicas. Assim, de uma forma idealizada, a melhor alternativa seria obter um novo órgão ou tecido, substituindo aquele que não desempenha normalmente suas funções. Nos dias de hoje, a medicina regenerativa é mundialmente investigada em centros de pesquisa e desenvolvimento, com mercado industrial na ordem de cem bilhões de dólares (Langer *et al.*, 2004 e Lysaght *et al.*, 2004).

A técnica, conhecida como *Engenharia de Tecidos*, consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos através do recrutamento de tecidos do próprio paciente, que são dissociados em

células e cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds*¹, para então serem reinseridos no paciente. Como uma ciência multidisciplinar, os trabalhos envolvem conhecimentos das áreas de biologia, ciências da saúde e de engenharia e ciência dos materiais (Langer *et al.*, 1993 e Griffith *et al.*, 2002). A Fig. 1 a seguir, adaptada de Freed *et al.* (1993), ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica da engenharia de tecidos.

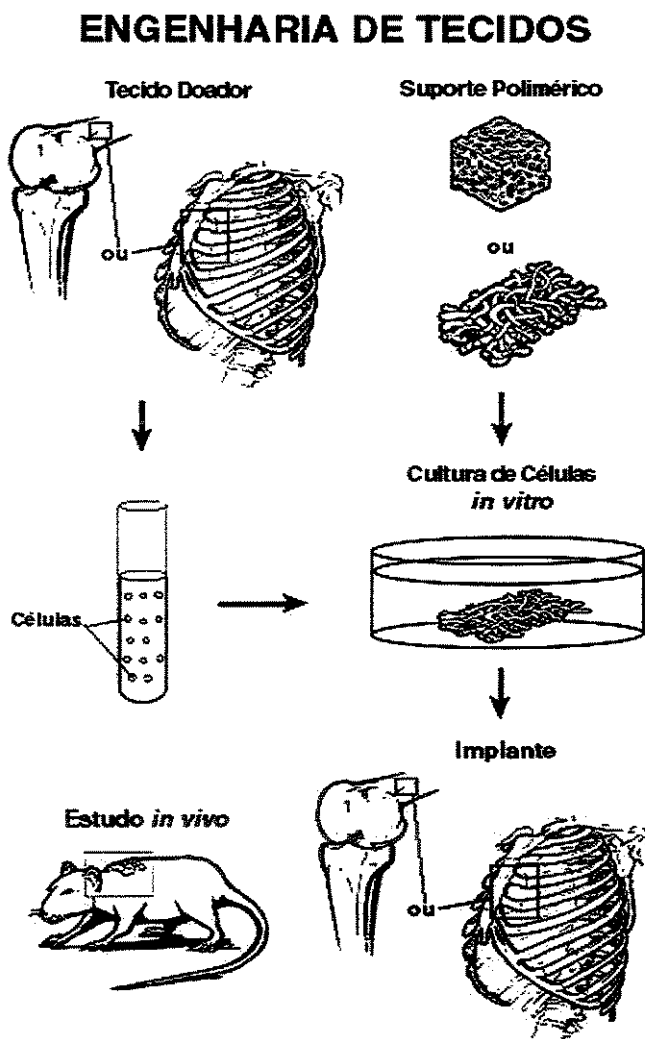


Figura 1 – Técnica da engenharia de tecido (Freed *et al.*, 1993).

¹ A palavra *scaffold* é traduzida literalmente como “andaime, palanque, armação”. Em trabalhos científicos atribuem-se diversos significados, como p. ex.: suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc. Neste trabalho, o termo adotado como sinônimo de *scaffold* será suporte.

Buscando uma padronização tanto na terminologia como na metodologia de pesquisa e aplicação dos produtos preparados pela engenharia de tecidos, a regulamentação vem sendo feita por normas ASTM (entre elas F2312-03, F2027-00e1 e F2150-02e1) e por órgãos governamentais de países da Europa, Japão, Canadá e outros (Lloyd-Evans, 2004). De uma forma geral, a preparação dos produtos da engenharia de tecidos segue as seguintes etapas:

- (I) Seleção e processamento do suporte
- (II) Inoculação da população celular sobre o suporte
- (III) Crescimento do tecido prematuro
- (IV) Crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico (bioreator)
- (V) Re-Implante cirúrgico
- (VI) Assimilação do produto.

2.2 Suportes (*Scaffolds*)

Considerado de forma integrada, tanto sob o aspecto da engenharia de materiais quanto do tipo de tecido e reparo necessário, o primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa a seleção do suporte para as células. A seleção leva em consideração tanto o tipo e o local da lesão, como a sua extensão, podendo seguir basicamente duas estratégias de aplicação quando preparado com polímeros bioreabsorvíveis (Hutmacher, 2000).

Na primeira estratégia (Fig. 2), o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, da inoculação até o reimplante no organismo hospedeiro. O implante do conjunto polímero e células ocorre com um tecido prematuro formado e o polímero é remodelado pela degradação *in vivo*, 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.

Na segunda estratégia (Fig. 2), o implante ocorre com tecido maduro formado. O suporte polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequados para

a inoculação das células até a sua inserção num bioreator, onde ocorrerá a formação do tecido maduro. Nesta etapa, as células semeadas proliferam e secretam matriz extracelular durante a cultura *in vitro*, enquanto o polímero é degradado e reabsorvido 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.

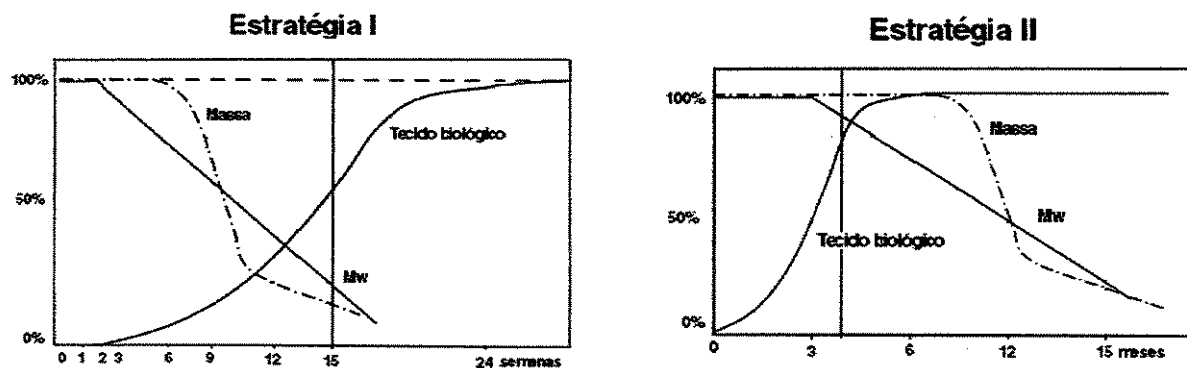


Figura 2 – Estratégia I e II de seleção de polímeros bioreabsorvíveis aplicados à engenharia de tecidos (a linha vertical indica o momento de implante *in vivo*).

2.3 Polímeros bioreabsorvíveis

Baseado nas estratégias anteriores, a primeira etapa na engenharia de tecidos inicia-se com o desenvolvimento, seleção e o processamento dos suportes. O uso de polímeros bioreabsorvíveis como suporte para a cultura de células vem tendo destaque na engenharia de tecidos (Kellomäki *et al.*, 2004).

Os conceitos de *biodegradação*, *bioerosão*, *bioabsorção* e *bioreabsorção* têm definições distintas. Frequentemente usados na engenharia de tecidos e, devido à falta de padronização para os termos, utilizamos neste trabalho a definição fornecida por Michel Vert, químico e diretor do Centro de Pesquisas em Biopolímeros Artificiais, da Universidade de Montpellier I, França, um dos pioneiros e líderes mundiais no estudo de materiais poliméricos bioreabsorvíveis.

Segundo Vert *et al.* (1992) *biodegradável* é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo.

Bioerodível são materiais e dispositivos poliméricos que apresentam perda de massa durante o processo de degradação, sendo os produtos e subprodutos reabsorvidos pelo organismo.

Bioreabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que apresentam degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, i.e. materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo. Bioreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. O uso da palavra “bioreabsorção” é adequado quando a eliminação é total.

Bioabsorvível são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular. Este é o caso, por exemplo, da lenta dissolução de implantes solúveis em fluidos orgânicos. Um polímero bioabsorvível pode ser bioreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas.

Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis e bioreabsorvíveis encontram-se os poli(α -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, da qual fazem parte os poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e seus copolímeros. Outros materiais, como a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) também são descritos como materiais biodegradáveis e bioreabsorvíveis. Originalmente usados como fios de sutura (Dexon®, Vicryl®, Maxon®, PDS®, etc), atualmente os poli(α -hidróxi ácidos) podem ser encontrados em diversos produtos comerciais de fixação óssea, também aprovados pelo FDA (Biofix®, FixSorb®, Neofix®, ResorPin®, etc) (Sung *et al.*, 2004). A Tab. 1 fornece algumas propriedades destes materiais.

Tabela 1 – Polímeros sintéticos bioreabsorvíveis (Chu, 1999 e Middleton *et al.*, 2000).

Polímero	Sigla	Fórmula	T _g (°C)	T _m (°C)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Tempo de Degradação (meses) ^b
Poli(ácido glicólico)	PGA		35 – 40	225 – 230	8,4	6 – 12
Poli(L-ácido láctico)	PLLA		60 – 65	173 – 178	2,7	> 24
Poli(D,L-ácido láctico)	PDLLA		55 – 60	Amorfo	1,9	12 – 16
Poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico)	PLGA		45 – 50 ^a	Amorfo	2,0	1 – 2
Poli(ε-caprolactona)	PCL		(-65) – (-60)	58 – 63	0,4	24 – 36

(a) Valores para o copolímero 50/50; (b) Até a completa bioreabsorção; T_g = temperatura de transição vítrea; T_m = temperatura de fusão.

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 do corpo, inicialmente o material sofre hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar ponderal média (M_w) e pela perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração e à compressão, conforme mostra a Fig. 3 (Pietrzak *et al.*, 1997 e Sung *et al.*, 2004).

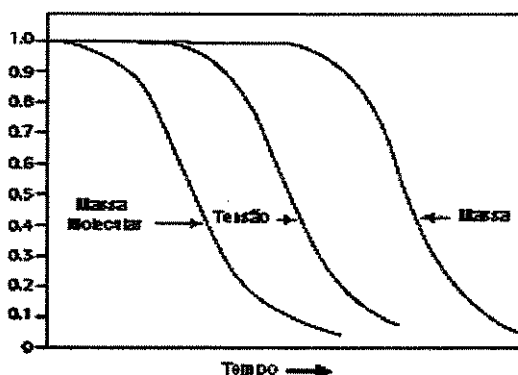


Figura 3 - Curvas genéricas mostrando a sequência da diminuição das propriedades: massa molecular, tensão e massa durante a degradação de polímeros bioreabsorvíveis (Pietrzak *et al.*, 1997).

O mecanismo da degradação e erosão *in vitro* dos polímeros bioreabsorvíveis tem sido avaliado desde a década de 1980 e demonstra ser um processo heterogêneo na extensão do material. A degradação/erosão é classificada em dois grupos, denominados de bioerosão superficial (*surface erosion*) e bioerosão interna (*bulk erosion*) (Tamada *et al.*, 1993). Na busca por um modelo teórico para a degradação/erosão *in vitro*, o grupo de pesquisa em polímeros bioreabsorvíveis da Universidade de Regensburg, Alemanha, liderado pelo Prof. Achim Göpferich, descreve que o processo depende fundamentalmente da capacidade de difusão da água no material, da concentração de ligações ésteres hidrolisáveis, da velocidade de hidrólise e também da geometria e morfologia do material (Burkersroda *et al.*, 2002).

A hidrólise das ligações ésteres produz terminais ácidos que podem, ou não, serem difundidos para o meio de degradação. Inicialmente o processo de degradação é considerado homogêneo, gerando oligômeros solúveis em água em toda a extensão do material. Se a difusão e solubilização desses produtos forem efetivas, o material sofrerá, preferencialmente, uma erosão superficial (*surface erosion*). Se a taxa de difusão dos produtos e subprodutos ácidos presentes na matriz é baixa, há um acúmulo de ácidos, fazendo com que estruturas densas tenham uma erosão inicial na superfície, mas apresentando uma degradação mais acentuada no centro (*bulk erosion*) (Tamada *et al.*, 1993, e Burkersroda *et al.*, 2002). É o chamado efeito autocatalítico (Li, 1999). A Fig. 4 ilustra o mecanismo de degradação/erosão dos polímeros bioreabsorvíveis.

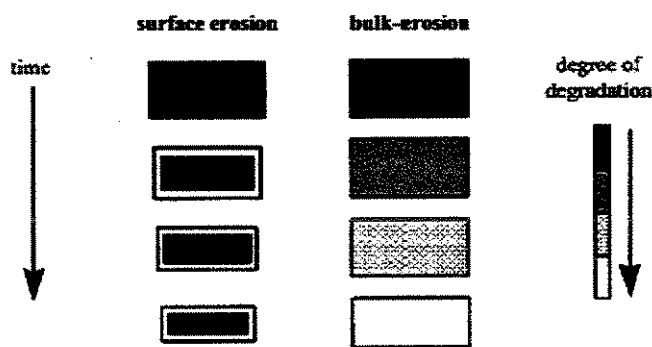


Figura 4 – Degradação/erosão de polímeros bioreabsorvíveis (Burkersroda *et al.*, 2002).

A autocatálise foi avaliada por Li *et al.* (1990a) ao estudar copolímeros de poli(D,L-ácido láctico) (PDLLA). Segundo os autores, após 12 semanas de degradação *in vitro* em tampão fosfato, o interior do material sofre significativa diminuição de massa. Resultados semelhantes são obtidos nos estudos *in vivo*. A degradação de maneira heterogênea foi avaliada e confirmada pelos estudos subsequentes (Li *et al.*, 1990b e Li *et al.*, 1990c).

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. Após a hidrólise do material 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 CO₂ e, conseqüentemente, a decomposição em citrato. O citrato é então incorporado no Ciclo de Krebs,

resultando em CO_2 e H_2O , podendo sua eliminação ser feita através da urina e da respiração (Fig. 5). Dessa forma o material foi reabsorvido e metabolizado (Ali *et al.*, 1993a).

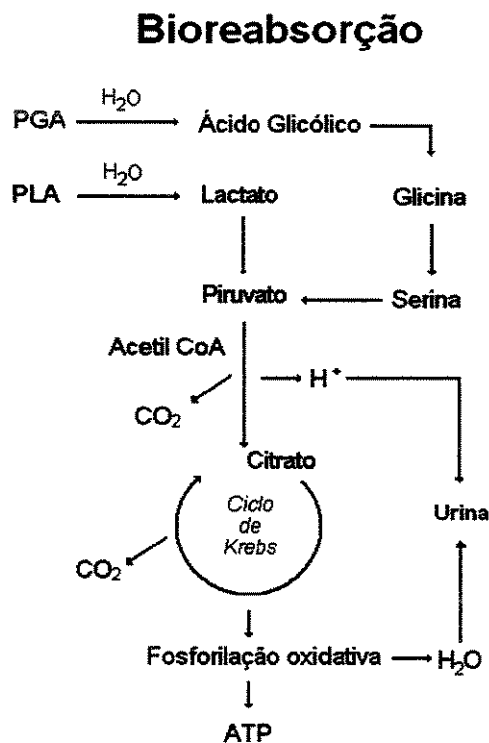


Figura 5 – Rota metabólica de bioreabsorção de polímeros bioreabsorvíveis.

Em estudos *in vivo*, o processo de biodegradação e bioreabsorção é um mecanismo complexo de eventos celulares e bioquímicos. Com o implante do material sintético, o organismo promove uma típica resposta a uma reação inflamatória de corpo estranho. A influência na degradação pela presença de peróxidos, enzimas e células fagocitárias, representa ainda hoje um importante enfoque nas pesquisas dos polímeros bioreabsorvíveis (Chu, 1999 e Sung *et al.*, 2004).

A degradação *in vitro* do material mostra-se como uma boa alternativa quando comparada aos estudos *in vivo*, fundamentais e necessários na avaliação de polímeros bioreabsorvíveis como suporte na engenharia de tecidos. Os custos são menores, o processo pode ser acelerado e as condições do ensaio, como temperatura, pH, produtos e subprodutos de degradação, podem ser quantificadas e monitoradas (Luciano *et al.*, 2003 e Laine *et al.*, 2004).

2. 4 Fatores que influenciam a degradação

Muitos fatores determinam a resposta inflamatória e a taxa de degradação dos polímeros bioreabsorvíveis, entre eles: local de implante, solicitação mecânica, massa molar, distribuição da massa molar, composição química/esterioisométrica, cristalinidade, sua morfologia, envolvendo o tamanho e geometria do suporte desenvolvido, porosidade, rugosidade da superfície, energia livre de superfície, carga da superfície, pH, presença de aditivos e outros (Middleton *et al.*, 2000). Dentre esses fatores podemos destacar:

2.4.1 Localização do Implante

Na localização do implante deve-se levar em conta a vascularização local e a solicitação mecânica. Se um polímero bioreabsorvível é implantado num local de alta vascularização (grande atividade vital), sua velocidade de degradação será mais rápida em relação a uma região menos vascularizada, de funções passivas. Locais de grande solicitação mecânica também têm sido descritos como aceleradores da degradação (Hollinger *et al.*, 1986).

2.4.2 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: poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(D, L-ácido láctico) (PDLLA) e copolímeros em diferentes proporções. Segundo Bendix (1998), 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. A cinética de hidrólise do PDLLA tem sido verificada e demonstra ser mais rápida do que o PLLA (valores na Tab. 1).

O grupo metila presente nas cadeias de PLA é responsável pelo impedimento estérico na reação de hidrólise. Dessa forma, a presença de unidades de ácido glicólico favorece a penetração da água e conseqüentemente a taxa de degradação. Publicada em 1977, a Fig. 6 mostra a meia-

vida (perda de massa em 50%) em função da razão de unidades de ácido láctico e ácido glicólico em copolímeros PLGA implantados em ratos. Para copolímeros PLGA, a composição química das unidades de ácido láctico e ácido glicólico é avaliada como fator determinante na degradação por hidrólise. Neste estudo, Miller *et al.* (1977) avaliaram a degradação *in vivo*, durante 11 meses, de amostras de PLA (100), PLGA (25/75), PLGA (50/50), PLGA (75/25) e PGA (100), através da inclusão de isótopos ^{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 amostras de PLGA (50/50) e está fundamentalmente relacionada com a cristalinidade dos materiais.

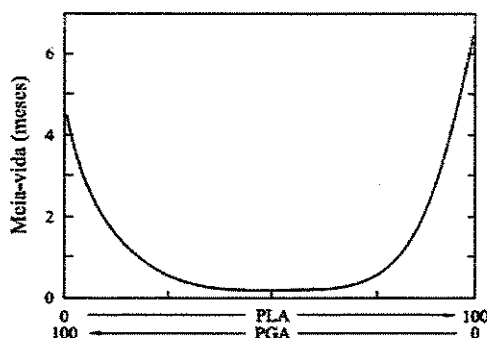


Figura 6 – Perda de massa (em meses) de polímeros bioreabsorvíveis em função da composição química (adaptado de Miller *et al.*, 1977).

2.4.3 Cristalinidade

A influência da cristalinidade na velocidade de degradação dos polímeros bioreabsorvíveis foi relatada por Fischer *et al.* (1973) através de distribuições trimodais da massa molar ponderal média (M_w) utilizando dados de degradação *in vitro* para copolímeros de PDLLA. A degradação de polímeros semicristalinos ocorre, fundamentalmente, em duas etapas:

Devido à disposição espacial das cadeias poliméricas, o efeito da cristalinidade influi na taxa de absorção de água pelo polímero. A primeira etapa 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. A segunda ocorre quando parte considerável da região amorfa está degradada, e prossegue no centro dos domínios cristalinos (Li, 1999). Dessa

forma, para polímeros parcialmente cristalinos, a literatura descreve um aumento porcentual da porção cristalina devido a formação de novos cristais, através do rearranjo das cadeias de menor massa molar originadas no processo de degradação (Duek *et al.*, 1999).

2.4.4 Geometria e morfologia

A influência da porosidade e geometria do suporte polimérico é também relatada como um dos fatores determinantes na velocidade de degradação e indução ao crescimento celular (Wu *et al.*, 2004).

Os principais estudos da influência da morfologia na degradação dos suportes bioreabsorvíveis têm sido realizados pelo grupo de pesquisa liderado por Antonio G. Mikos, da Universidade de Rice, EUA. Com diversos trabalhos e patentes relacionadas à metodologia de preparo de suportes bioreabsorvíveis e suas aplicações, Mikos propõe, no início da década de 90, que a taxa de penetração e crescimento celular em suportes porosos está diretamente relacionada com o tamanho e a distribuição do tamanho dos poros no material (Mikos *et al.*, 1993a).

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 cloreto de sódio, com partículas de sal variando entre 250–500 μm , obtendo suportes que possuíam em média 85% de porosidade, com tamanhos de poros variando entre 50–150 μm . Através de implantes subcutâneos, a invasão celular foi avaliada 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 , para ambos os polímeros, quanto maior o tamanho do poro do material maior foi a taxa de crescimento celular devido à facilidade de difusão dos nutrientes nos fluidos orgânicos locais.

Estudos da degradação de membranas densas e porosas de PLLA em tampão fosfato (pH 7,4) (Barbanti *et al.*, 2002) e em meio de cultura HAM F10 (Barbanti *et al.*, 2004a) mostram que o efeito autocatalítico é observado nos suportes densos quando comparadas aos porosos,

entretanto, o tamanho do poro não mostrou ter influência na morfologia das amostras durante o período de degradação, nem em função da adesão celular (Santos *et al.*, 2001).

Comumente, os fatores que influenciam a degradação são estudados conjuntamente. Lu *et al.* (2000b) avaliaram a composição química e a morfologia durante a degradação *in vitro* e *in vivo* de copolímeros de PLGA. Foram preparados suportes porosos 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 também não tem influência durante a degradação dos materiais e que as amostras de PLGA (50/50) degradam mais rapidamente que as de PLGA (85/15) devido à maior porcentagem de unidades de ácido glicólico.

2.5 Técnicas de preparo dos suportes porosos

Como morfologia preferencial para uso na engenharia de tecidos, suportes porosos têm sido preparados por diversas técnicas. Publicadas na literatura científica (concomitantemente às requisições de patentes nos EUA), as técnicas de preparo de suportes porosos foram descritas em culturas de células específicas, e ainda representam um importante enfoque em desenvolvimento (Williamson *et al.*, 2004). Entre as técnicas podemos destacar: união de fibras (*fiber bonding*) (Mikos *et al.*, 1993b), evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal (*solvent casting, particulate leaching*) (Mikos *et al.*, 1993c), inversão de fases (Pezzin *et al.*, 2002), injeção de gás (Harris *et al.*, 1998), deposição por fusão (*fused deposition modeling-FDM*) (Hutmacher *et al.*, 2004), *freeze-dried* (Patist *et al.*, 2004), sinterização por laser (Williams *et al.*, 2005) e outras.

O processo de *fiber bonding* foi descrito em diversos experimentos relacionados à cultura de condrócitos e formação de cartilagem (Vacanti *et al.*, 1991; Freed *et al.*, 1993, Sittinger *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 1997; Rotter *et al.*, 1998 e, Temenoff *et al.*, 2000). Usando preferencialmente PGA para o preparo dos suportes, a técnica permite a fusão de fibras entre os pontos de contato, com porosidade superior a 81% e poros com tamanho de 500 μm .

O processo de evaporação de solvente com adição e lixiviação de sal mostra-se útil na confecção de suportes com grande variação de porosidade (47 a 97%) e diâmetro de poros (50-500 μm). A porosidade pode ser controlada pela quantidade de sal adicionado e o tamanho dos poros pelo tamanho dos cristais de sal. A técnica permite uma boa reprodutibilidade, com interconexão dos poros (Mikos *et al.*, 2000).

Diversos autores citam o processo de evaporação do solvente com desvantagens significativas para a cultura de células. Para Harris *et al.* (1998), Mikos *et al.* (2000) e Sarazin *et al.* (2004), 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, além de impossibilitarem a inclusão de agentes farmacologicamente ativos durante o preparo.

Uma alternativa ao método de evaporação do solvente com inclusão de sal é a técnica de fusão aliada à extrusão de pinos e tubos (Jeong *et al.*, 2004; Barbanti *et al.*, 2004b e Boccaccini *et al.*, 2005). Na fabricação de fibras ou tubos por extrusão, altas temperaturas são requeridas e podem degradar o material gerando produtos e subprodutos tóxicos. A alta temperatura também é um fator desvantajoso quando o material está incorporado de outros materiais orgânicos, como os fatores de crescimento (Chen *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, Dietmar W. Hutmacher, da Universidade de Singapura, tem se destacado mundialmente pelo preparo de suportes com fibras de PCL, através da técnica de fusão por deposição (FDM), gerando suportes porosos na forma de redes com arquitetura precisa em escala nanométrica (Hutmacher, 2000 e Hutmacher *et al.*, 2004).

Desenvolver novas técnicas e aprimorar as já desenvolvidas continua sendo importantes enfoques de estudo na utilização de polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos (Altpeter *et al.*, 2004). Por exemplo, aliar o processamento do material à inclusão de fatores de crescimento é um dos desafios atuais. Os fatores de crescimento são requeridos para promover a vascularização, vasodilatação, inibição de plaquetas, fornecimento de oxigênio e nutrientes

necessários para viabilizar o sucesso da cultura de células e dos implantes (Huang *et al.*, 2004 e Rai *et al.*, 2005).

2.6 Aplicações e produtos da engenharia de tecidos

Existem diversos relatos na literatura de experimentos que visam a reprodução total ou parcial de estruturas anatômicas humanas, seja para terapia ou para reconstrução. Em franca expansão, os produtos preparados pela engenharia de tecidos (TEPs–*Tissue-Engineered Products*) estão em fase de aprovação pelo FDA. A Tab. 2 adiante mostra a relação de produtos aprovados pelo FDA e atualmente em comercialização (Lysaght *et al.*, 2004).

As reconstituições da pele pela engenharia de tecidos destacam-se como os primeiros produtos comerciais disponíveis e aprovados pelo FDA. O primeiro lançamento (Apligraf®), indicado para úlceras em pacientes diabéticos é produzido a partir de cultura humana de prepúcio de recém-nascidos. O produto é um composto bilaminar, constituído de derme e epiderme, e comercializado como um equivalente de pele humana. A camada dérmica é produzida usando-se uma cultura de fibroblastos em uma base de colágeno bovino do tipo I. Após a maturação em um bioreator, a epiderme é formada pela inoculação de queratinócitos, sobre a camada de matriz extracelular produzida pelos fibroblastos dérmicos. A ausência de outras células da epiderme no produto final, como os melanócitos, células de Langerhans (células apresentadoras de antígeno), e células de Merkel (tidas como mecano-receptores), não limitam sua aplicação. Um produto similar ao Apligraf®, e também aprovado pelo FDA, é o OrCel®, diferenciando-se por utilizar culturas de células autólogas (Auger *et al.*, 2004).

Tabela 2 – Produtos preparados pela engenharia de tecidos e aprovados pelo FDA (dez/2002).

Produto	Empresa	Lançamento	Descrição
Apligraf®	Organogenesis Inc.	1998	Equivalente de Pele Humana
Carticel®	Genzyme Co.	1999	Cultura autóloga de condrócitos
Dermograft®*	Smith&Nephew Co.	2001	Equivalente de Pele Humana
OrCel®	Ortec International Inc.	2001	Equivalente de Pele Humana

*O produto teve sua produção interrompida pela Smith&Nephew Co.

Outro produto também aprovado pelo FDA, mas com sua produção e comercialização descontinuada, é o Dermagraft®. Produzido por técnicas da estratégia II da engenharia de tecidos, o produto é um substituto dérmico e utiliza um suporte de PLGA para o cultivo de fibroblastos humanos, também obtidos de prepúcio de recém-nascidos. O material degrada durante a cultura de células, servindo como suporte para a proliferação e secreção da matriz extracelular. Outros produtos são atualmente pesquisados para aplicações específicas na reconstrução de pele, incluindo o cultivo de fibroblastos e queratinócitos em microesferas de PLGA e outros materiais (Seal *et al.*, 2001).

Durante a década de 90, grandes investimentos foram feitos em pesquisa e desenvolvimento de TEPs cartilagosos. Atualmente, o único produto comercial aprovado pelo FDA é o Carticel®, uma expansão *in vitro* de cultura autóloga de condrócitos. O produto tem tido sido indicado para defeitos cartilagosos sintomáticos dos côndilos femorais (lateral e medial), geralmente causados por traumas de repetição (Browne *et al.*, 2000).

Em pesquisas com tecidos cartilagosos, os polímeros bioreabsorvíveis são amplamente utilizados (Kamil *et al.*, 2004). A literatura tem descrito vários estudos de reconstrução de complexas estruturas anatômicas, liderados mundialmente pelo grupo de pesquisa do cirurgião Joseph P. Vacanti, o anestesiológista Charles Vacanti, ambos da Universidade de Harvard, e pelo engenheiro químico, Robert Langer do MIT (*Massachusetts Institute of Technology*). Usando suportes de PGA e PLA são relatados reconstruções cartilagosas na forma de uma orelha humana (Kamil *et al.*, 2004), (Shieh *et al.*, 2004), do septo nasal (Tay *et al.*, 2004) e traquéia (Kojima *et al.*, 2004). Preparados pelo processo de *fiber bonding*, o suporte é inoculado com condrócitos e inserido em bioreatores. Os resultados histológicos mostram neotecido cartilaginoso, abundante em componentes da matriz extracelular de cartilagem hialina e elástica: ácido hialurônico, sulfato de condroitina e colágeno do tipo II.

Nos últimos anos, mundialmente são descritos experimentos que visam a reprodução total ou parcial de estruturas anatômica humana, como por exemplo: tecido hepático (Ohashi *et al.*, 2005), dente (Duailibi *et al.*, 2004), mandíbula (Abukawa *et al.*, 2004), nervos periféricos (Hsu *et*

al., 2004), válvulas e ductos urológicos (Atala, 2004), menisco (Pezzin *et al.*, 2003a), vasos (Opitz *et al.*, 2004) e regeneração de tecido ósseo (Ishaug-Riley *et al.*, 1998).

2.6.1 Novas perspectivas na engenharia de tecidos

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. Os procedimentos dos experimentos são atualmente padronizados e protocolados. Aplicada 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. Assim, é de fundamental importância o conhecimento das características de adesão e diferenciação celular durante o processo (Anselme, 2000).

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. Recentemente, a produção de suportes feitos de células e de híbridos de hidrogéis e células tem sido um novo enfoque de pesquisas na engenharia de tecidos (Tsang *et al.*, 2004).

Além do uso de culturas primárias e linhagens já estabelecidas (Santos *et al.*, 2004), células tronco têm tido um importante destaque. Avanços significativos têm sido feitos em regeneração óssea pelo uso de células mesenquimais (Uematsu *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de novos materiais pode ser citado também como um setor de vanguarda na engenharia de tecidos. A síntese de polímeros híbridos pela adição de unidades de aminoácidos e/ou peptídeos busca materiais específicos e que estimulem a ancoragem celular, bem como a proliferação e diferenciação baseada nas características bioquímicas das células e de suas membranas (Chen *et al.*, 2004). Estudos com blendas e copolímeros de materiais aprovados

pelo FDA e em uso comercial representam também uma alternativa de novos suportes (Pezzin *et al.*, 2003b).

Mesmo sendo estudados há décadas, os polímeros bioreabsorvíveis tem tido aplicações em segmentos pouco correlacionados. Recentemente, uma forma injetável de PLLA foi aprovada pelo FDA para comercialização, indicada a pacientes com lipodistrofia causada pelas drogas antiretrovirais na terapia contra o vírus HIV (Moyle *et al.*, 2004).

Apesar de revolucionária e com grandes perspectivas de comercialização de novos produtos, a engenharia de tecidos tem suas limitações. O avanço das técnicas de cultura de células e dos suportes utilizados ainda não permite que os tecidos e órgãos sejam reproduzidos com toda sua complexidade. Tecidos feitos de um único tipo histológico vêm sendo abordados conforme o exposto anteriormente. Entretanto, a reconstrução *in vitro* de um órgão completo é muito mais complexa, visto que eles são formados por mais de um tipo de tecido que interagem entre si e possuem funções complementares.

Como base para a composição de um novo tecido, os polímeros bioreabsorvíveis vêm sendo amplamente estudados para uma melhor compreensão dos fatores que influenciam sua biodegradação, bioreabsorção e a forma com que interagem com os elementos biológicos. Os produtos e técnicas já desenvolvidas vêm servindo como um dos alicerces desta complexa área de conhecimento que é a engenharia de tecidos. Neste trabalho, enfocamos o estudo das técnicas de preparado de dois diferentes polímeros bioreabsorvíveis, caracterizando-os quanto as suas propriedades térmicas, morfológicas e mecânicas, avaliando-os em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Capítulo 3

Materiais e métodos

3.1 Preparo dos suportes

Suportes de polímeros bioreabsorvíveis foram preparadas utilizando-se poli(D,L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (50/50) (PLGA50) (Mw 65.000 g/mol), fornecido pela Purac (Groningen, Holanda) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Mw 100.000 g/mol), fornecido pela Sigma (St. Louis, EUA). Foram preparados suportes densos e porosos pelo processo de evaporação de solvente e por fusão.

3.1.1 Evaporação do solvente (*Casting*)

Membranas densas foram preparadas dissolvendo-se o polímero à temperatura ambiente, em cloreto de metileno (CH_2Cl_2) (Merck) na concentração 10% (m/v). A solução polímero-solvente foi vertida sobre placas de vidro e a evaporação do solvente foi realizada de forma controlada, em cuba saturada de solvente, conectada a uma corrente de ar comprimido, seco e filtrado, por aproximadamente 24 h (Fig. 7).

Membranas porosas foram preparadas de maneira análoga às densas, incluindo-se após a dissolução, citrato trissódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (Merck) na concentração de 50% (m/v) – em relação à solução polímero/solvente – com granulometria de sal previamente estabelecida na faixa entre 180 e 250 μm . Após a evaporação do solvente, as amostras contendo sal foram

cortadas em réplicas de 3 cm x 3 cm, e discos de 6 mm de diâmetro para amostras densas. As amostras foram acondicionadas num dessecador sob vácuo até o momento da sua utilização.

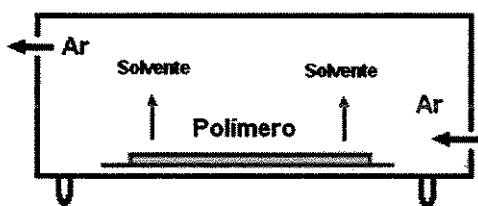


Figura 7 – Preparo de suporte de polímeros bioreabsorvíveis pela técnica da evaporação de solvente (*casting*).

3.1.2 Fusão

Amostras densas foram preparadas por fusão seguida de injeção manual em moldes cilíndricos utilizando-se uma mini injetora Mini Max Molder (LMM-2017). Ambos os materiais foram fundidos a 160 °C durante aproximadamente 3 min. Após a fusão do material injetou-se a massa polimérica no molde, mantido e resfriado a temperatura ambiente. Amostras porosas foram preparadas de forma análoga às densas, adicionando-se, durante a fusão, citrato trissódico ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5H_2O$) (Merck), com uma granulometria do sal previamente estabelecida entre 180 e 250 μm , na concentração de 2:1* (massa de sal:massa de polímero). As amostras foram cortadas em réplicas de 6 mm de comprimento.

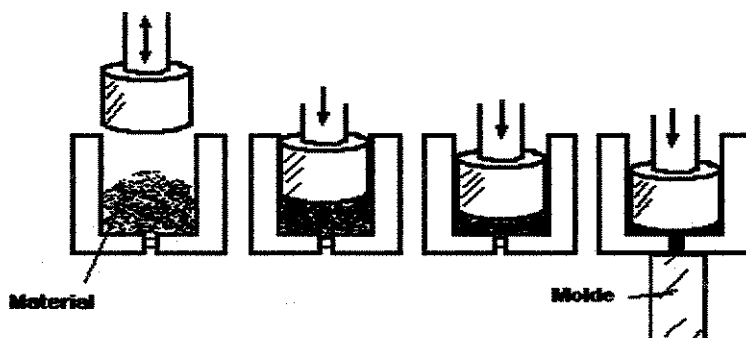


Figura 8 – Preparo de suporte de polímeros bioreabsorvíveis pela técnica da fusão.

* A concentração (2:1) de sal utilizada foi a máxima possível durante o processo de injeção manual.

3.1.3 Lixiviação do sal das amostras

Para a retirada do sal, e conseqüente formação de poros, as amostras foram imersas, durante 30 h, em água destilada, drenada e repostada em períodos de aproximadamente 6 horas (Fig. 9). Após banho em etanol, as amostras foram secas a temperatura ambiente e submetidas a vácuo.

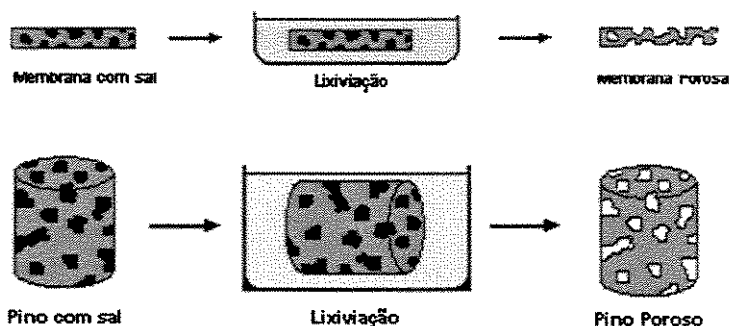


Figura 9 – Lixiviação do sal em amostras de polímeros bioreabsorvíveis.

3.2 Técnicas de caracterização

3.2.1 Variação de pH

Durante os períodos de retirada das amostras foram realizadas análises de pH (Micronal B474) com subsequente troca da água de imersão.

3.2.2 Massa normalizada

A variação de massa das amostras foi avaliada pela massa normalizada, obtida através da relação entre a massa inicial e a massa experimental. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.3 Microscopia ótica com luz polarizada (MO)

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

3.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das amostras foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura utilizando-se um microscópio 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 200 s, com tensão de operação em 10 kV. A análise das micrografias foi feita usando-se o programa *freeware ImageTool®*, fornecido no sítio da Universidade do Texas (EUA) (Texas Health Science Center, 2005). A análise estatística dos valores de porosidade e tamanho de poros obtidos pelo analisador de imagens foi feita pelo teste ANOVA. As diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada pelo teste Tukey *t*, com 5% de significância.

3.2.5 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Análises de DSC (STA 409C da Netzsch – Geratebau Gmbh Thermal Analysis) foram realizadas através de dois aquecimentos no intervalo de varredura de 25 a 200 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de Hélio. Foram avaliados os valores da temperatura de transição vítrea (T_g), cristalização (T_c), fusão (T_m), variação da entalpia de cristalização (ΔH_c) e fusão (ΔH_m). Para o cálculo do grau de cristalinidade das amostras de PCL considerou-se a equação (1) a seguir:

$$\text{GraudeCris talinidade (\%)} = \frac{(\Delta H_m - \Delta H_c)}{\Delta H_{100\%}} \times 100 \% \quad (1)$$

Onde:

ΔH_m = entalpia de fusão experimental (J/g)

ΔH_c = entalpia de cristalização experimental (J/g)

ΔH_{100%} = 139,5 J/g (Entalpia de fusão para um polímero 100% cristalino) (Eldsäter *et al.*, 2000).

3.2.6 Análises termogravimétricas (TGA)

Através da técnica de TGA foi possível obter informações sobre a estabilidade térmica da amostra. As amostras foram aquecidas de 25 a 400 °C (taxa de aquecimento de 10 °C/min) sob atmosfera de Hélio. Foi possível avaliar a temperatura de início da degradação térmica (*Tonset*) das amostras utilizando-se o equipamento STA 409C da Netzsch (Gerätebau GmbH Thermal Analysis).

3.2.7 Ensaio mecânico de flexão

Em uma MTS TestStar II, amostras densas e porosas foram submetidos a ensaios de flexão de três pontos segundo a norma ASTM D790–95a (Ferreira, 2002). Utilizou-se célula de carga de 100 kgf (com fundo de escala de 10 kgf), velocidade de ensaio a 0,05 mm/s, com distância entre as duas extremidades de 18 mm. As relações descritas a seguir (Eq. 3 e 4) foram utilizadas para a determinação da tensão e do alongamento (Nielsen, 1974). O módulo de Young (E) foi determinado pelo coeficiente angular da região linear da curva tensão x deformação.

$$\sigma = \frac{8.F.L_o}{\pi.D^3} \quad (3)$$

$$\varepsilon = \frac{6.D.Y}{L_o^2} \quad (4)$$

Onde:

σ = tensão (MPa)

ε = alongamento (%)

F = força (N)

L_o = 18 mm

Y = deformação (mm)

D= diâmetro (mm)

3.2.8 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A análise de GPC, realizada pelo Instituto de Pesquisa Tecnológica (IPT), São Paulo/SP, permitiu a avaliação da massa molecular ponderal média (M_w), massa molecular numérica média (M_n) e do índice de polidispersão (IP). As amostras de aproximadamente 200 μ L foram dissolvidas em THF e avaliadas com base em curva padrão de poliestireno.

3.3 Estudos de degradação *in vitro*

Após preparo dos suportes e caracterização inicial, as amostras foram submetidas ao estudo do efeito da lixiviação do sal e a ensaios de degradação *in vitro* em tampão fosfato e NaOH.

3.3.1 Efeito da lixiviação do sal

Para o estudo do efeito da lixiviação do sal utilizou-se amostras de membranas densas e porosas, e pinos densos e porosos preparados com molde de 3 mm de diâmetro. Após a evaporação do solvente ou resfriamento, as amostras sem adição de sal e contendo citrato de sódio foram, separadamente, imersas em 40 mL de água destilada por até 35 h, na temperatura ambiente. Após períodos de 1, 6, 20, 24 e 30 h, as amostras foram retiradas, imersas em etanol por 1 h, secas na temperatura ambiente e submetidas a vácuo. A cada período analisado, a água de imersão foi drenada e repostada. Para o estudo do efeito da lixiviação do sal as amostras foram caracterizadas pelas técnicas de variação do pH, variação da massa normalizada, DSC, TGA e MEV.

3.3.2 Degradação *in vitro* em tampão fosfato (pH 7,4)

O estudo da degradação em tampão fosfato foi realizado com amostras tubulares densas e porosas, obtidas pelo processo de fusão, utilizando-se molde cilíndrico com dimensões 4 mm x 50 mm com haste interna, de 1,4 mm de diâmetro, posicionada centralmente ao molde. Após o preparo e lixiviação do sal as amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo meio de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, e mantidas em banho a $37 \pm 0,5$ °C. Após períodos de 1, 2,

3 semanas para PLGA50 e 8, 20, 32, 52 semanas para PCL, as amostras foram caracterizadas pelas técnicas de MEV, TGA, DSC, GPC e ensaio mecânico de flexão.

3.3.3 Degradação *in vitro* em NaOH

O estudo da degradação em meio alcalino foi realizado com amostras de suportes densos, preparados com molde de 3 mm, de PCL e PLGA50 em soluções aquosas de hidróxido de sódio (NaOH). Foram utilizadas soluções com concentrações 0,01 mol/L, 0,1 mol/L, 0,5 mol/L e água destilada como controle. O pH das soluções foi calculado pelas relações a seguir:

$$pOH = -\log[OH^-] \quad (5)$$

$$pH + pOH = 14 \quad (6)$$

Pela substituição da Eq. 6 na Eq. 5 tem-se a Eq. 7:

$$pH = \log[OH^-] + 14 \quad (7)$$

Tratando-se de uma base forte, o grau de dissociação do NaOH pode ser considerado 100% em solução aquosa. Dessa forma, a concentração da hidroxila presente no meio pode ser calculada pela concentração de hidróxido de sódio, i.e. $[NaOH] = [OH^-]$. Pela substituição dos valores na Eq. 7, temos: água destilada = pH 7; 0,01 mol NaOH/L = pH 12; 0,1 mol NaOH/L = pH 13 e 0,5 mol NaOH/L = pH 13,7.

O acondicionamento foi feito de forma similar ao estudo com tampão fosfato, e os tubos de ensaio foram mantidos em banho a $37 \pm 0,5$ °C. Após períodos de 1, 2, 4, 8 e 15 semanas para PCL e 1, 2 e 3 semanas para PLGA50, as amostras foram retiradas e lavadas abundantemente com água destilada e posteriormente com etanol. O material foi caracterizado em cada período pelas técnicas de MEV, DSC, e variação de massa.

3.4 Cultura de células

Sobre amostras de PCL e PLGA50 preparadas pelo processo de fusão e prensadas entre duas lâminas de vidro, a cultura de células foi realizada com osteoblastos fetais humanos da linhagem hFOB 1.19 (*human fetal osteoblast*), fornecidos pela *American Type Culture Collection* (ATCC) dos EUA. As células foram mantidas em meio HAM F-12 (Sigma, St. Louis, EUA) com 15 % de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell), a 37 ° C, com a troca de meio realizada a cada dois dias, e repiques sempre que a cultura atingisse a confluência.

Os materiais utilizados nesse trabalho foram previamente esterilizados por imersão em solução alcoólica 70 % por 24 h, lavados em meio de cultura HAM F-12 sem soro fetal bovino e incubados neste meio por 24 h a 37 °C antes da inoculação celular. A presença do meio de cultura durante o período de imersão permitiu avaliar a esterilidade dos materiais a serem utilizados, além de retirar o álcool presente, permitindo dessa forma que o metabolismo celular não fosse alterado.

3.4.1 Teste de adesão celular

A adesão celular foi realizada com modificação do método descrito por Mosmann (1983). Discos de Teflon® e amostras porosas de PCL e PLGA50 foram preparadas conforme descrito anteriormente. Para este experimento utilizou-se a própria placa de polipropileno (Corning), livre de qualquer tratamento, como controle positivo, e discos de Teflon® como controle negativo. Os poços receberam 100 µL de meio de cultura HAM F-12 sem soro, ficando incubados por 24 h a 37°C. O meio foi retirado e 100 µL de suspensão celular ($3 \cdot 10^5$ células/mL) contendo meio HAM F-12 com 15% SFB foram incubadas por 2 h em estufa a 37 °C. Ao fim do tempo de incubação, o meio foi removido, adicionando-se em seguida 100 µL de meio fresco com 50 µL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazolium (MTT) (5 mg/mL) e mantendo a placa em estufa a 37 °C por mais 4 h. Após o tempo de incubação, 100 µL de isopropanol ácido (álcool isopropílico com ácido clorídrico 0,04 mol/L) foram adicionados por poço e a placa colocada em agitador orbital por 15 min. Após serem agitadas, as soluções contidas em cada poço foram transferidas para uma nova placa, a qual foi colocada em leitor de microplacas Multiskan

(Bichromatic Version 1.06) e lida com comprimento de onda de 540 nm. Através da reação do MTT foi possível ler a absorbância de todos os tratamentos, a qual permitiu avaliar o número de células viáveis. Foram medidas as absorbâncias de todos os diferentes substratos em oito repetições. As análises estatísticas dos valores obtidos foram realizadas pelo teste ANOVA, e as diferenças estatísticas entre os grupos determinadas pelo teste Newman-Keuls.

3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura na cultura de células

A análise morfológica das células foi realizada através da inoculação de 3.10^5 células/mL em amostras porosas de PCL e PLGA50. As células foram mantidas em meio HAM F-12 (Sigma) com 15% de SFB (Nutricell). Como controle utilizaram-se células cultivadas em lamínulas de vidro nas mesmas condições de cultura. Após 24 h de incubação, o meio de cultura foi retirado e as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído 4 %, glutaraldeído 2,5 % em solução de tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4), e pós-fixadas com 1 % de tetróxido de ósmio em tampão fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4, por 15 min a 4 °C. As amostras foram desidratadas em uma série de concentração crescente de etanol por 15 min/banho (50 %, 70 %, 95 % e 100 %). O material foi submetido à secagem no ponto crítico (Balzers CPD030) e metalizado com ouro (Balzers SCD 050). As observações e fotografias foram feitas utilizando-se o microscópio JEOL JSM-5800 Low Vacuum.

3.4.3 Espectrometria de energia dispersiva de raios-x (EDS)

Para a realização da microanálise de EDS foram utilizadas as mesmas amostras processadas para análise morfológica em microscopia eletrônica de varredura. Para a identificação e quantificação dos elementos presentes nas diferentes condições experimentais, as amostras foram submetidas à análise da espectrometria dispersiva de raios-x com a utilização de sonda de microanálise em microscópio JEOL JXA-840A (Electron Probe Microanalyzer).

3.5 Estudo *in vivo*

O estudo *in vivo* dos materiais foi realizado através do implante em tibia de ratos de amostras densas e porosas de PCL e PLGA50 preparadas pelo processo de fusão, com molde de 2 mm de diâmetro. Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos, com idade e massa de aproximadamente 3 meses e 400 g, respectivamente. Os animais são provenientes do biotério do Centro de Ciências Médicas e Biológicas de Sorocaba, pertencente à Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (CCMB/PUCSP). Os animais permaneceram no biotério recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

3.5.1 Implante dos suportes de PCL e PLGA50

Os ratos foram pesados e submetidos à anestesia geral com uma solução de ketamina 5 % (100 mg/kg) e cloridrato de xylazina 2 % (6 mg/kg), por via intramuscular. Após a tricotomia e a anti-sepsia da região medial da pata traseira, foi realizada uma incisão longitudinal na pele de aproximadamente 2 cm, ao longo da borda anterior da tibia. Com auxílio do bisturi, o tecido muscular foi seccionado e afastado até a exposição do periósteo e do tecido ósseo. Com o uso de um micromotor (LB 100–Beltec) e uma broca de 2 mm de diâmetro (Carbide) foi produzida uma cavidade no terço proximal da diáfise tibial. A cavidade foi produzida na camada cortical atingindo o canal medular permitindo a introdução do material. O procedimento foi realizado em apenas uma pata para cada rato. O tecido muscular e a pele foram suturados de forma asséptica e os animais permaneceram em gaiolas em grupo máximo de 4 ratos por gaiola até o momento do sacrifício. Foram feitas observações diárias para avaliação de suas condições de saúde.

Após períodos de 2 dias, 2, 4, 8 e 12 semanas pós-cirúrgico, os animais foram sacrificados por exposição à ambiente saturado de clorofórmio (Andrade, 2002). Em seguida as tibias foram dissecadas e o segmento de cada uma delas contendo o material implantado foi retirado para fixação e análise histológica. Utilizou-se 4 ratos para cada período pós-cirúrgico.

3.5.2 Processamento do material e microscopia de luz

Após excisão, o processamento consistiu na fixação do material em formol 10 %, por um período de 24 h à temperatura ambiente. A descalcificação foi realizada numa segunda etapa com uma solução de ácido nítrico e formol (ambos a 10 %). Após a descalcificação, Amostras de PLGA50 foram desidratadas por série de etanol (70 %, 80 %, 95 % e 100 %), por 30 min cada, e imersas em solução de etanol e xilol (proporção de 1:1) por 30 min, e em seguida, xilol puro por 40 min. O material foi embebido com xilol e incluído em *Histosec*® (parafina acrescida de plastificante DMSO – dimetil sulfóxido) por 30 min e em parafina pura por 3 h (2 trocas de 90 min). Amostras de PCL, solúveis em xilol, foram desidratadas conforme descrito anteriormente e, pré-embebidas em álcool absoluto e resina na proporção 1:1 por 3 h, à temperatura ambiente (para cada 50mL do componente básico, colocou-se 0,5g de peróxido de benzoíla e agitou-se por 20 minutos). A embebição em resina pura por 48 horas, em dessecador a vácuo a 4 °C. Os moldes contendo resina e o elemento retificante (de cura) foram acondicionados em estufa a 37 °C por 48 h. Após inclusão em parafina líquida à temperatura ambiente, foram realizados cortes histológicos em micrótomo para preparação das lâminas. A observação foi feita em microscópio óptico Nikon (E800).

3.6 Fluxograma experimental

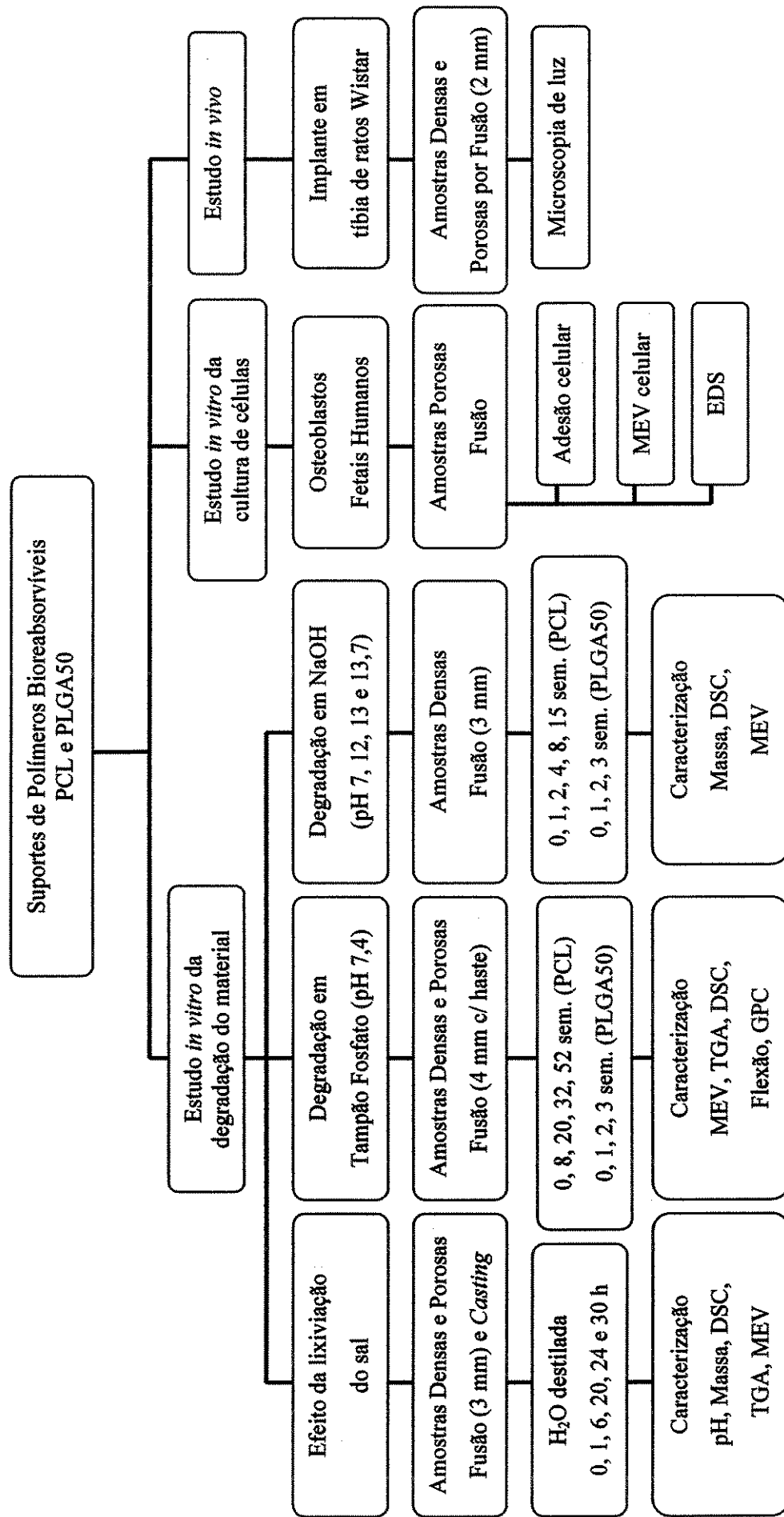


Figura 10 – Fluxograma experimental.

Capítulo 4

Estudo do Efeito da Lixiviação do Sal

Através de análises morfológicas e térmicas, este capítulo busca avaliar a influência da lixiviação de citrato de sódio em suportes porosos preparados pelo processo de evaporação do solvente e fusão.

4.1 Variação de pH

A Fig. 11 adiante mostra a variação do pH de amostras de PCL e PLGA50 durante 30 h de imersão em água destilada (tempo estimado para a completa lixiviação do sal adicionado). Pelo gráfico é possível observar que variações de pH ocorreram de forma significativa somente nas amostras preparadas com citrato de sódio. Amostras densas, preparadas sem a adição de sal, não variaram de pH durante o período estudado. O gráfico sugere ainda um decaimento mais acentuado das amostras de membranas, preparadas por evaporação do solvente. Após 30 horas de imersão, as amostras preparadas com a adição de sal não apresentaram variações de pH, sendo consideradas, de forma preliminar, como não contendo mais sal no seu interior.

A técnica de inclusão e lixiviação do sal tem sido freqüentemente utilizada para o processamento de suportes porosos de polímeros bioreabsorvíveis com aplicações na engenharia de tecidos. A literatura descreve a partícula geradora do poro (e a ser lixiviada) como *porogen*, e as amostras são normalmente preparadas com NaCl em faixas de tamanho de poros pré-determinados e imersas em água destilada para a completa dissociação (Mikos *et al.*, 2000).

Imersos em água destilada durante a retirada do sal, os suportes podem sofrer degradação por hidrólise tão logo o material seja exposto à água. A presença de terminais ácidos como produtos da degradação, diminuem o pH do meio (Li *et al.*, 1999a).

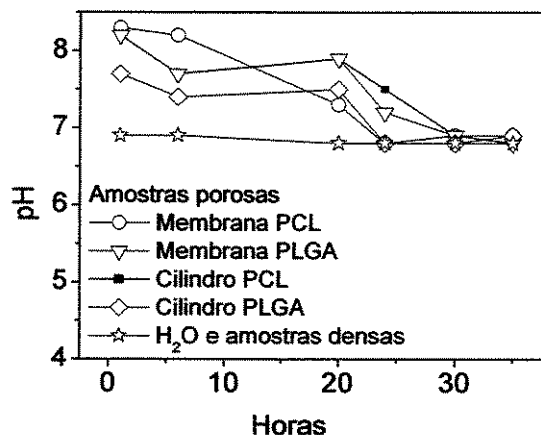


Figura 11 – Variação de pH de amostras de PCL e PLGA50 em função do tempo de imersão em água destilada.

Os resultados de pH durante o processo de lixiviação referem-se primordialmente às propriedades físico-químicas do citrato de sódio: em solução aquosa o citrato apresenta pH entre 7,5 e 9,5 (solubilidade de 50g/L água a 25 °C, Merck, 2005). Durante o processo de lixiviação, a tendência de decaimento mais acentuado das amostras preparadas pelo processo de evaporação do solvente pode ser atribuído à geometria da amostra estudada, pois, quanto maior a área de contato da água com o sal, mais rápido é o processo de dissociação.

O tempo de imersão para a completa lixiviação do sal varia conforme a geometria da amostra e o tipo de sal utilizado. Os tempos nem sempre são especificados na literatura, mas quando divulgados são determinados através de métodos de tentativa e erro, e variam desde horas (Lam *et al.*, 1994 e Barbanti *et al.*, 2002) a dias de imersão (Mikos *et al.*, 1993c e Hou *et al.*, 2003). Em nosso experimento, a equivalência entre o pH da solução contendo a amostra e o pH da água sugere que não há mais partículas de sal a serem removidas.

Sendo uma técnica simples e de baixo custo, o valor do pH da solução poderia ser utilizado como medida indireta da retirada do sal. Entretanto, os resultados devem ser avaliados com cautela, pois o material pode reter partículas circundadas pelo polímero e que impedem a dissociação durante o período de lixiviação. Em nosso experimento, a análise da fratura da amostra por técnicas de microscopia foi necessária para confirmar a presença ou não de partículas de sal no interior do suporte.

A Eq. 8 a seguir estipula uma relação entre o tempo de difusão (t_{dif} [s]) da água no material e a distância média a ser percorrida (d [cm]), onde D_{ef} é o coeficiente efetivo de difusão (cm^2/s) (Burkersroda *et al.*, 2002).

$$t_{dif} = \frac{d^2 \pi}{4D_{ef}} \quad (8)$$

Estimado por Crank *et al.* (1968) com valor de $D_{ef} = 10^{-8} cm^2/s$ e usando-se a Eq. 8, amostras com 2, 3 e 4 mm de diâmetro (para amostras cilíndricas) ou de espessura 2 mm (para membranas) possuem, respectivamente, t_{dif} aproximadamente igual a 9, 20 e 36 dias. De maneira inversa, fixando-se o tempo em 30 horas, a difusão da água no material alcançaria uma distância de 370 μm . Os cálculos são feitos pressupondo amostras densas, mas nos mostram que, por um processo passivo e espontâneo, a difusão da água e lixiviação do sal é um processo lento.

Com materiais semelhantes aos utilizados em nosso estudo, Sung *et al.* (2004) avaliaram a variação do pH em amostras de PCL (Mw 11.4000) e PLGA (Mw 40.000 – 75.000) durante a cultura de células de músculo liso em filmes porosos, preparados pelo processo de evaporação do solvente com adição de NaCl. Usando a técnica de fluorescência para a medida do pH ao redor do material, as amostras apresentaram significativo decaimento após 7 dias de cultura, sendo mais intenso nas amostras de PLGA. Como umas das conclusões apresentadas, o aumento da acidez ao redor do implante, diminui a viabilidade celular.

Ambientado na problemática da retirada do sal para a geração de poros, uma técnica ainda não avaliada é o implante em estudos *in vivo* do compósito polímero/sal, sem o processo de

lixiviação. Agrawal e Athanasiou (1997) avaliaram a degradação *in vitro* em água destilada de amostras de PLGA (50/50) com a inclusão de sais básicos (CaCO_3 , NaHCO_3). Como uma das conclusões do estudo, na ausência de soluções tampão, o pH das soluções inverte-se de básico (pela presença do sal) para ácido (devido aos produtos de degradação) num tempo médio de 20 dias. Em tecidos biológicos, as variações de pH por longos períodos provocam reações histológicas intensas. O sucesso do implante de suportes contendo sal depende também do tipo e da quantidade de sal utilizado. Pode-se prever nos tecidos adjacentes aos implantes, desequilíbrios de pH e eletrolíticos pelas grandes quantidades de íons Na^+ , K^+ , Cl^- , citrato, etc no volume extracelular. Manter o pH em valores fisiológicos (pH 7,4) é também fundamental não somente nos implantes de polímeros bioreabsorvíveis, mas também nas aplicações como suporte para cultura de células.

O tipo do sal utilizado também demonstra ser uma variável no processo de produção de suportes porosos de polímeros bioreabsorvíveis. As amostras são na grande maioria preparadas com NaCl, um sal de baixo custo, pH neutro, sistema cristalino cúbico e solubilidade em água de 358 g/L a 20 °C (Merck, 2005). O uso de outros sais tem tido destaque como uma alternativa ao NaCl. O citrato de sódio utilizado neste trabalho tem maior solubilidade em água (720 g/L a 25 °C) facilitando o processo de lixiviação, entretanto a sua decomposição térmica ocorre em 230 °C (Merck, 2005), representando uma limitação quanto ao uso de elevadas temperaturas de processamento.

4.2 Variação de massa

Através de vários tipos de processamento, a variação da massa é comumente utilizada na caracterização da degradação de polímeros bioreabsorvíveis (Mikos *et al.*, 1993a; Lu *et al.*, 2000b e Hedberg *et al.*, 2005). O gráfico da massa normalizada em função do tempo de imersão em água destilada (Fig. 12) mostra que a imersão em água das amostras densas de PCL e PLGA50 não varia a massa no período estudado.

Conforme descrito na Revisão da Literatura, durante o processo de degradação a variação de massa das amostras de polímeros bioreabsorvíveis é precedida por modificações na massa

molar e propriedades mecânicas. Nossos resultados podem sugerir que a degradação, caso tenha ocorrido, não foi suficiente para modificar a massa das amostras. Pelos cálculos estabelecidos pela Eq. 8, durante 30 horas de imersão em água, a penetração da água por difusão foi superficial nas amostras.

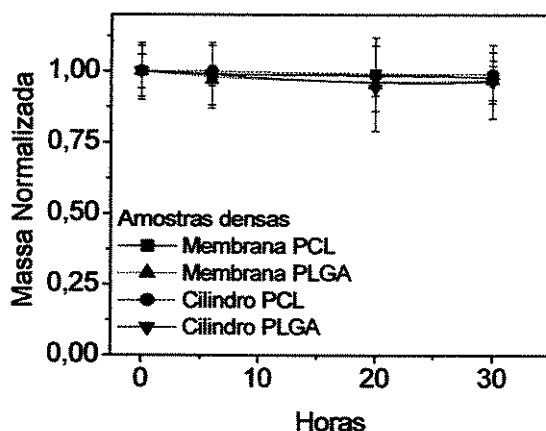


Figura 12 – Variação da massa normalizada de amostras de PCL e PLGA50 em função do tempo de imersão em água destilada.

4.3 Microscopia

A caracterização morfológica das amostras de PCL e PLGA50 foi realizada por microscopia eletrônica de varredura, observando-se a morfologia da superfície superior e da superfície da fratura das amostras.

A análise das micrografias de membranas preparadas sem a adição de sal indica amostras com morfologia densa e compacta. Amostras de PCL possuem superfície superior irregular caracterizada pela presença de aglomerados do material que geram concavidades entre seus contatos (Fig. 13A). A análise da superfície da fratura (Fig. 13B) confirma as concavidades na superfície, entretanto o material é internamente denso e compacto. Em contraposição às amostras de PCL, membranas densas de PLGA50 são compactas, planas e mais regulares na sua espessura (Fig. 13C). Não foram observadas mudanças na morfologia das amostras após 30 horas de imersão em água destilada (micrografias não apresentadas).

Membranas de PCL e PLGA50 preparadas com adição de sal, e posterior lixiviação durante 30 horas possuem morfologia porosa, apresentando superfície superior irregular com concavidades geradas pelo encapsulamento das partículas de sal durante o processo de evaporação do solvente. Os poros são abertos e indicam a penetração da água no processo de dissociação e retirada do sal (Fig. 13D e 13E). Não foram observadas partículas de sal na análise da superfície da fratura das amostras de membranas (micrografias não apresentadas), indicando a interconexão de poros em toda a espessura do material. Morfologicamente, não se observou diferença significativa entre a morfologia das membranas preparadas com PCL e PLGA50.

Membranas com morfologias similares foram obtidas por Tang *et al.* (2004) pelo processo de evaporação do solvente. Segundo os autores, a morfologia final das membranas depende da polaridade do solvente, das condições de evaporação do solvente, do grau de cristalinidade do material e da solubilidade do polímero no solvente utilizado.

Conforme observado pela Fig. 13A, a superfície das amostras densas de PCL possui aglomerados em toda a extensão do material, sugerindo uma organização cristalina formada por esferulitos. No intuito de confirmar a observação, foram realizadas análises de microscopia ótica com luz polarizada. Experimentalmente, as regiões cristalinas esferulíticas podem ser observadas pela técnica de microscopia ótica, no qual, as cadeias dispostas radialmente desviam o plano da luz polarizada produzindo uma figura na forma de uma “cruz de malta”. A Fig. 14A mostra o contorno dos domínios cristalinos do material, observados em maior aumento na Fig. 14B. A literatura (Tsuji *et al.*, 2000) descreve que o processo de evaporação do solvente é suficientemente lento para a formação de esferulitos de forma semelhante à observada em nosso experimento.

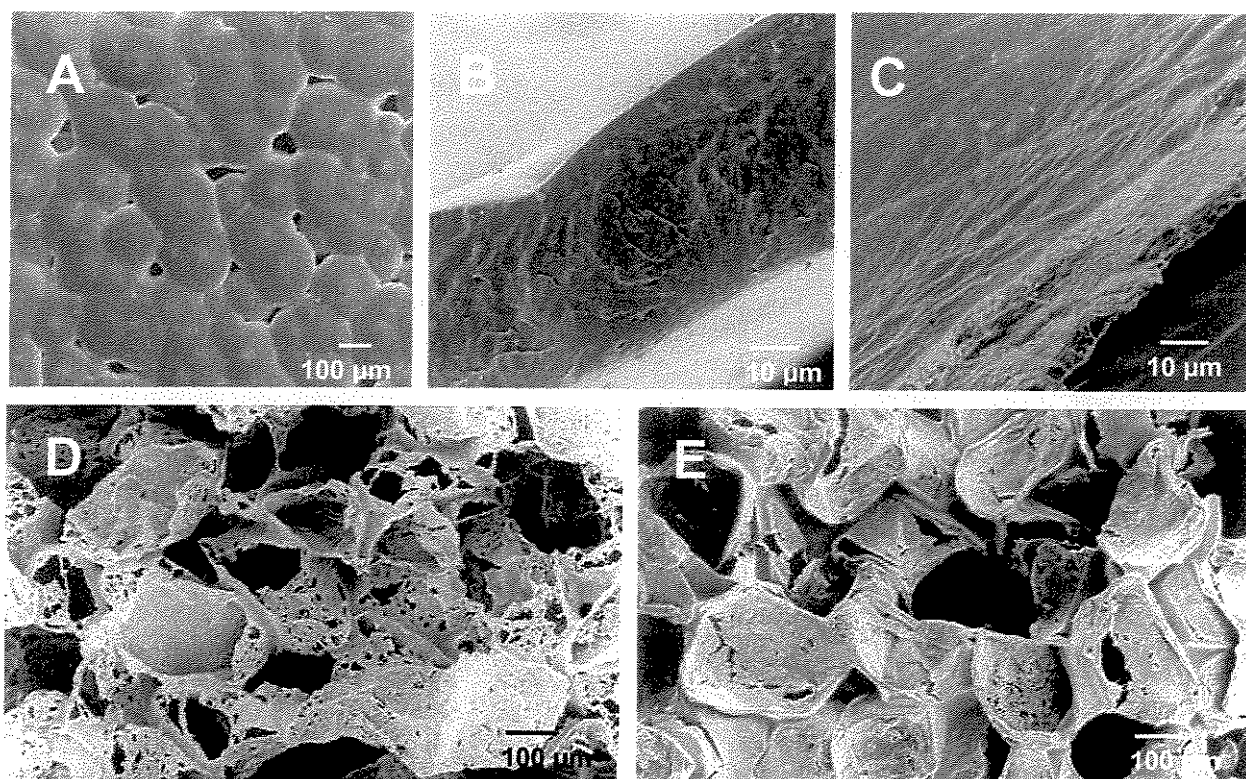


Figura 13 – Micrografias eletrônicas de varredura de PCL e PLGA50 preparadas pelo processo de evaporação do solvente. (A) e (B) membrana densa PCL (C) membrana densa PLGA50 (D) membrana porosa PCL (E) membrana porosa PLGA50.

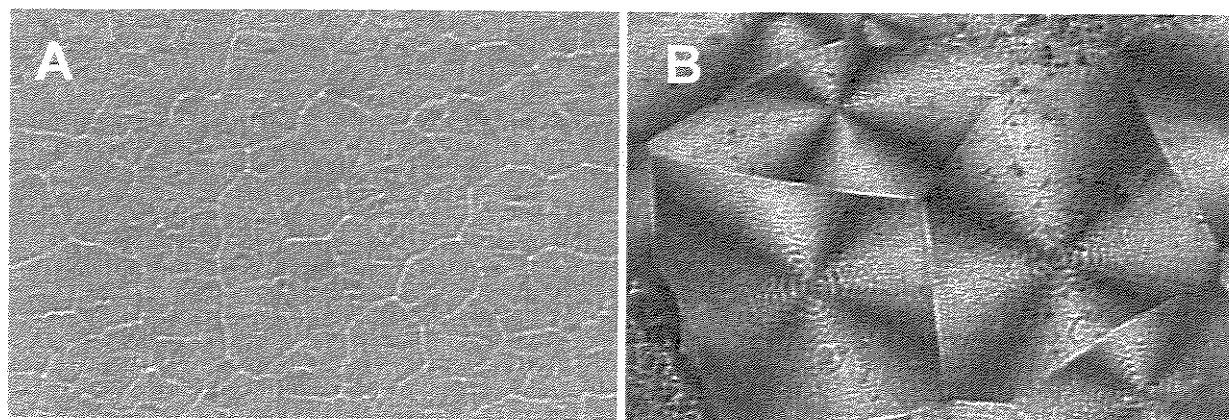


Figura 14 – Micrografias óticas com luz polarizada de amostras de PCL. (A) x50 (B) x100.

Amostras preparadas pelo processo de fusão (Fig. 15) indicam morfologias semelhantes entre si. A análise das micrografias de PCL (Fig. 15A) e PLGA50 (Fig. 15B) mostra que amostras preparadas sem a adição de sal possuem uma estrutura densa, com superfície externa e superfície da fratura lisa, sem poros, devido ao contato com a superfície do molde.

Amostras preparadas com adição de sal seguido de lixiviação, são porosas, irregulares, com concavidades geradas pelo encapsulamento das partículas de sal durante o processo de fusão. A superfície externa das amostras apresentou regiões de interconexão entre a superfície e o interior do material. Comparando-se as amostras porosas de PCL (Fig. 15C – aumento em 15D) e PLGA50 (Fig. 15E) e não é possível determinar diferenças significativas entre a morfologia dos suportes. As amostras submetidas a imersão em 30 horas não apresentaram mudanças na morfologia (micrografias não apresentadas).

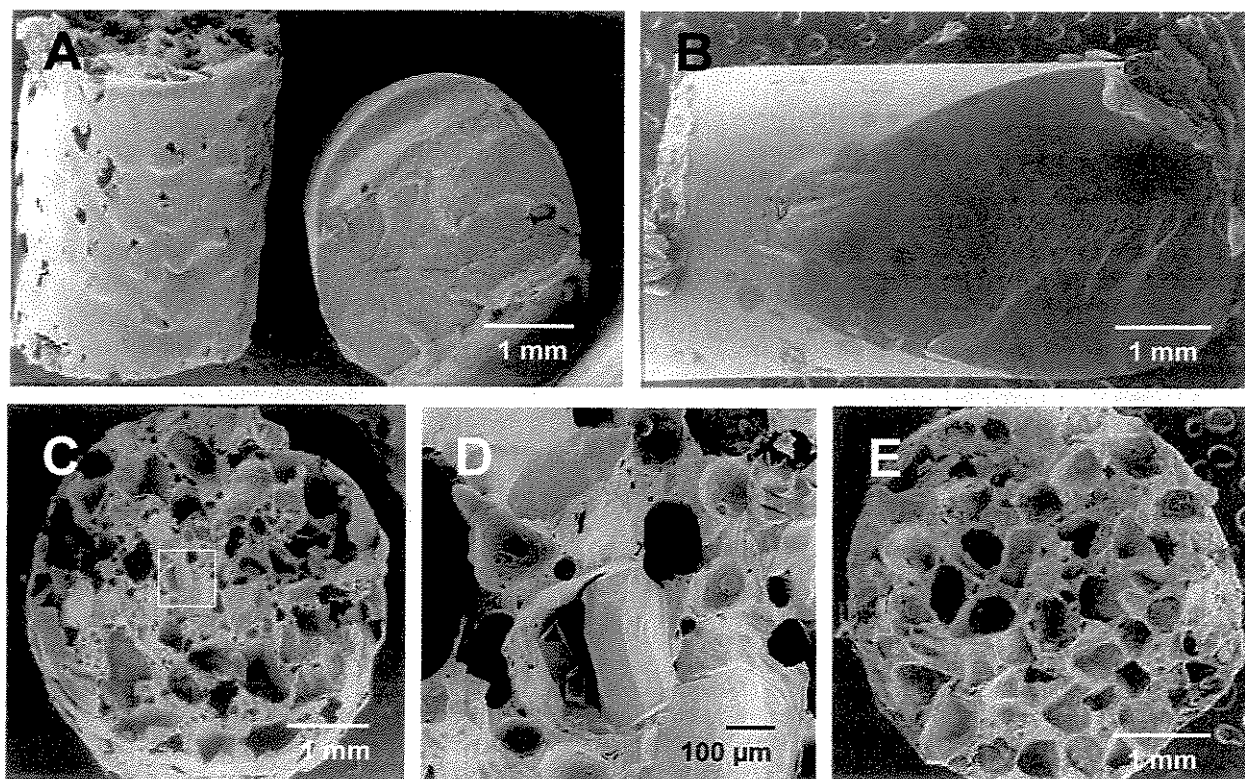


Figura 15 – Micrografias eletrônicas de varredura de PCL e PLGA50 preparadas pelo processo de fusão. (A) suporte denso e poroso de PCL (B) suporte denso de PLGA50 (C) e (D) suporte poroso de PCL (E) suporte poroso de PLGA50.

As micrografias apresentadas refletem um comportamento médio dos suportes preparados, divulgando-se apenas as que melhor indicaram os resultados. Em algumas amostras porosas de PCL foi possível verificar a presença de partículas salinas no interior, conforme observado pela Fig. 15D. A partícula de sal está incrustada na massa polimérica, confrontando nossas conclusões a respeito do uso do pH da solução de imersão como único método de determinação da retirada do sal. A inspeção por microscopia mostra-se útil e fundamental para a avaliação da total retirada do sal dos suportes poliméricos. A presença de sal sugere que o tempo de lixiviação foi insuficiente, sendo necessário promover modificações no tempo de imersão, e/ou na quantidade de sal utilizada (aumentando a interconexão dos poros), e/ou na geometria do suporte (diminuindo a sua espessura).

O aumento no tempo de imersão dos suportes porosos deve ser alterado com cautela. Materiais com baixo tempo de degradação como copolímeros PLGA ou dos enantiômeros do ácido láctico (PDLLA), podem sofrer acentuada degradação neste período (Li, 1999a). Neste trabalho, o processo de lixiviação é proposto como um método para criar suportes porosos sem promover a degradação do material.

A quantidade de sal utilizada no preparo dos suportes é descrita como um fator determinante na porosidade desses materiais, pois o aumento permite maior contato entre as partículas salinas, permitindo a dissolução contínua da substância. Murphy *et al.* (2002) propuseram a fusão do sal como um novo método para garantir a interconexão dos poros. A interconexão dos poros é fundamental nas aplicações da engenharia de tecidos, pois, além de permitir uma adequada difusão do meio no suporte, ela facilita a formação dos tecidos na forma de uma rede organizada (Guan *et al.*, 2005).

Em se tratando de aplicações como suportes para cultura de células e crescimento tecidual, a caracterização morfológica dos poros é fundamental. Segundo Mikos *et al.* (1993a), a taxa de penetração e o crescimento celular são diretamente proporcionais à porosidade do material. Nas amostras obtidas pelos processos de evaporação do solvente e fusão, o tamanho e a distribuição do tamanho dos poros foram avaliados pelo programa de análise de imagens, conforme descrito no capítulo 3.

A Tab. 3 mostra dados obtidos pelas análises das micrografias de amostras densas e porosas, feitas em relação à regularidade da espessura das membranas e do diâmetro dos suportes cilíndricos, atribuindo-se valores qualitativos (baixo, médio e alto). Amostras densas mostraram pequenas variações de espessura/diâmetro, sendo a maior estabilidade observada nas amostras de PLGA50. Amostras porosas processadas por fusão apresentaram maior estabilidade quando comparadas às amostras preparadas pela evaporação do solvente. Membranas porosas de PCL e PLGA50 mostraram irregularidades na sua espessura.

Tabela 3 – Tamanho de poros e regularidade dimensional de amostras de PCL e PLGA50 preparadas por evaporação do solvente e fusão.

		Evaporação do solvente		Fusão	
		Denso	Poroso	Denso	Poroso
PCL	Regularidade dimensional	++	+	+++	++
	Porosidade (%)	–	85 – 95	–	60 – 75
	Poros ($\mu\text{m} \pm \mu\text{m}$)	–	360 ± 80	–	195 ± 110
PLGA50	Regularidade dimensional	+++	+	+++	++
	Porosidade (%)	–	85 – 95	–	65 – 80
	Poros ($\mu\text{m} \pm \mu\text{m}$)	–	375 ± 65	–	220 ± 60

(+) baixo, (++) médio, (+++) alto, (–) não observado

Pelo programa de análise de imagens foi possível estimar a porosidade das amostras através da proporção das áreas dos poros. Os suportes descritos pela literatura apresentam porosidades variadas e são dependentes da técnica de processamento. Amostras preparadas pelo processo de evaporação do solvente com inclusão de sal permitem produzir porosidade superior a 87 %, semelhantes às obtidas em nosso experimento (Mikos *et al.*, 2000). Num estudo com PLGA50 e tamanho de partículas de NaCl entre 250 e 350 μm , Agrawal *et al.* (2000) estabelecem uma relação proporcional entre a quantidade de sal adicionada (concentração) e a porosidade: usando razões de 3,5/1 (sal/polímero) (m/m), 7/1 e 14/1, a porosidade aumenta em aproximadamente 5 % na faixa entre 80 e 95 %.

Membranas de PCL e PLGA50 apresentaram porosidade maior quando comparadas aos suportes preparados por fusão devido à concentração de sal utilizada no preparo das amostras (maior no preparo das membranas). A técnica é qualitativa e a variação das porcentagens varia de acordo com a área analisada. Outros métodos para a determinação da porosidade têm sido

propostos, como a análise por porosímetro de mercúrio, entretanto os erros decorrentes da flexibilidade das amostras são freqüentes (Hedberg *et al.*, 2005).

O tamanho dos poros e a distribuição do tamanho dos poros também são variáveis fundamentais na caracterização dos suportes com aplicações na engenharia de tecidos. A distribuição dos tamanhos dos poros foi considerada homogênea para ambas as técnicas de preparo das amostras. A Fig. 16 mostra a média do tamanho dos poros obtida pela análise das micrografias eletrônicas. Os resultados estatísticos mostraram que não há diferenças significativas no tamanho dos poros em amostras de polímeros diferentes, preparadas pela mesma técnica, entretanto foi considerado estatisticamente diferente entre os suportes preparados por evaporação do solvente e fusão ($F = 11,89085$, $p = 0,00000150054$). Os valores, quando comparados ao tamanho das partículas de sal utilizado (180–250 μm), são maiores nas membranas e dentro da faixa esperada para amostras preparadas por fusão.

Um aumento no tamanho dos poros em comparação ao tamanho das partículas confirma a interconexão observada pelas micrografias da Fig. 13. Apesar de abaixo dos valores das membranas porosas, o tamanho dos poros nas amostras preparadas por fusão estão dentro da faixa esperada, corroborando com os menores valores de porosidade. A diminuição do tamanho dos poros entre as técnicas também poderia ser atribuída às condições de processamento. Durante o processo de fusão, a porção salina é incorporada à massa polimérica e a mistura realizada manualmente na panela de fusão do equipamento, pode ter fragmentado as partículas.

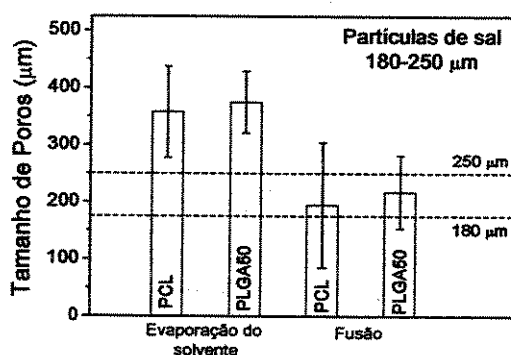


Figura 16 – Média do tamanho de poros para amostras de PCL e PLGA50 preparadas pelo processo de evaporação do solvente (*casting*) e fusão.

Na regeneração de tecidos, o tamanho do poro está relacionado com o tipo de célula que forma o tecido. Avaliados em estudos *in vitro* e *in vivo*, determinar a faixa “ótima” do tamanho do poro representa um importante enfoque das pesquisas em suportes sintéticos (Sarazin *et al.*, 2004). O crescimento de fibroblasto tem sido relacionado em suportes com tamanho de poros entre 5 e 15 μm (Wang *et al.*, 2001), o de hepatócitos em aproximadamente 20 μm (Maquet *et al.*, 1997), regeneração de pele entre 20 e 150 μm e neovascularização em 5 μm (Atala, 2004). Na reconstrução de tecidos ósseos o tamanho dos poros varia de acordo com o estudo e o material, entretanto a faixa preferencial varia entre 100 e 400 μm (Whang *et al.*, 1995 e Sarazin *et al.*, 2004). Estudos em implantes em osso de coelho, mostraram crescimento satisfatório em suportes porosos de titânio com poros de 100 μm de tamanho (Itälä *et al.*, 2001). A técnica de adição de sal e posterior lixiviação mostrou-se eficiente no preparo de suportes porosos de PLLA e PLGA (50/50) com poros menores que 45 μm , entre 180 e 250 μm e entre 250 e 350 μm (Barbanti *et al.*, 2002).

Em relação à morfologia do poro, a geometria pode ser alterada variando-se o tipo de sal adicionado. Apesar do citrato de sódio apresentar sistema cristalino romboédrico, não foram observadas diferenças morfológicas significativas na geometria do poro quando comparadas às amostras preparadas por técnicas similares com NaCl (sistema cristalino cúbico) (Barbanti *et al.*, 2004c).

4.4 Calorimetria diferencial de varredura

As amostras foram avaliadas pela técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (também denominada Calorimetria Exploratória Diferencial) (DSC). A técnica é útil para 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_m).

As análises de DSC para as amostras de PCL são características de um polímero semicristalino (Fig. 17). Os resultados mostram que os picos de fusão (T_m) variam entre 62 a 65 $^{\circ}\text{C}$ (no primeiro e segundo aquecimento) e temperatura de transição vítrea (T_g) em torno de -63

°C (obtidas no segundo aquecimento) (Tab. 4). Por outro lado, termogramas referentes às amostras de PLGA50 são típicos de materiais amorfos, identificado pela presença de T_g (com valores entre 39 e 44 °C obtidas no segundo aquecimento) e pela ausência de T_m (Fig. 17).

Outro dado fornecido pela técnica de DSC é a variação da entalpia das amostras, podendo ser relacionada com o grau de cristalinidade do material, conforme a relação apresentada no capítulo 3. Os dados obtidos dos termogramas mostraram que as amostras de PCL variaram entre 40 e 60 % de grau de cristalinidade, sem diferenças significativas entre amostras densas e porosas no primeiro aquecimento e no segundo aquecimento.

Comparando-se valores de DSC de amostras não processadas e densas (sejam obtidas pela evaporação do solvente ou por fusão) não ocorreram diferenças significativas nas variáveis analisadas pela técnica.

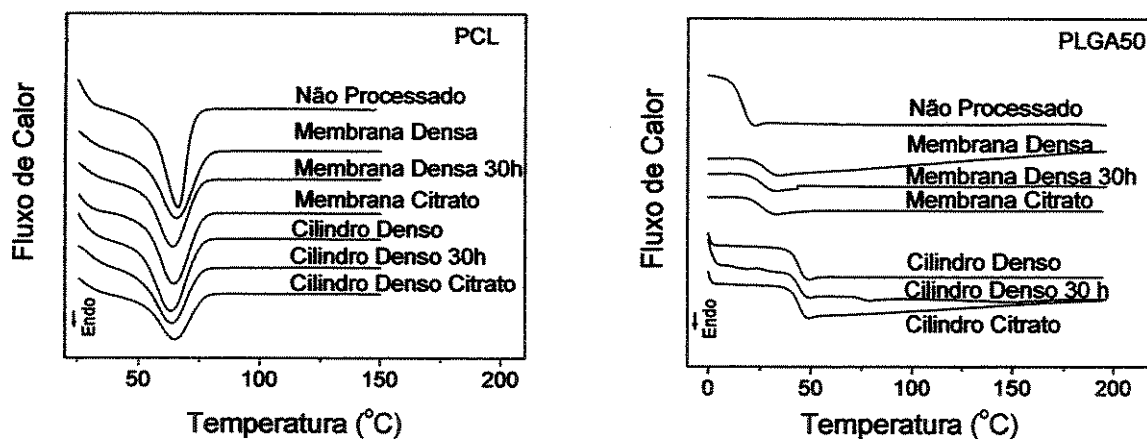


Figura 17 – Termogramas de DSC no estudo da lixiviação do sal em amostras de PCL (primeiro aquecimento) e PLGA50 (segundo aquecimento).

A comparação entre as amostras densas e porosas obtidas pela mesma técnica de preparo (evaporação do solvente ou fusão) mostra também não haver diferenças nas propriedades térmicas do material pela inclusão de sal. Os dados da literatura mostram resultados semelhantes entre suportes de PLA e PLGA. Estudos com suportes de PLGA (50/50) e PLA, preparados pelo processo de evaporação do solvente, mostraram que a inclusão de sal e posterior retirada por

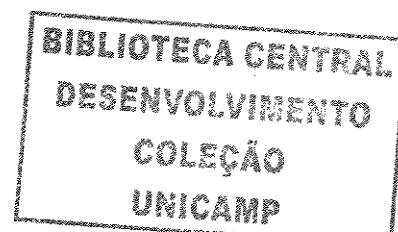
lixiviação não altera as temperaturas de transição vítrea, de fusão e o grau de cristalinidade do material (Lu *et al.*, 2000a; Lu *et al.*, 2000b e Barbanti *et al.*, 2004a).

Tabela 4 – Dados de DSC para amostras de PCL e PLGA50 em função do tempo de imersão em água destilada. (Tg) temperatura de transição vítrea, (Tm) temperatura de fusão, (ΔH_m) variação da entalpia de fusão.

	Tg ⁽²⁾ (°C)	Tm ⁽¹⁾ (°C)	ΔH_m ⁽¹⁾ (J/g)	Grau de Cristalinidade ⁽¹⁾	
PCL	Não Processado	-64	65	80	58%
	Membrana Densa	-66	65	85	61%
	Membrana Densa (30 h)	-65	64	86	62%
	Membrana Porosa	-64	64	83	60%
	Cilindro Denso	-64	62	72	49%
	Cilindro Denso (30 h)	-64	63	58	42%
	Cilindro Poroso	-63	63	63	45%
PLGA50	Não Processado	39			
	Membrana Densa	40			
	Membrana Densa (30 h)	39			
	Membrana Porosa	41		Amorfo	
	Cilindro Denso	44			
	Cilindro Denso (30 h)	43			
	Cilindro Poroso	44			

(1) 1º aquecimento; (2) 2º aquecimento.

O grau de cristalinidade das amostras preparadas por evaporação do solvente mostraram serem maiores quando comparados aos obtidos na técnica de fusão. A diferença de valores pode ser atribuída à velocidade do processo de evaporação do solvente ou resfriamento. De forma geral, processos lentos de resfriamento ou evaporação do solvente, além de permitirem a nucleação e formação de domínios cristalinos no material, interferem na qualidade dos cristais formados (Yuan *et al.*, 2003 e Tang *et al.*, 2004). O tempo de evaporação do solvente (aproximadamente 24 h) comparado ao resfriamento das amostras preparadas por fusão (aproximadamente 5 minutos) permitiu que o número e o tamanho dos cristais formados influíssem na porcentagem do grau de cristalinidade do material.



4.5 Análises termogravimétricas

A análise de TGA nos forneceu dados relativos à temperatura de início da perda de massa pela degradação térmica (*Tonset*). Nos estudos de degradação *in vitro* e na cultura de células a temperatura é intencionalmente constante e mantida em aproximadamente 37 °C. Entretanto, a degradação térmica nos auxilia como uma medida indireta da degradação e, também como parâmetro de influência durante o processamento por fusão do material (Ishida *et al.*, 2001).

A Fig. 18 mostra as curvas de TGA obtidas para amostras densas (com 0 e 30 h de imersão em água destilada) e porosas obtidas pelo método de fusão. Amostras de PCL (*Tonset* médio = 390 °C) são relativamente mais estáveis quando comparadas às de PLGA50 (*Tonset* médio = 330 °C). Pode-se observar pela concordância das curvas entre as amostras densas e porosas que a inclusão do citrato durante o processo de fusão, e posterior lixiviação, não mostrou diferenças na análise de TGA.

O tempo de permanência (2 a 3 min) na panela de aquecimento, durante o processo de fusão, sugere que uma análise da cinética de degradação por isoterma seria útil para avaliar se o material sofre degradação significativa. Entretanto, a literatura não relata a degradação de polímeros como PCL e PLGA (50/50) na temperatura de processamento (160 °C) durante pequenos períodos de exposição (Aoyagi *et al.*, 2002).

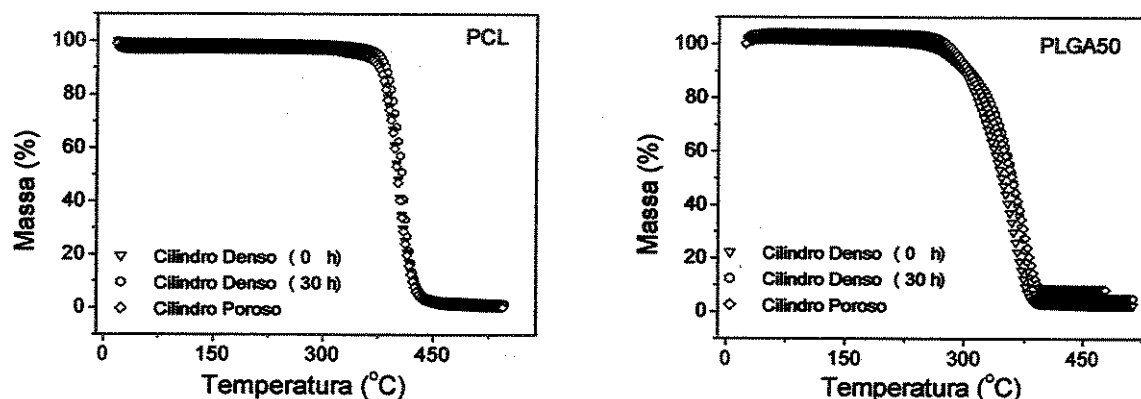


Figura 18 – Análises termogravimétricas de amostras de PCL e PLGA50 no estudo da lixiviação do sal.

4.6 Conclusões parciais

Neste capítulo foram apresentados dois métodos de preparo de suportes densos e porosos de PCL e PLGA50: a evaporação do solvente e a fusão. A análise de pH na imersão mostrou variação durante a dissociação do citrato e equivalência ao pH da água destilada após 30 horas de imersão. Não foi possível observar variação de massa durante o período analisado. A análise por MEV, DSC e TGA mostrou suportes com morfologias diferentes e propriedades térmicas semelhantes, sendo que o tempo de imersão em água para a retirada do sal não foi suficiente para alterar a morfologia e as propriedades térmicas das amostras. As diferenças morfológicas e térmicas foram encontradas na comparação entre os métodos de preparo das amostras.

As técnicas de preparo de suportes de polímeros bioreabsorvíveis apresentaram materiais com características diferentes, com vantagens e desvantagens inerentes a cada processamento. A evaporação do solvente tem-se mostrado útil na confecção de materiais altamente porosos, normalmente com porosidade superior a 90 – 95 % e com tamanho de poro variando entre 17 μm a 2,2 mm (Sarazin *et al.*, 2004). A técnica não permite boa reprodutibilidade e a estabilidade dimensional é baixa, restringindo seu uso na forma de membranas ou filmes, e em aplicações em que há a necessidade de geometrias mais complexas. Adicionalmente, o uso de solventes orgânicos como o clorofórmio e cloreto de metileno demonstram ser também um fator de desvantagem. O material pode incorporar resíduos desses solventes que influenciarão de forma deletéria na cultura celular e/ou implante (Harris *et al.*, 1998).

Desenvolvida nos últimos anos, a técnica de preparo por fusão com adição de sal é apresentada como alternativa no preparado dos suportes porosos de polímeros bioreabsorvíveis. Os suportes podem ser moldados em geometrias mais complexas, com boa estabilidade dimensional, e sem o uso de solventes orgânicos (Widmer *et al.*, 1998 e Kweon *et al.*, 2003). Nessa etapa do trabalho, a técnica da fusão com adição de sal apresentou uma limitação em relação à presença de partículas de sal no seu interior, podendo ser superada por mudanças na geometria do molde de processamento. A técnica mostra ser simples, reprodutível e de baixo custo, podendo ser útil no preparo de suportes para uso na engenharia de tecidos. Assim, nossos estudos prosseguem para a avaliação da degradação *in vitro* desses materiais.

Capítulo 5

Degradação *in vitro* em tampão fosfato

A degradação *in vitro* dos suportes de polímeros bioreabsorvíveis representa uma etapa básica e fundamental para o preparo de suportes adequados às aplicações. As condições do ensaio podem ser controladas, os custos reduzidos e, os produtos e subprodutos de degradação, mensurados de maneira precisa (Luciano *et al.*, 2003).

Aplicados aos polímeros bioreabsorvíveis os ensaios são, na grande maioria, feitos em solução tampão fosfato, pH 7,4, simulando as condições de osmolaridade e pH fisiológico. No plasma sanguíneo, os valores do pH podem variar de 7,37 a 7,42 no sangue arterial (média de 7,4) e 7,37 no sangue venoso. No organismo, o líquido extracelular é normalmente mantido em pH 7,4 e os mecanismos que mantêm esse valor constante incluem o tamponamento e as compensações respiratória e renal.

Os principais tampões extracelulares são o bicarbonato e o fosfato, sendo o tampão de bicarbonato utilizado como primeira linha de defesa quando ocorrem distúrbios na concentração de íons H^+ . Já nos líquidos intracelulares, o pH é mantido em aproximadamente 7,1 e o tamponamento ocorre pelos fosfatos orgânicos, como o tri, di e monofosfato de adenosina (ATP, ADP e AMP, respectivamente) (Costanzo, 1998).

A curva sigmóide de titulação do fosfato (pK 6,8) pode ser comparada à do bicarbonato (pK 6,1). No seu trecho linear, os valores de pH estão compreendidos entre o pH 5,1 até o pH 7,1 no tampão bicarbonato, e entre pH 5,8 até o pH 7,8 no tampão fosfato. Apesar dos valores do

tampão de bicarbonato ficarem fora da faixa de tamponamento para o pH 7,4, ele é considerado o tampão fisiológico mais eficiente, pois o CO₂, volátil, pode ser expirado pelos pulmões. Apesar de mais eficiente, os ensaios *in vitro* são dimensionados de maneira que o sistema seja fechado, assim o uso do tampão fosfato torna-se preferencial. Outra justificativa para o uso do tampão fosfato são os extensos dados da literatura, que podem ser utilizados comparativamente aos obtidos pelo experimento apresentado neste trabalho.

Conforme descrito ao final do capítulo anterior, o preparado de suportes porosos pela técnica de fusão com adição e lixiviação do sal tem-se mostrado útil na confecção de suportes para a engenharia de tecidos. Entretanto, a remanescência do sal no interior das amostras cria a necessidade de uma nova geometria, que permita a sua completa retirada pelo processo de lixiviação. Com o uso de um novo molde, a inclusão de uma haste central permite obter amostras com espessura de parede adequada à completa lixiviação. A seguir são apresentados os dados de caracterização do novo suporte e da sua degradação *in vitro* em meio de tampão fosfato, pH 7,4.

5.1 Microscopia eletrônica de varredura

Na análise de microscopia eletrônica de varredura foram observadas as superfícies externa, interna e a superfície da fratura das amostras, em cortes longitudinais e transversais. Os dados apresentados refletem um comportamento médio, divulgando-se apenas as imagens que melhor indicaram esse resultado. A barra de escala é apresentada em cada micrografia.

As micrografias da Fig. 19 mostram o aspecto morfológico de amostras de PCL preparadas com e sem a adição de sal, antes e após a degradação *in vitro* em tampão fosfato. A análise das amostras densas e porosas não degradadas (Fig. 19A e 19E) mostra que a presença da haste central no molde permite o preparado de amostras com geometria tubular. As amostras densas não degradadas mostraram-se com superfície interna e externa regular e lisa, sem a existência de poros, devido ao contato do material com as superfícies do molde. A análise da superfície da fratura (Fig. 19A) confirma um suporte internamente denso e compacto. As irregularidades presentes na amostra devem-se ao aprisionamento de bolhas de ar durante o processo manual de injeção.

A Fig. 19E corresponde à amostra de PCL preparada com a adição de sal. O material não degradado mostra morfologia da superfície externa semelhante às amostras densas: lisa e compacta devido ao contato do material com a superfície do molde. A superfície interna, em contato com a haste central do molde, mostra regiões de interconexão entre as superfícies. Observando-se a superfície da fratura das amostras verifica-se que a morfologia do material é irregular, com concavidades geradas pelo encapsulamento das partículas de sal durante o processo de fusão, apresentando abertura nos poros que indicam a região de penetração da água no processo de dissociação e retirada do sal adicionado.

Durante o processo de degradação em tampão fosfato, os suportes de PCL mostraram-se morfologicamente estáveis nas 52 semanas de degradação *in vitro*. Em ambas as morfologias, densas e porosas, o material permanece com sua geometria tubular inicial. Após 32 semanas de imersão, os suportes densos apresentaram um “inchaço” superficial, denotado pela micrografia C da Fig. 19. Com 52 semanas de degradação, amostras densas apresentaram uma superfície erodida na observação em grandes aumentos (Fig. 19D). Os suportes porosos de PCL não alteraram significativamente sua morfologia durante o período de degradação (Fig. 19F a 19H). Foi possível observar em diferentes grupos de amostras (Fig. 19F e 19G) uma maior interconexão entre a superfície interna e o interior do suporte, entretanto não estão sendo atribuídas ao processo de degradação.

Para amostras de PLGA50 não degradadas, a geometria dos suportes apresentou-se semelhante às de PCL. Suportes preparados sem a adição de sal são lisos e compactos, com uma morfologia densa (Fig 20A). As superfícies externa, interna e da fratura da amostra confirmam a compactação do material, sem poros no interior. Os suportes porosos (Fig. 20E) preparados com a adição de sal mostram, qualitativamente, morfologia semelhante às amostras porosas de PCL para tempo zero de degradação. As superfícies interna e externa são regulares, entretanto apresentam regiões de interconexão entre a superfície e o interior do material.

Durante o processo de degradação, a morfologia das amostras de PLGA50 modifica-se de maneira gradativa ao longo das 3 semanas de degradação. A avaliação dimensional apresentada adiante, mostra de maneira precisa os dados observados pelas Fig. 20B a 20D. Após 1 semana de

degradação, a superfície externa e da fratura da amostra densa (Fig. 20B) mostra uma modificação na sua geometria, com acentuada degradação da superfície externa. Com 2 semanas, o material apresenta deformações mais acentuadas na sua geometria. A superfície da fratura demonstra que o material permanece denso e compacto, entretanto com evidências de faixas circulares de maior degradação (Fig. 20C). Com 3 semanas, as amostras densas de PLGA50 perdem a geometria tubular, apresentando-se como um material viscoso à manipulação e como um filme plano à microscopia eletrônica de varredura.

Suportes porosos de PLGA50 também apresentaram modificações acentuadas da sua geometria no período de 3 semanas de degradação. Após uma semana imerso em banho com tampão fosfato, o suporte apresenta uma alteração na morfologia dos poros, mas mantém a geometria tubular e porosa inicial (Fig. 20F). As modificações acentuadas ocorrem após 2 semanas de degradação. Observa-se um colapso dos poros e o material mostra-se, pela Fig. 20G, aparentemente denso. Ao contrário das amostras densas, após 3 semanas de degradação *in vitro*, o processo de degradação é menos intenso. Os suportes ainda apresentam uma geometria tubular (Fig. 20H), apesar de suas dimensões estarem alteradas.

A comparação entre os suportes tubulares de PCL e PLGA50 indicam uma nítida e acentuada diferença entre as velocidades de degradação. Enquanto amostras de PLGA50 perdem sua geometria em 3 semanas, amostras de PCL permanecem estáveis morfologicamente por mais de 1 ano (52 semanas).

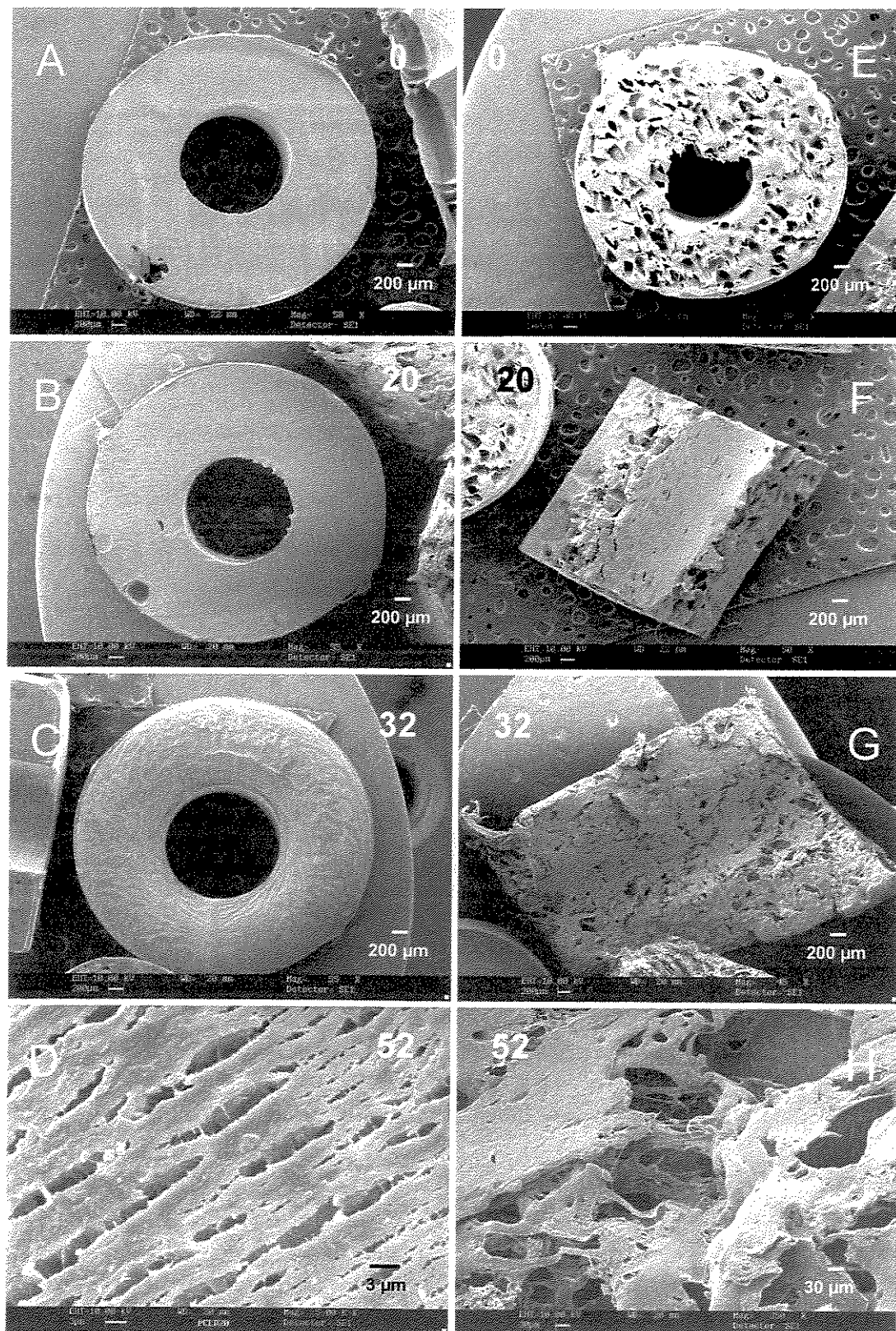


Figura 19 – Microscopia eletrônica de varredura de suportes tubulares de PCL preparados pela técnica de fusão. (A) a (D) denso; (E) a (H) poroso. Os números indicam o tempo em semanas.

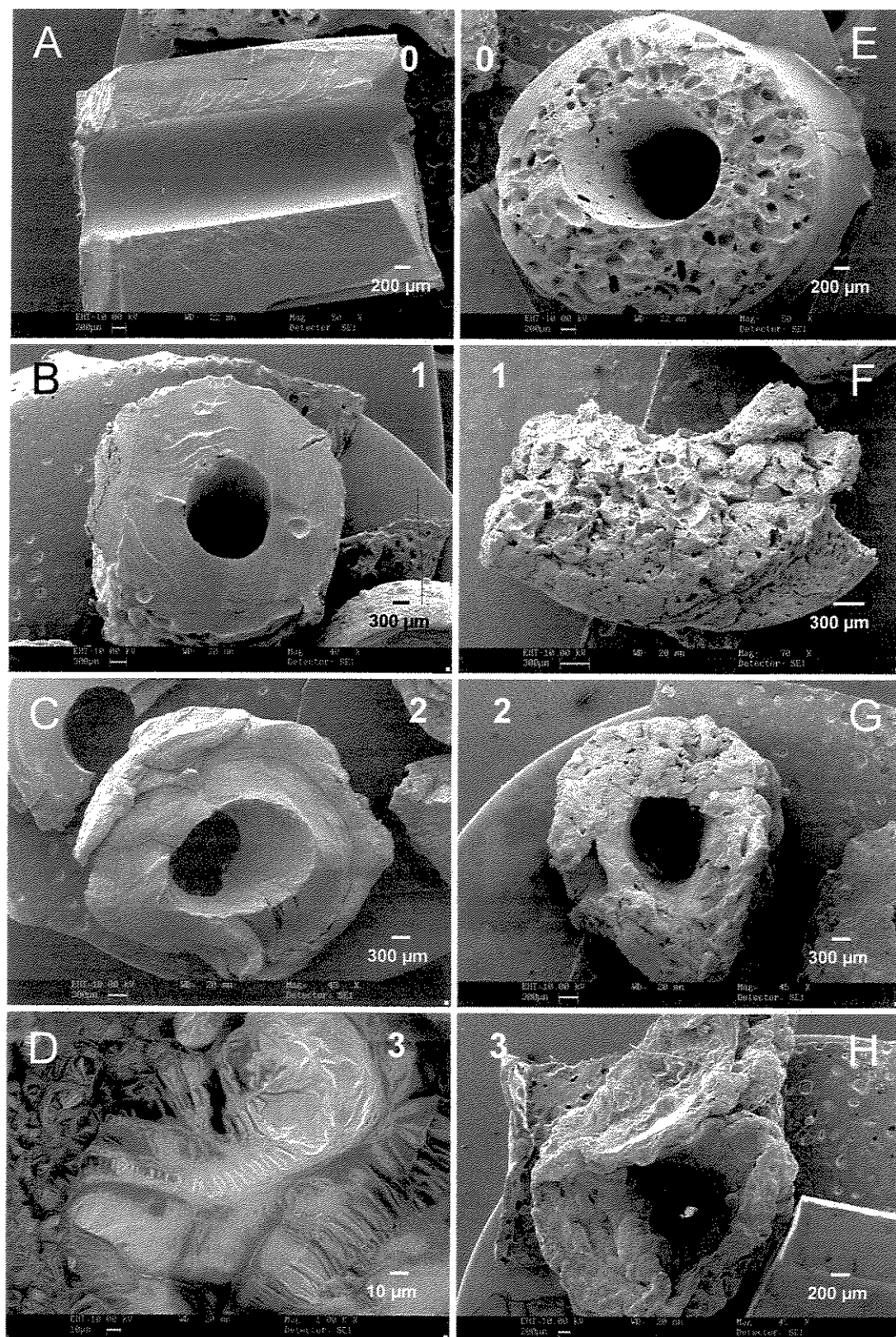


Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura de suportes tubulares de PLGA50 preparados pela técnica de fusão. (A) a (D) denso; (E) a (H) poroso. Números indicam o tempo em semanas.

Diversos fatores influem na velocidade de degradação dos suportes de polímeros bioreabsorvíveis, entre eles a composição química, cristalinidade, geometria e morfologia do material, energia de superfície e outros parâmetros (Li *et al.*, 1999b e Fang *et al.*, 2005). Os fatores estão inter-relacionados e tratá-los separadamente representa uma simplificação do processo de degradação.

Numa primeira análise, a diferença na velocidade de degradação é atribuída ao tipo de material e sua composição química (Tab. 1). A taxa de hidrólise, e conseqüente perda de massa num estágio mais avançado da degradação, é diretamente proporcional à concentração de ligações ésteres da cadeia polimérica (maior nas cadeias de PLGA50 quando comparadas às cadeias de PCL).

A degradação também é influenciada pela morfologia das amostras. A comparação entre as morfologias densas e porosas de PLGA50 exemplifica o efeito autocatalítico dos poli(α -hidróxi ácidos). Quanto maior a área de difusão dos produtos de degradação, menor o efeito da concentração dos produtos ácidos e, conseqüentemente, menor a degradação observada pela microscopia. Assim, suportes tubulares de PLGA50 tiveram um comportamento de acordo com o descrito na literatura (Li *et al.*, 1999a), no qual amostras densas sofrem degradação mais acentuada quando comparadas aos seus análogos porosos. Os poros dos suportes tubulares preparados com adição e lixiviação do sal são gradativamente achatados, tornando a morfologia das amostras porosas com 2 semanas de degradação semelhante às amostras densas no mesmo período.

As amostras de PCL também sugerem um comportamento diferenciado entre amostras densas e porosas. Após 52 semanas imersas em tampão fosfato, amostras densas mostraram poros na superfície externa das amostras (Fig. 19D), não observado nas amostras porosas (Fig. 19H). Entretanto, não demonstraram nitidamente o efeito autocatalítico durante o processo de degradação. Apesar de uma diferença entre as amostras de PCL densas e porosas, o processo de degradação pode estar ocorrendo por perda de massa superficial, conforme ilustrado pela Fig. 4 do capítulo 2.

Num elegante estudo, Burkersroda *et al.* (2002), mostram que a diferenciação entre os processos de perda de massa é uma função das características dos polímeros, tais como o coeficiente de difusividade da água no material, da taxa de hidrólise das ligações ésteres, e também da geometria, morfologia e espessura do material, denominada, pelos autores, de “dimensão crítica” ($L_{crítico}$). Quando os suportes possuem dimensões abaixo de $L_{crítico}$, eles degradam através da perda de massa interna. Usando modelos teóricos de difusão e dados da literatura acerca de vários polímeros bioreabsorvíveis, os pesquisadores determinam valores de $L_{crítico}$ para os materiais usados em nosso experimento. Materiais baseados nos poli(α -hidróxi ácidos), tal como PLGA50, possuem $L_{crítico}$ de 7,4 cm e PCL de 1,3 cm. O modelo teórico de perda de massa superficial e interna proposto é validado por experimentos de degradação *in vitro* de amostras de PLA e PLGA em meios com pH fisiológico (7,4), alcalino (pH > 13) e ácido (pH 2).

As amostras de PCL obtidas em nosso experimento possuem espessura (1,3 mm para amostras densas) inferior ao valor de $L_{crítico}$ proposto (1,3 cm). Dessa forma, a degradação observada com 52 semanas pode ser atribuída ao início do processo de perda de massa interna, e as amostras, num estágio mais avançado de degradação, mostrarão um comportamento morfológico pela degradação interna preferencial em relação à externa. A avaliação das amostras porosas torna-se qualitativa quando se relaciona a espessura da parede do poro e o tipo de perda de massa. Apesar da espessura da parede dos poros ser menor que a espessura das amostras densas e que $L_{crítico}$, o efeito da difusão dos produtos de degradação no meio retardou o efeito autocatalítico no material. Estudos com 46 semanas de degradação *in vitro* em tampão fosfato (pH 7,4), com membranas porosas de PLLA, obtidas pelo processo de evaporação do solvente com adição e lixiviação de NaCl, mostraram que o efeito catalítico é observado em amostras com maior espessura da parede dos poros (Lu *et al.*, 2000a).

Na caracterização dos suportes porosos de polímeros bioreabsorvíveis, a avaliação da porosidade, o tamanho dos poros e sua distribuição são fundamentais. A relação entre esses parâmetros influencia não somente a velocidade de degradação do material, mas também o sucesso do implante. Caso o material degrade numa velocidade maior que a necessária, suas propriedades mecânicas ficam comprometidas, e tempos elevados de degradação podem causar

reações inflamatórias crônicas (Athanasiou *et al.*, 1996). Assim, de forma semelhante à descrita no capítulo anterior, os parâmetros, anteriormente citados, foram avaliados através do analisador de imagens.

A porosidade das amostras de PCL e PLGA50 apresentaram diferenças quanto ao tipo de material e durante a degradação em tampão fosfato (Tab. 5 e 6 adiante). Através da microscopia foi possível estabelecer uma relação entre a área dos poros e do material nos cortes transversais do material analisado. A porosidade das amostras foi calculada em 75 % para PCL e 80 % nas amostras de PLGA50. A diferença entre os tipos de polímero justifica-se pela proporção de citrato utilizada e a densidade dos materiais (menor no PCL). Durante o processo de degradação *in vitro* não foram observadas mudanças na porosidade das amostras de PCL. Amostras porosas de PLGA50 tiveram um decaimento da porosidade durante o processo de degradação devido a confluência dos poros.

O controle da porosidade dos suportes poliméricos pode ser feito pela variação do tamanho da partícula de sal e pela quantidade de sal utilizada. Widmer *et al.* (1998) obtiveram amostras de PLGA (75/15) e PLLA porosas de maneira semelhante às descritas neste trabalho, utilizando o processo de extrusão ao invés da injeção. Os autores avaliaram a variação do tamanho da partícula de sal (NaCl), a concentração de sal (entre 70 e 90 %) e a temperatura de extrusão (200 a 275 °C). Como conclusões do estudo, citam que a variação de temperatura de extrusão não tem efeitos significativos na porosidade até 250 °C, entretanto há uma diminuição da massa molar das amostras devido a degradação térmica. Para os autores, a concentração de sal é o parâmetro mais significativo quanto se avalia a porosidade da amostra. Quanto maior a concentração, mais poroso é o material. Aplicada aos suportes utilizados na engenharia de tecidos, a porosidade permite um fluxo de nutrientes e de produtos metabólicos através do suporte, auxiliando no processo de vascularização local, imprescindível para o crescimento tecidual (Sarazin *et al.*, 2004)

A Fig. 21 apresenta a faixa de tamanho de poros avaliados durante o processo de degradação. A média do tamanho dos poros variou no limite inferior da faixa de sal utilizada no

preparo dos suportes (180 a 250 μm). Mesmo quando observada a variação da faixa de tamanho de poros é possível notar poros com tamanhos menores que 180 μm .

Tabela 5 - Propriedades morfológicas de suportes tubulares densos e porosos de PCL preparados pela técnica de fusão durante a degradação em tampão fosfato.

Semanas		0	20	32	52
PCL Poroso	Distribuição Poros	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
	Tamanho de Poros ($\mu\text{m} \pm \mu\text{m}$)	182 ± 97	171 ± 91	174 ± 90	188 ± 103
	Porosidade (média)	75 %	75 %	75 %	75 %
	Espessura ($\text{mm} \pm \text{mm}$)	$1,29 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,02$	$1,29 \pm 0,01$	$1,30 \pm 0,02$
PCL Denso	Distribuição Poros	-	-	-	Superficial
	Tamanho de Poros (μm)	-	-	-	2 x 300
	Porosidade (média)	-	-	-	40 % ^a
	Espessura ($\text{mm} \pm \text{mm}$)	$1,29 \pm 0,03$	$1,30 \pm 0,01$	$1,31 \pm 0,04$	$1,30 \pm 0,02$

(-) não observado; (a) observado na superfície da amostra

Tabela 6 - Propriedades morfológicas de suportes tubulares densos e porosos de PLGA50 preparados pela técnica de fusão durante a degradação em tampão fosfato.

Semanas		0	1	2	3
PLGA50 Poroso	Distribuição Poros	Homogêneo	Homogêneo	Superficial	Superficial
	Tamanho de Poros ($\mu\text{m} \pm \mu\text{m}$)	234 ± 120	182 ± 93	11 ± 4	-
	Porosidade (média)	80 %	80 %	48 %	20 %
	Espessura ($\mu\text{m} \pm \mu\text{m}$)	$1,31 \pm 0,03$	$1,32 \pm 0,11$	$1,10 \pm 0,22$	0,12 a 1,4
PLGA50 Denso	Distribuição Poros	-	-	-	-
	Tamanho de Poros ($\mu\text{m} \pm \mu\text{m}$)	-	-	-	-
	Porosidade (média)	-	-	-	-
	Espessura ($\text{mm} \pm \text{mm}$)	$1,30 \pm 0,02$	$1,32 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,32$	-

(-) não observado

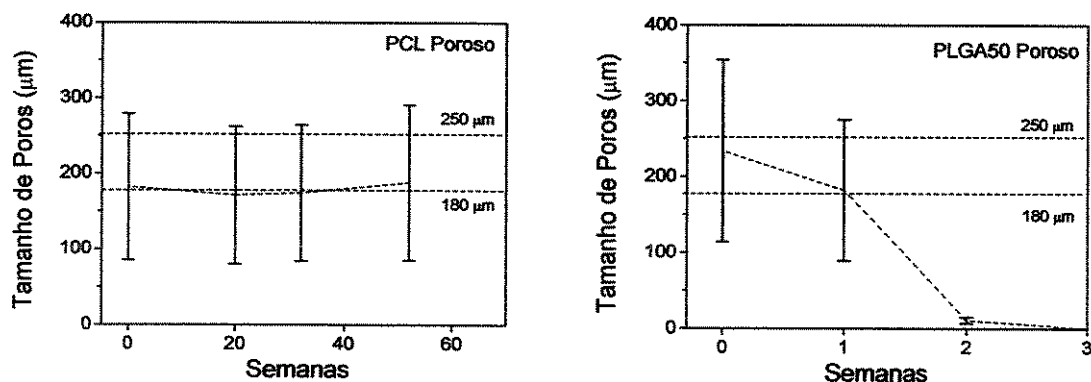


Figura 21 – Tamanho de poros (µm) das amostras de PCL e PLGA50 durante a degradação *in vitro* em tampão fosfato.

Os resultados da análise do tamanho dos poros sugerem que o processo de homogeneização do polímero fundido com o sal pode ter diminuído o tamanho das partículas. Os resultados estatísticos mostraram que não há diferenças significativas no tamanho dos poros durante o processo de degradação em tampão fosfato para amostras de PCL ($F = 10,00085$, $p = 0,00000133501$).

Em amostras de PLGA50 porosas, o valor do tamanho dos poros foi considerado estatisticamente diferente e maior quando comparado às amostras porosas de PCL ($F = 10,54977$, $p = 0,00000142889$). Observa-se para amostras não degradadas valores de tamanho de poros superiores ao tamanho de partículas de sal utilizado. Durante o processo de degradação o tamanho dos poros em amostras de PLGA50 diminui diretamente proporcional com o tempo de degradação (Fig. 21).

A literatura descreve que o tamanho de poros não tem influência na morfologia dos suportes durante o período de degradação *in vitro* (Barbanti *et al.*, 2002 e Lu *et al.*, 2000a). Entretanto, na cultura de células, o tamanho do poro é considerado como parâmetro fundamental na adesão e proliferação celular. Alguns tipos celulares demonstram serem menos suscetíveis às variações do tamanho do poro. Avaliados como suportes em cultura de células Vero, Santos *et al.* (2001a) relatam não haver diferença na adesão celular em membranas de PLLA preparadas com partículas de sal menores que 45 µm, entre 180 e 250 µm e entre 250 e 350 µm.

A distribuição do tamanho dos poros também é outro fator de interesse no preparo de suportes porosos para uso na engenharia de tecidos. Normalmente obtidos de maneira homogênea, a distribuição em porções do suporte pode ser útil em aplicações onde se requer uma fase densa, estrutural, e outra porosa, que permita a invasão do neotecido (Lam *et al.*, 1994 e Sundback *et al.*, 2003). Qualitativamente, a distribuição do tamanho dos poros nas amostras de PCL e PLGA50, antes e durante o processo de degradação, é considerada homogênea quando comparada à distribuição das amostras porosas de PCL (poros concentrados na porção interna do material).

Durante a microscopia foi possível também avaliar a espessura das amostras densas e porosas. A diferença entre o diâmetro interno e externo forneceu um valor de comparação entre as amostras durante o período de degradação. Observa-se pelas Tab. 5 e 6 que a estabilidade dimensional permanece como uma característica da técnica de fusão e injeção, conforme discutido no capítulo anterior. Levando-se em consideração os respectivos desvios padrão, não é possível afirmar que existam diferenças significativas entre as amostras porosas e densas de PCL antes da degradação em relação a sua espessura. A manutenção da espessura do material em valores praticamente constantes das amostras densas e porosas de PCL é uma consequência da estabilidade morfológica do material durante o período avaliado.

Amostras tubulares semelhantes na geometria e na morfologia às obtidas neste experimento vêm sendo desenvolvidas para aplicações em regeneração guiada de tecidos. Usando uma combinação de técnicas, Sundback *et al.* (2003) relatam o preparo de suportes tubulares densos (mas classificados como macroporosos pelos autores), através da injeção de uma solução de PLGA (85/15) em ácido acético em moldes tubulares com um número variado de canais (as amostras obtidas nesse trabalho podem ser classificadas como contendo um canal interno). A microscopia eletrônica de varredura mostrou morfologias muito semelhantes às amostras de PLGA50 não degradadas. Os autores concluem a caracterização do material sugerindo o uso dos suportes na regeneração de tecido nervoso, como nervos periféricos.

Outros experimentos têm sido relatados na obtenção de suportes tubulares porosos, entretanto os métodos de preparo utilizam equipamentos e processos mais complexos,

envolvendo extrusão com velocidade controlada, variação da pressão de injeção e outros (Widmer *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2003 e, Oh *et al.*, 2003).

A geometria e a morfologia dos suportes obtidos em nosso experimento podem ter diversas aplicações. Além de suportes para regeneração guiada de tecidos, a porosidade (acima de 70 %) e o tamanho do poro (maiores que 100 μm) das amostras porosas de PCL e PLGA50 são descritas como as preferenciais na regeneração de tecidos ósseos (Sarazin *et al.*, 2004). Assim, além da continuidade da caracterização da técnica de preparo dos suportes, a avaliação das amostras com a cultura de osteoblastos e implantes *in vivo* mostra-se necessária para a avaliação desses materiais como suportes na engenharia de tecidos.

5.2 Calorimetria diferencial de varredura

Os termogramas obtidos para as amostras densas e porosas de suportes tubulares de PCL, durante o processo de degradação em tampão fosfato, são mostrados na Fig. 22. As curvas são características de um polímero semicristalino, pela presença de Tg no primeiro e segundo aquecimento, e picos de cristalização (no resfriamento) e fusão (em ambos os aquecimentos).

Os dados de Tg (média de $-63\text{ }^{\circ}\text{C}$, obtidas no segundo aquecimento), e Tm (média de $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ no primeiro aquecimento e média de $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ no segundo aquecimento), mostraram-se semelhantes aos valores obtidos nos suportes cilíndricos maciços, divulgados no capítulo anterior. Os valores de DSC para as amostras não degradadas confirmam os relatados na literatura (Hou *et al.*, 2002 e Moore *et al.*, 2005) e sugerem que a mudança da geometria do suporte não muda significativamente as temperaturas obtidas por DSC. A comparação entre os valores para amostras densas e porosas também não mostrou diferenças na análise de DSC (Tab. 7 adiante).

Picos de cristalização (observados durante o resfriamento), sugerem que a taxa de resfriamento do molde foi suficientemente lenta para permitir a nucleação e a conseqüente formação de cristais do material. Amostras de PCL sem degradação apresentaram temperatura de cristalização em torno de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, durante a degradação *in vitro*, a variação ocorreu entre valores de 20 e $23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durante o processo de degradação, amostras polímeros bioreabsorvíveis

semicristalinos com menor tempo de degradação apresentam uma diminuição acentuada de T_c , atribuída pela literatura ao efeito de relaxação das cadeias do polímero. Cadeias poliméricas de menor massa molar requerem uma menor energia de cristalização (Duek *et al.*, 1999 e Barbanti *et al.*, 2004a).

Outro dado obtido pela técnica de DSC é a variação da entalpia das amostras. Conforme descrita no capítulo 3, a variação da entalpia de fusão experimental pode ser relacionada com a entalpia de fusão do material (considerando-o 100 % cristalino), determinando a porcentagem do grau de cristalinidade do material. Amostras densas e porosas apresentaram entre 57 % e 59 % de grau de cristalinidade após o processo de fusão e injeção. Comparados aos valores dos suportes preparados sem a haste interna (aproximadamente 45 %), descritos no capítulo anterior, a variação pode ser atribuída à geometria das amostras. Como função da massa molar e da taxa de resfriamento, a cristalinidade é tanto maior quanto maior é a capacidade de compactação das cadeias poliméricas (Duek *et al.*, 1999). Comparado aos dados da literatura, o grau de cristalinidade das amostras de PCL, obtido pelo processo de fusão com adição e lixiviação de sal neste experimento, mostra-se semelhante aos valores obtidos em amostras preparadas por diferentes técnicas, tais como a evaporação do solvente (média de cristalinidade de 63 %) (Nava *et al.*, 2003) e por polimerização com raios ultravioleta (média de 61 %) (Kweon *et al.*, 2003).

Durante o processo de degradação *in vitro* em tampão fosfato, as amostras de PCL não mostraram modificações significativas em relação à T_g , T_c , T_m e grau de cristalinidade. Os valores oscilaram entre -64 e -61 °C para T_g , 23 °C para T_c , 67 e 70 °C para T_m , e 55 % a 59 % de grau de cristalinidade no primeiro aquecimento e 44 % e 47 % no segundo aquecimento. A estabilidade térmica das amostras de PCL, vem corroborar com os resultados de MEV da Fig. 19. Embora a microscopia eletrônica tenha mostrado uma degradação superficial em amostras densas de PCL, essas diferenças não foram observadas na avaliação térmica das amostras.

A estabilidade térmica do PCL baseia-se não somente na baixa concentração de ligações ésteres na cadeia polimérica. A cristalinidade influi diretamente na taxa de absorção de água, sendo dificultada a difusão nas regiões de compactação (Duek *et al.*, 1999). Estudos de degradação *in vitro* de filmes de materiais semicristalinos, como o PLLA, em tampão fosfato

(pH=7,4, 37 °C) com longa duração (36 meses), demonstraram que as temperaturas 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).

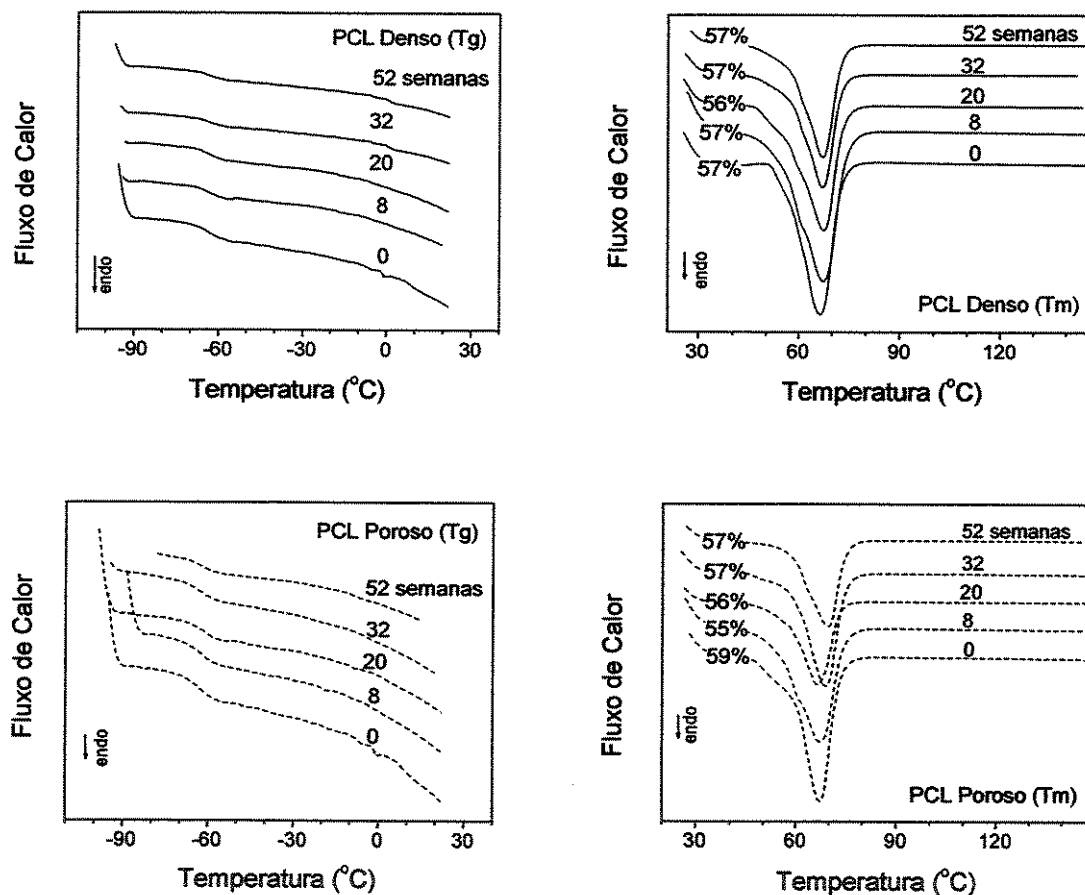


Figura 22 – Termogramas de DSC de amostras tubulares de PCL na degradação *in vitro* em tampão fosfato. (Tg) obtidas no segundo aquecimento e, (Tm) obtidas no primeiro aquecimento. (%) indicam o grau de cristalinidade.

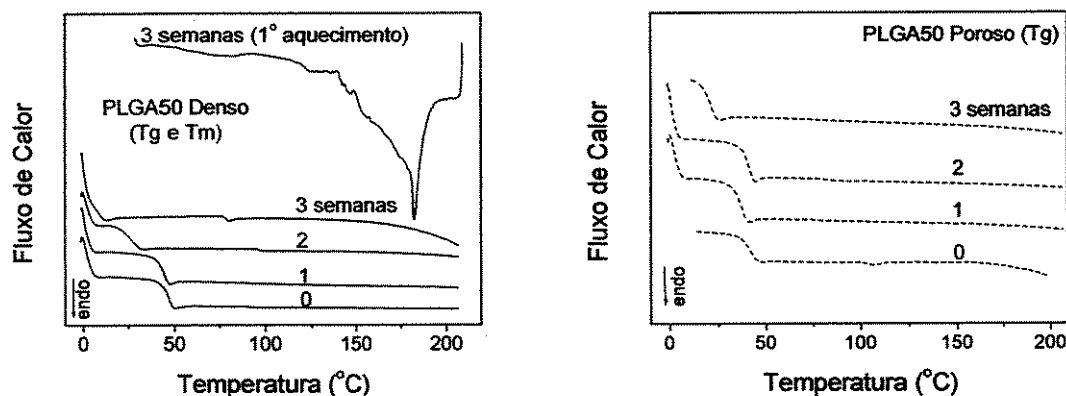


Figura 23 – Termogramas de DSC de amostras tubulares de PLGA50 na degradação *in vitro* em tampão fosfato. (Tg) obtidas no segundo aquecimento.

Amostras preparadas com o PLGA, Bendix (1998) descreve o material com Tg variando entre 40 e 50 °C e, sendo o material amorfo, é também caracterizado pela ausência de picos de fusão. Amostras tubulares densas e porosas de PLGA50 apresentaram Tg com média de 42 °C no segundo aquecimento (Fig. 23 e Tab. 8). A partir da primeira semana submetidas à degradação, amostras densas e porosas de PLGA50 apresentaram decaimento de Tg, atribuído pela literatura ao efeito plastificante da água, absorvida durante o processo de degradação (Li *et al.*, 1990b).

Neste período, comparando-se as diferentes morfologias de PLGA50, não se verifica diferença na variação dos valores de Tg. Entretanto, após 2 semanas de degradação, os valores de Tg mostram um decaimento acentuado (Tab. 8). O decaimento, mais acentuado das amostras densas, sugere que a diferenciação está relacionada com o efeito autocatalítico do material, no qual amostras densas apresentam degradação mais rápida quando comparadas às porosas. A Fig. 24 mostra a variação da Tg durante a degradação *in vitro*, e a taxa de decaimento (média de 8 °C/semana), obtida pela regressão linear dos dados experimentais, demonstra uma diferença de 2 °C entre as morfologias. Deng *et al.* (2002) observaram um decaimento com características diferentes das relatadas em nosso experimento. Amostras de PLGA (75/25) mostraram um comportamento sigmóide, com decréscimo acentuado a partir de 4 semanas de degradação em tampão fosfato. As amostras após 4 semanas de degradação atingem valores com média de 20 °C que persistem até 6 semanas de estudo. O decaimento de Tg relaciona-se com a composição

química das amostras (PLGA 75/25 possui velocidade de degradação maior que PLGA 50/50), e fundamentalmente, com a massa molecular.

Apresentadas como materiais amorfos antes da degradação, amostras densas de PLGA50 apresentaram picos de fusão com 3 semanas de degradação em 182 °C (Fig. 23 e Tab. 8). A presença da região cristalina durante o processo de degradação é atribuído ao rearranjo das cadeias poliméricas geradas durante o processo, que se organizam e dão origem aos cristais (Duek *et al.*, 1999). A porcentagem relativa do grau de cristalinidade das amostras de PLGA50 não pode ser determinado por comparação com o valor teórico.

A comparação entre as morfologias de um mesmo material mostra não haver diferenças significativas com relação à Tg, Tc e Tm em função da adição e posterior lixiviação do sal (Fig 24). Em estudos conduzidos com membranas densas e porosas, preparadas pela técnica de evaporação do solvente com adição de sal, Coombes *et al.* (1992) e Barbanti *et al.* (2004a) concluem que, na ausência de agentes plastificantes (presença de solvente, por exemplo), a presença do sal e sua retirada não influem nas suas propriedades térmicas antes e durante a degradação.

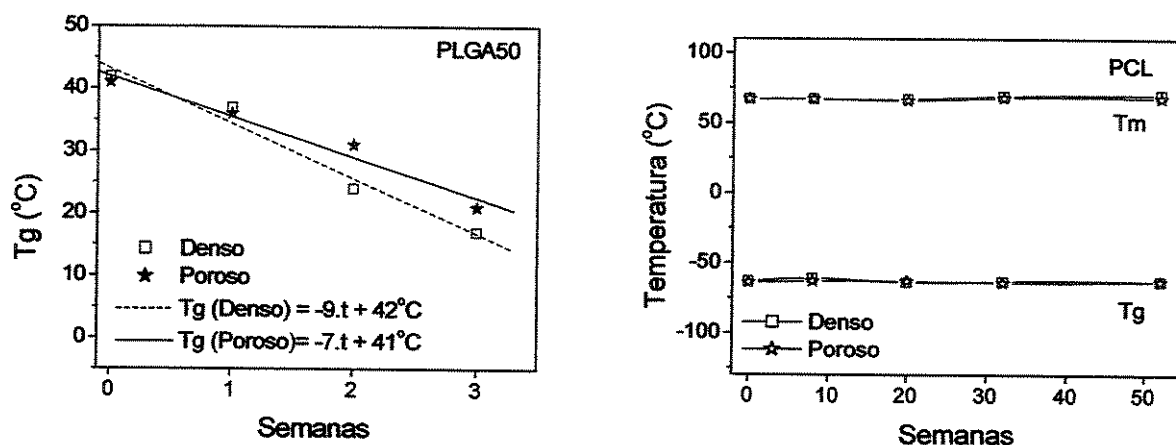


Figura 24 – Temperatura de transição vítrea (Tg) e de fusão (Tm) obtidos por DSC de amostras de PCL e PLGA50 na degradação *in vitro* em tampão fosfato.

Tabela 7 – Dados de DSC de amostras tubulares densas e porosas de PCL na degradação *in vitro* em tampão fosfato. (Tg) temperatura de transição vítrea; (Tm) temperatura de fusão; (ΔH_m) variação de entalpia de fusão.

Semanas	Tg ⁽²⁾ (°C)		Tc ^(R) (°C)		Tm ⁽¹⁾ (°C)		Tm ⁽²⁾ (°C)		ΔH_m ⁽¹⁾ (J/g)		ΔH_m ⁽²⁾ (J/g)		Grau de Cristalinidade ⁽¹⁾		Grau de Cristalinidade ⁽²⁾	
	Denso	Poroso	Denso	Poroso	Denso	Poroso	Denso	Poroso	Denso	Poroso	Denso	Poroso	Denso	Poroso	Denso	Poroso
0	-63	-64	22	21	67	67	58	57	80	82	65	65	57 %	59 %	47 %	47 %
8	-61	-64	21	24	67	67	58	57	79	77	65	64	57 %	55 %	47 %	46 %
20	-64	-63	24	22	67	66	58	58	78	78	65	66	56 %	56 %	47 %	47 %
32	-63	-64	26	23	69	68	59	58	79	79	62	63	57 %	57 %	44 %	45 %
52	-63	-63	24	23	70	68	59	58	79	79	66	65	57 %	57 %	47 %	47 %

(1) 1° aquecimento; (2) 2° aquecimento; (R) resfriamento.

Tabela 8 – Dados de DSC de amostras tubulares densas e porosas de PLGA50 na degradação *in vitro* em tampão fosfato. (Tg) temperatura de transição vítrea; (Tm) temperatura de fusão.

Semanas	Tg ⁽¹⁾ (°C)		Tg ⁽²⁾ (°C)		Tm ⁽¹⁾ (°C)		Grau de Cristalinidade	
	Denso	Poroso	Denso	Poroso	Denso	Poroso	Denso	Poroso
0	44	44	42	41	-	-		
1	39	41	37	36	-	-		Amorfo
2	-	-	24	31	-	-		
3	-	-	17	21	182	-	Cristalino	Amorfo

(1) 1° aquecimento; (2) 2° aquecimento.

5.3 Análise termogravimétrica

Avaliados pela temperatura de início de degradação térmica (*Tonset*), os termogramas da Fig. 25 e as Tab. 9 e 10 (adiante) apresentam os dados referentes à degradação em meio tampão fosfato. As amostras de PCL e PLGA50 foram comparadas aos materiais conforme recebidos, sem processamento. Numa primeira análise, observar-se pelos resultados experimentais, que o processamento dos materiais bioreabsorvíveis, avaliados neste trabalho, não altera a estabilidade térmica. O tempo de permanência do material na panela de aquecimento sugere não ter sido longo o suficiente para degradar termicamente as amostras. PCL e PLGA50 apresentaram valores de *Tonset* médio de 390 °C e 330 °C, respectivamente. Comparados aos valores de amostras preparadas em molde sem haste, descritas no capítulo anterior, os suportes tubulares não apresentam diferenças pela análise de TGA.

Avaliados durante a degradação, amostras de PCL densas e porosas mostram um comportamento semelhante ao observado pelo MEV e pela caracterização de DSC: o material tem pequenas variações de *Tonset*, entretanto, com variações de cerca de 1,5 % do valor da temperatura inicial. Uma pequena tendência de decaimento mais acentuado é observada em amostras tubulares densas (taxa de decaimento de 0,08 °C/semana), no entanto esses resultados não podem ser atribuídos à diminuição da estabilidade térmica, pois podem estar dentro dos limites de resolução do equipamento. Não foram observadas diferenças significativas entre amostras densas e porosas de PCL durante o processo de degradação *in vitro* em tampão fosfato.

Ao contrário das amostras de PCL, o valor de *Tonset* das amostras de PLGA50 diminuem consideravelmente durante o período de degradação (Fig. 26 e Tab. 10 adiante). Após 3 semanas de degradação *in vitro*, o decaimento é da ordem de 10 % do valor da temperatura inicial. Novamente, a adição e lixiviação do sal mostra não ter influência na temperatura de início de degradação térmica durante o processo de degradação. A Fig. 25 relaciona a tendência linear do decaimento da temperatura de início de degradação térmica. A taxa de decaimento médio entre amostras densas e porosas (11,5 °C/semana), tem valores próximos à taxa de decaimento de Tg, sugerindo uma influência equivalente da degradação em tampão fosfato nas temperaturas características do material.

Tabela 9 – Dados de TGA de amostras tubulares densas e porosas de PCL em função do tempo de degradação em tampão fosfato. (*Tonset*) temperatura de início de degradação térmica.

	PCL (<i>Tonset</i>)				
	Não Processado	0 semana	20 semanas	32 semanas	52 semanas
Denso	390 °C	389 °C	392 °C	390 °C	388 °C
Poroso		392 °C	391 °C	389 °C	387 °C

Tabela 10 – Dados de TGA de amostras tubulares densas e porosas de PLGA50 em função do tempo de degradação em tampão fosfato. (*Tonset*) temperatura de início de degradação térmica.

	PLGA50 (<i>Tonset</i>)				
	Não Processado	0 semana	1 semana	2 semanas	3 semanas
Denso	330 °C	333 °C	323 °C	312 °C	296 °C
Poroso		330 °C	321 °C	308 °C	298 °C

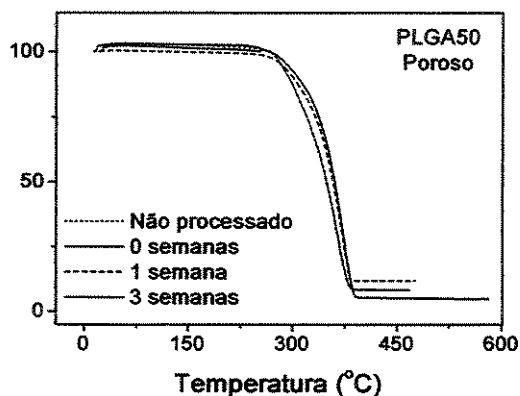
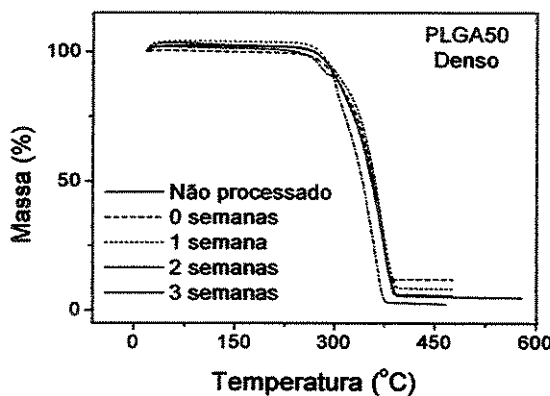
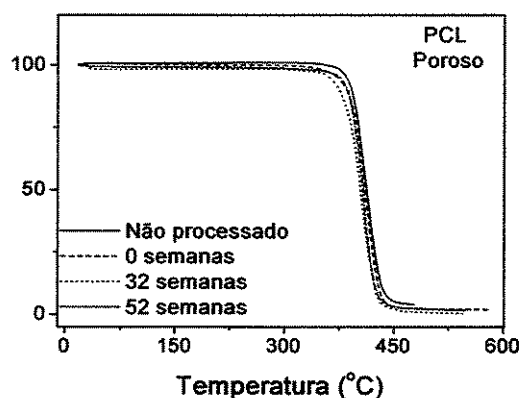
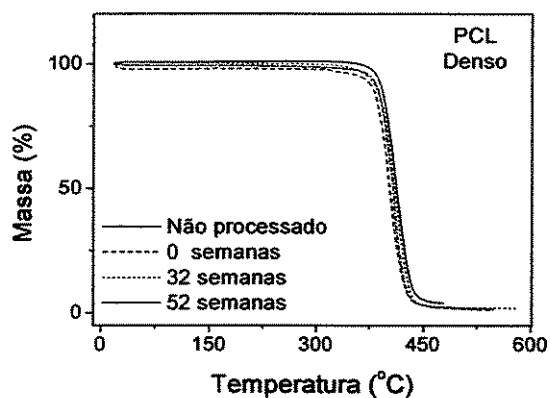


Figura 25 – Termogramas de TGA para amostras de PCL e PLGA50 durante degradação *in vitro* em tampão fosfato.

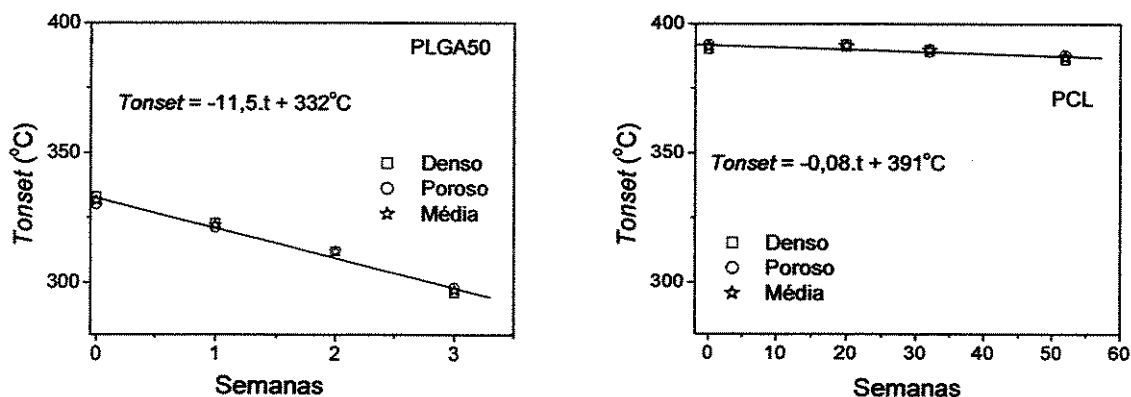


Figura 26 – Variação da temperatura de início de degradação térmica (*Tonset*) para amostras de PCL e PLGA50 durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

A degradação térmica dos materiais poliméricos está diretamente associada à energia necessária para o rompimento das ligações intramoleculares. Assim, a influência da composição química dos materiais é o fator preponderante na análise de TGA. A diferença térmica entre amostras de PCL e PLGA (50/50) foi avaliada por Penco *et al.* (2000), em estudo envolvendo copolímeros multi-blocos de PLGA(50/50) e PCL, e confirmam os valores de *Tonset* encontrados em nosso trabalho.

O mecanismo de degradação térmica dos polímeros bioreabsorvíveis tem sido avaliado por diversos autores e ainda não é bem esclarecido. A queda de *Tonset* nas amostras de PLGA50 relaciona-se com o processo de hidrólise do material, isto é, quanto menor a cadeia polimérica, menor a estabilidade térmica (Penco *et al.*, 2000). O mecanismo de degradação térmica nos poli(α -hidróxi ácidos) ocorre em diversas etapas e mecanismos, incluindo a transesterificação intramolecular, *cis*-eliminação e fragmentação em acetaldeído e gás carbônico (Kopinke *et al.*, 1996).

Nas amostras de PCL, a degradação térmica em meio inerte (N_2) e em condições isotérmicas (170 °C, 250 °C e 290 °C) foi estudado por Aoyagi *et al.* (2002) através das análises de TGA e DTA (análise térmica diferencial). Em função da energia de ativação constante durante

a perda de massa, os autores sugerem um mecanismo de degradação em uma única etapa, por despolimerização da porção terminal da macromolécula. Quando avaliada a degradação em condições não-isotérmicas, conforme proposto em nosso trabalho, Sivalingam *et al.* (2003) descrevem a degradação de amostras de PCL por dois mecanismos: *cis*-eliminação e por cisão aleatória na ligação C-O da cadeia polimérica. A alta estabilidade térmica das amostras de PCL demonstra estar relacionada com a concentração dos grupos funcionais carboxilas do material.

Os resultados da análise de TGA além de caracterizarem o material, contribuem através da relação entre a técnica de preparo do suporte de polímero bioreabsorvível com sua aplicação. Em se tratando de aplicações em cultura de células e estudos *in vivo*, o processo de bioreabsorção é feito na temperatura corpórea, e nunca atinge os valores limites de *Tonset*. Entretanto, a degradação térmica em materiais bioreabsorvíveis é considerada como parâmetro de influência durante o processamento do material quando requerem calor para conformação, tais como a técnica de fusão, extrusão ou FDM. A esterilização por calor de suportes e dispositivos de polímeros bioreabsorvíveis é também outro fator relevante no estudo da degradação térmica, pois, durante a decomposição, podem ser produzidos produtos e subprodutos que propiciem reações inflamatórias ao organismo, ou até mesmo alterando as características de biofuncionalidade do material (Gogolewski *et al.*, 1997; Cordewener *et al.*, 2000 e Rickert *et al.*, 2003).

Bergsma *et al.* (1995) avaliaram degradação *in vitro* de amostras de PLGA (96/4) em tampão fosfato a 90 °C durante 450 h. Os resultados de Mw, variação de massa, Tg e Tm mostraram que materiais com elevado tempo de degradação podem ser estudados com ensaios acelerados de degradação. O estudo *in vivo* das amostras pré-degradadas mostrou comportamento semelhante aos das amostras não degradadas, entretanto com perda considerável das suas propriedades mecânicas (Bergsma *et al.*, 1996). Em adição, uma das formas do controle das propriedades e características dos suportes pode ser realizada pela pré-degradação térmica. Materiais bioreabsorvíveis estáveis por longos períodos podem ser submetidos à pré-degradação para ajuste de suas propriedades.

5.4 Ensaio mecânico de flexão

O ensaio mecânico de flexão dos suportes densos e porosos de PCL e PLGA50 mostrou um comportamento distinto entre as amostras. Pela curva tensão x deformação as amostras densas de PLGA50 mostram um comportamento frágil, enquanto as amostras densas de PCL e porosas de PCL e PLGA50 um comportamento dúctil (Fig. 27).

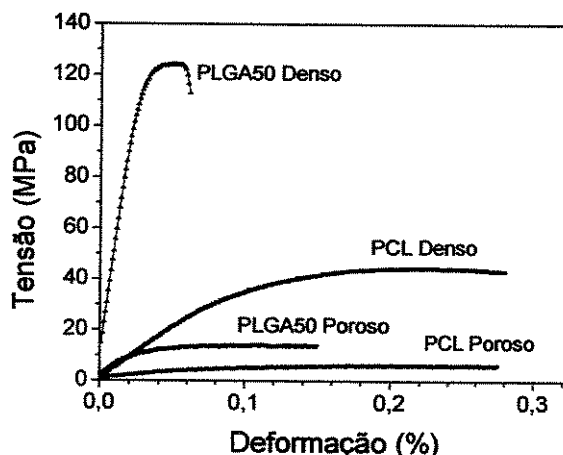


Figura 27 – Curvas de tensão x deformação no ensaio mecânico de flexão de suportes densos e porosos de PCL e PLGA50 sem degradação.

Avaliado pela região linear das curvas de tensão x deformação, o módulo de Young (E) mostra-se diferente entre os tipos de materiais e suas morfologias (Tab. 11). Antes e durante a degradação, amostras de PLGA50 apresentaram módulo superior aos seus análogos de PCL, havendo uma diferença aproximada de 10^1 entre os suportes de mesma morfologia. Quando comparada a morfologia das amostras, verifica-se que a porosidade diminui consideravelmente o módulo de flexão. A relação entre os módulos pode ser descrita pela sequência abaixo. Os valores obtidos são apresentados na Tab. 11 e na Fig.28 adiante.

$$E_{\text{PLGA50 denso}} > E_{\text{PLGA poroso}} \approx E_{\text{PCL denso}} > E_{\text{PCL poroso}}$$

Durante o período de 52 semanas de degradação *in vitro*, amostras densas e porosas de PCL apresentaram uma tendência ao decaimento do módulo de Young, sendo o maior decréscimo nas

amostras densas. Um comportamento semelhante é observado nos dados de tensão máxima de escoamento, entretanto com menor variação (Tab. 8). O resultado da análise mecânica pelo ensaio de flexão sugere uma diminuição da massa molar das amostras, entretanto em pequena proporção. Apesar de não ter sido verificada pelas análises térmicas e morfológicas, as etapas de degradação descritas por Pietrzak *et al.* (1997) (Fig. 3), mostram que a diminuição da resistência mecânica antecede a perda de massa. A pequena variação do tamanho médio das cadeias poliméricas das amostras de PCL pode ser confirmada pelos ensaios de GPC adiante.

Nos suportes de PLGA50 há um comportamento distinto e mais acentuado na variação do módulo de flexão. Durante 3 semanas de degradação, suportes densos de PLGA50 apresentam decaimento do módulo e da tensão máxima de ruptura (Tab. 8). O aumento do módulo de Young nas amostras de PLGA50 durante uma semana de degradação, pode ser atribuído a uma reorganização das cadeias poliméricas. Com a degradação e, conseqüente diminuição da massa molecular, o rearranjo das cadeias de menor tamanho permite um maior número de ligações intermoleculares secundárias, produzindo assim uma resistência adicional (Duek *et al.*, 1999). Geralmente, o material torna-se mais resistente e mais frágil. Na medida em que a degradação prossegue, as regiões de maior organização degradam, diminuindo a resistência, conforme mostrado na Fig. 28. Observa-se que os valores do módulo decaem mais acentuadamente nas amostras densas, quando comparadas às porosas, confirmando mais uma vez o efeito autocatalítico dos poli(α -hidróxi ácidos).

Conforme foi apresentado, a morfologia porosa permite maior difusão do meio de cultura, como também facilita a invasão celular e formação do novo tecido. Entretanto, a diminuição das propriedades mecânicas pelo aumento da porosidade dos suportes bioreabsorvíveis, é descrita como um parâmetro de limitação nas aplicações na cultura de células e nos dispositivos de fixação óssea (Fang *et al.*, 2005). Como alternativa para a melhoria das propriedades mecânicas dos suportes, a formação de blendas entre os materiais é um campo de destaque no preparo de materiais adequados à aplicação. Através da composição da blenda é possível estabelecer um controle entre material, morfologia e resistência mecânica (Ferreira *et al.*, 2002 e Sung *et al.*, 2005). Outra técnica aplicada à melhoria das propriedades mecânicas dos suportes de PCL é a

formação de compósitos com hidroxiapatita (Kim *et al.*, 2004) e biovidros (Boccaccini *et al.*, 2005).

Os valores do módulo de flexão, obtidos neste estudo, delimitam suas aplicações como suportes na engenharia de tecidos. Aplicados à engenharia de tecidos ósseos, o material deve permitir a consolidação da fratura pela formação do calo ósseo. Durante a sua formação, o calo necessita receber estímulo mecânico e, dessa forma, o polímero deve ter iniciado seu processo de degradação com perda da resistência mecânica. Com a consolidação da fratura, o dispositivo polimérico deve ser reabsorvido completamente, não sendo necessário uma segunda intervenção cirúrgica para a sua retirada (Middleton *et al.*, 2000). Dos suportes desenvolvidos neste trabalho, o material que mais se aproxima das características mecânicas do osso cortical ($E \approx 17$ GPa) (Lakes, 1999) e de tempo de recuperação óssea, é aquele preparado com PLGA50 sem adição de sal ($E \approx 4,1$ GPa).

Entretanto, suportes poliméricos bioreabsorvíveis porosos com curtos (PLGA50) e longos (PCL) tempos de degradação têm usos específicos. Os suportes porosos de PLGA50 desenvolvidos neste trabalho têm tido aplicações na Estratégia I, apresentada no capítulo 2, no qual o material serve como matriz temporária para o desenvolvimentos de tecidos em bioreatores. As aplicações incluem a produção de pele e cartilagem (Seal *et al.*, 2001). Suportes porosos de PCL estão sendo descritos em usos onde se requer materiais que se mantenham flexíveis, como a liberação controlada de drogas (Tabata, 2000) e substratos para pele (Khor *et al.*, 2002).

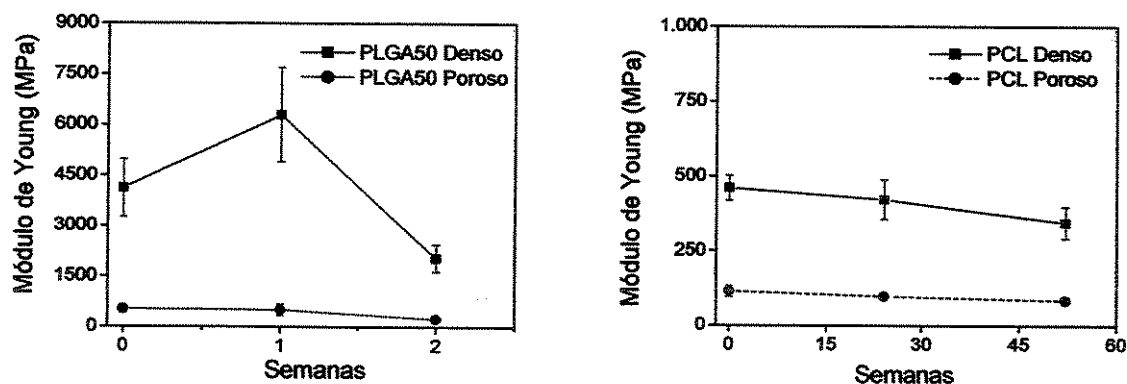


Figura 28 – Módulo de Young no ensaio mecânico de flexão de amostras densas e porosas de PCL e PLGA50 durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

Tabela 11 – Módulo de Young (E) e tensão máxima de escoamento ($\sigma_{\max}$) no ensaio mecânico de flexão de amostras densas e porosas de PCL e PLGA50 em função do tempo de degradação em tampão fosfato.

Ensaio Mecânico de Flexão										
PCL					PLGA50					
Denso					Poroso					
Semanas	E ± sd (MPa)	σ _{máx} ± sd (MPa)	E ± sd (MPa)	σ _{máx} ± sd (MPa)	Semanas	E ± sd (MPa)	σ _{máx} ± sd (MPa)	E ± sd (MPa)	σ _{máx} ± sd (MPa)	
0	461 ± 42	44 ± 3,8	115 ± 18	4 ± 1,4	0	4120 ± 860	124 ± 11	529 ± 120	14 ± 3	
24	422 ± 66	41 ± 5,2	98 ± 13	5 ± 1,1	1	6300 ± 1403	133 ± 9	502 ± 170	11 ± 2,5	
52	345 ± 53	39 ± 5,6	84 ± 17	4 ± 0,7	2	2039 ± 408	78 ± 13	232 ± 89	8 ± 2	
(sd) desvio padrão.										

5.5 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A análise de GPC forneceu dados relativos à massa molecular média dos suportes estudados, antes e após a degradação em tampão fosfato. Os dados obtidos são apresentados nas Tab. 12 e 13 e dispostos em forma gráfica na Fig. 29.

Os valores de GPC confirmam as hipóteses apresentadas pelas técnicas anteriores: amostras de PCL são estáveis à degradação em tampão fosfato no período de 52 semanas e amostras de PLGA50 degradam significativamente no período de 3 semanas. Amostras de PCL densas e porosas mostraram massa molecular ponderal média (M_w) com valores médios de 100.000 g/mol. O fornecedor do material (Sigma-Aldrich) comercializa o material com $M_w = 80.000$ g/mol, e as condições de processamento e de armazenamento do material não justificam a discrepância entre os valores.

Durante o período de degradação, a variação de M_w nas amostras de PCL é pequena (aproximadamente 5 %), confirmando a estabilidade dos suportes observada por MEV, DSC, TGA e pelo ensaio mecânico de flexão. O decréscimo de M_w é uma tendência e pode ser observado o mesmo comportamento quando se avaliam os dados de M_n e do índice de polidispersão (IP). A relação entre M_w e M_n é dada pelo IP, e os valores acima de 1 indicam uma predominância de cadeias de alta massa molecular (Lucas *et al.*, 2001). Não foram observadas variações significativas no IP em nosso experimento, assim como entre as morfologias propostas neste trabalho. Os valores, apresentados nas Tab. 12 e 13, são próximos entre as amostras porosas e densas, e não sugerem uma diferenciação durante o processo de degradação (Fig. 29).

Na análise das amostras de PLGA50, a tendência de degradação acelerada é confirmada pelos dados de GPC. Com 2 semanas de degradação as amostras diminuem de maneira considerável seus valores de M_w e M_n . A Fig. 29 adiante mostra a taxa de decaimento da massa molecular das amostras densas e porosas, e reafirma a diferenciação observada pelas análises térmicas de DSC e TGA. A taxa de decaimento dos valores de M_w é maior em amostras densas (29.500 g/mol/semana) quando comparadas às porosas (17.900 g/mol/semana). Comportamento semelhante é observado nas taxas de M_n . A análise da taxa de decaimento das amostras densas e

porosas de PLGA50 confirma o efeito autocatalítico dos poli(α -hidróxi ácidos). A cisão aleatória das cadeias durante o processo de hidrólise gera cadeias de menor massa molecular, e a diminuição do IP é citada pela literatura como um comportamento padrão (Schliecker *et al.*, 2003).

Entre amostras densas e porosas de PLGA50 existe uma variação entre os valores de massa molecular. Amostras porosas apresentaram Mw menores que seus análogos densos, sugerindo um processo de degradação durante o tempo de permanência do material na panela de processamento da injetora. A mistura polímero/sal foi realizada durante o aquecimento das amostras e, diante da dificuldade de manuseio e homogeneização do sal, o tempo de permanência a 160 °C pode ter ocasionado a diminuição. A mistura dos componentes em temperaturas menores mostra-se como um aspecto a ser avaliado e adotado para a técnica.

Amostras de PCL mostraram importante estabilidade durante 52 semanas de degradação *in vitro*. Nossos resultados estão de acordo com estudos similares de degradação, entretanto Ali *et al.* (1993b) demonstraram que o processo de hidrólise das caprolactonas é sensivelmente influenciado pela presença de radicais livres. Assim, em estudos de degradação *in vivo* o PCL apresenta uma maior velocidade de degradação, com diminuição acentuada da massa molar.

Os resultados de GPC para amostras de PLGA50 podem ser relacionados com a variação de suas propriedades térmicas e mecânicas. A Fig. 30 adiante relaciona Tg, *Tonset* e o módulo de flexão (E) em função da Mw de amostras densas e porosas.

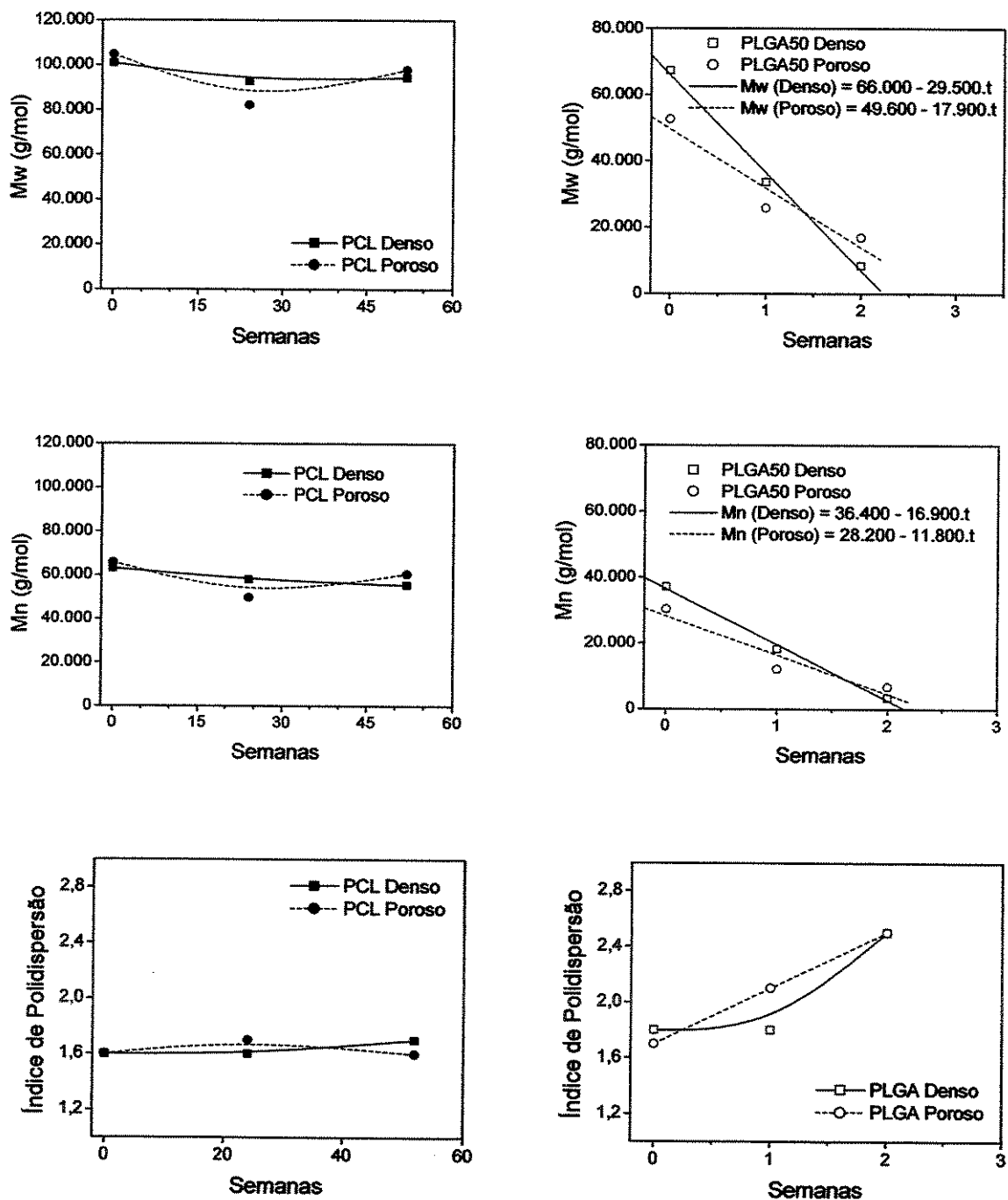


Figura 29 – Massa molecular ponderal média (Mw), numérica média (Mn) e índice de polidispersão em amostras de PCL e PLGA50 durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

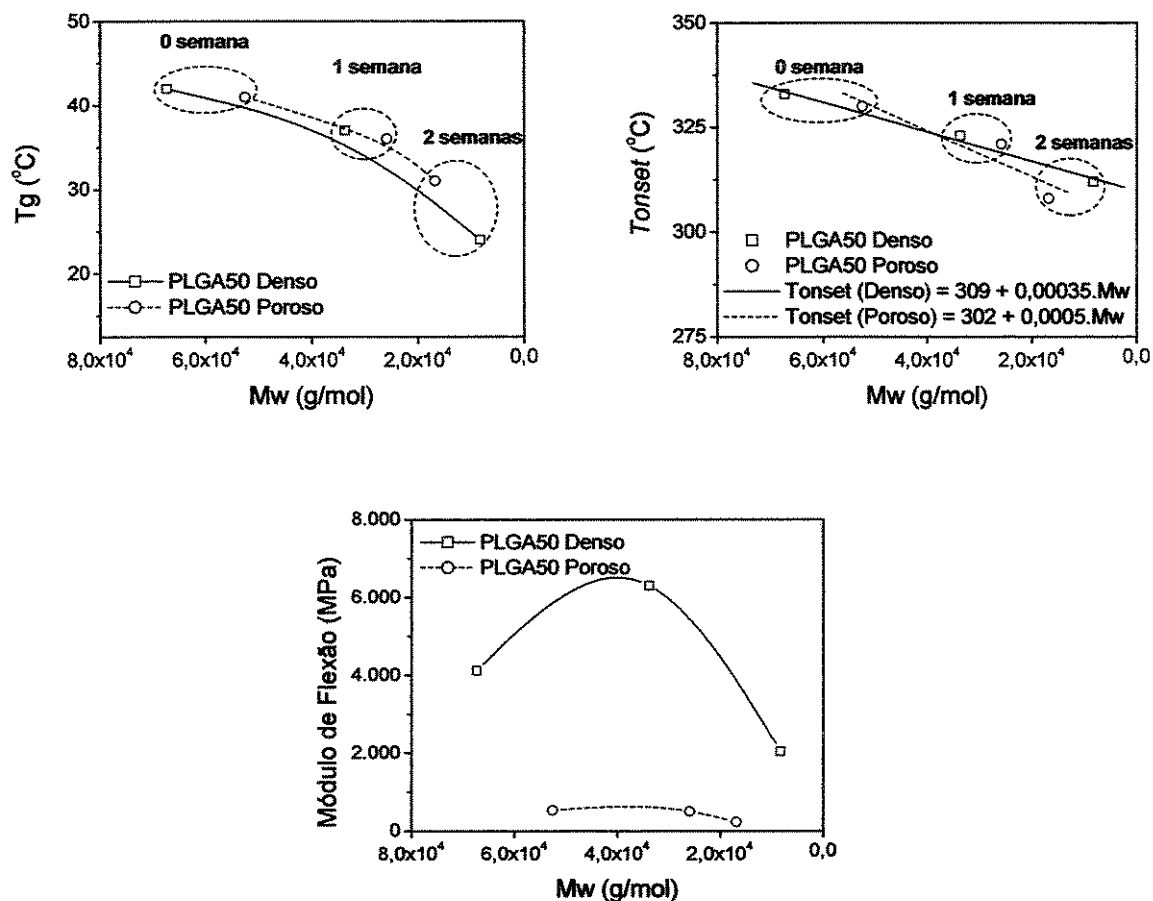


Figura 30 – Temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de início de degradação térmica ($Tonset$) e módulo de flexão de amostras densas e porosas de PLGA50 em função da massa molecular ponderal média (M_w).

A relação entre os dados de análise térmica dos materiais com a massa molecular de amostras densas e porosas de PLGA50 mostrou-se decrescente. Quanto menor a massa molecular, menor a temperatura de transição vítrea e de início de degradação térmica. Em relação à T_g , a diminuição da massa molecular aumenta a flexibilidade da cadeia, diminuindo seu valor. A literatura descreve também como outro fator de influência a presença de moléculas de água, provenientes do meio de degradação, e que agem como agente plastificante durante o processo de degradação (Li *et al.*, 1990b). A variação de $Tonset$ com M_w é atribuída à própria degradação das amostras. Quanto menor o tamanho das cadeias poliméricas, menor a estabilidade térmica (Lucas *et al.*, 2001). No gráfico entre o módulo de flexão e M_w a relação sugere um comportamento de

crescimento em uma semana e posterior decréscimo. O aumento do módulo de Young nas amostras de PLGA50 durante uma semana de degradação, é atribuído a uma reorganização das cadeias poliméricas. Com a diminuição da massa molecular, o rearranjo das cadeias de menor tamanho aumenta o número de ligações intermoleculares secundárias, produzindo assim uma resistência adicional (Duek *et al.*, 1999).

5.6 Conclusões parciais

O estudo da degradação de suportes de polímeros bioreabsorvíveis em tampão fosfato é útil na caracterização dos materiais em meios com pH fisiológico. Os dados da literatura são extensos e permitem uma boa comparação com os resultados experimentais.

Suportes baseados em PLGA50 apresentaram degradação acentuada em 3 semanas de estudo *in vitro*. Há significativas variações morfológicas, térmicas de propriedade mecânica e de tamanho médio das cadeias poliméricas. De uma forma geral, quanto maior o tempo de degradação, menor a propriedade avaliada no suporte. O autocatálise descrita para os poli(α -hidróxi ácidos) é verificada nos suportes tubulares preparados pela técnica de fusão.

Em contraposição às amostras de PLGA50, suportes baseados em PCL mostraram-se estáveis em 52 semanas de degradação. Os dados de morfologia sugerem uma degradação preferencial das amostras densas de PCL, entretanto não foi verificada pelas análises térmicas. O estudo da degradação *in vitro* das amostras de PCL permitiu ainda uma conclusão sobre as variáveis de degradação propostas por Pietrzak *et al.* (1997) (massa molecular, tensão e massa do suporte) e apresentadas no capítulo 2. A Fig. 3 pode ser completada, juntamente com o decaimento da massa, pela inclusão das análises térmica das amostras, variáveis indiretas de degradação.

Materiais bioreabsorvíveis com longo tempo de degradação requerem estudos com períodos de anos, onde as condições de ensaio devem ser mantidas de maneira controlada. Assim, o estudo acelerado da degradação *in vitro* mostra-se como uma necessidade para predizer propriedades desses materiais em curtos períodos de tempo.

Capítulo 6

Degradação *in vitro* em soluções de NaOH

A degradação *in vitro* em soluções de NaOH vem sendo proposta nos últimos anos como uma alternativa aos estudos tradicionais em meio de tampão fosfato. O uso de meios alcalinos permite simular condições específicas do ambiente bioquímico celular e pode ser utilizado em ensaios acelerados de degradação (Cam *et al.*, 1995 e Yuan *et al.*, 2003).

Conforme mostra a Fig. 31, a ligação éster apresenta uma típica reação de substituição nucleófila, com o ataque no carbono carbonílico e conseqüente substituição do grupo $-OR'$ por $-OH$, $-OR''$ ou $-NH_2$. A reação, na presença de água, denomina-se hidrólise e pode ser catalisada por meios ácidos ou básicos. A hidrólise alcalina dos ésteres mostra-se mais rápida quando comparada ao meio ácido, pois a presença do íon OH^- , um reagente fortemente nucleófilo, faz a reação ser essencialmente irreversível, ao contrário da reação ácida. O íon carboxilato é estabilizado por ressonância, tendo assim pouca tendência a reagir com os álcoois terminais formados (Morrison *et al.*, 1994).

Assim, buscando prever o comportamento da variação de massa, das propriedades térmicas e morfológicas, e de variação de massa em pH fisiológico, amostras densas de PCL e PLGA50 foram submetidas à degradação *in vitro* em meio alcalino com soluções de NaOH, em pH 12, 13 e 13,7.

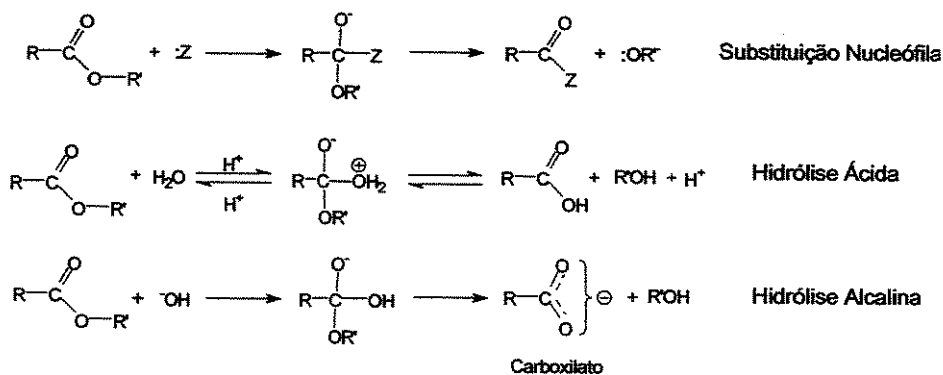


Figura 31 – Substituição nucleófila, reação de hidrólise ácida e alcalina dos ésteres.

6.1 Variação de massa

A variação da massa normalizada das amostras de PCL e PLGA50 são apresentadas nas Tab. 14 e 15. Os resultados mostram um comportamento de degradação semelhante aos resultados obtidos na degradação em tampão fosfato: as amostras de PCL são significativamente mais estáveis quando comparadas às de PLGA50, mesmo em meios alcalinos. Com 15 semanas de degradação há uma perda de 30 % de massa nas amostras imersas em solução alcalina, enquanto não verifica-se variação nas amostras em água destilada (Tab. 14). Os resultados não mostram uma variação significativa da massa em função do pH da solução alcalina (Fig. 32).

Em relação às amostras de PLGA50, o decaimento da massa ocorre a partir da primeira semana, conforme mostram os dados da Tab. 15. Observando-se a Fig. 32, o decaimento da massa para amostras densas de PLGA50 sugere uma relação diretamente proporcional à concentração do meio alcalino.

A reação de hidrólise, catalisada pela presença da hidroxila, mostra uma relação direta entre a concentração de OH^- e a de grupamentos ésteres do material (Jong *et al.*, 2001). Assim, a diferenciação entre a degradação dos materiais permanece na relação entre a quantidade de ligações ésteres presentes na cadeia, do tamanho das cadeias (massa molecular) e da disponibilidade de se formar terminais que permitam a propagação da reação.

Tabela 14 – Massa normalizada (m) de amostras de PCL na degradação *in vitro* em NaOH.

Semanas	PCL							
	pH 7		pH 12		pH 13		pH 13,7	
	m	± sd	m	± sd	m	± sd	m	± sd
0	1,000	0,010	1,000	0,020	1,000	0,010	1,000	0,010
2	0,987	0,012	0,970	0,010	0,960	0,100	0,941	0,020
4	1,000	0,030	0,950	0,055	0,947	0,040	0,920	0,022
8	0,990	0,063	0,840	0,018	0,860	0,050	0,820	0,030
15	0,980	0,040	0,790	0,084	0,660	0,070	0,670	0,090

sd = desvio padrão

Tabela 15 – Massa normalizada (m) de amostras de PLGA50 na degradação *in vitro* em NaOH.

Semanas	PLGA							
	pH 7		pH 12		pH 13		pH 13,7	
	m	± sd	m	± sd	m	± sd	m	± sd
0	1,000	0,010	1,000	0,063	1,000	0,010	1,000	0,056
1	0,960	0,090	0,900	0,140	0,870	0,100	0,820	0,080
2	0,930	0,066	0,770	0,070	0,632	0,067	0,660	0,090
3	0,830	0,200	0,380	0,210	0,230	0,050	0,220	0,120
4	0,810	0,120	0,120	0,150	0,050	0,030	0,020	0,210

sd = desvio padrão

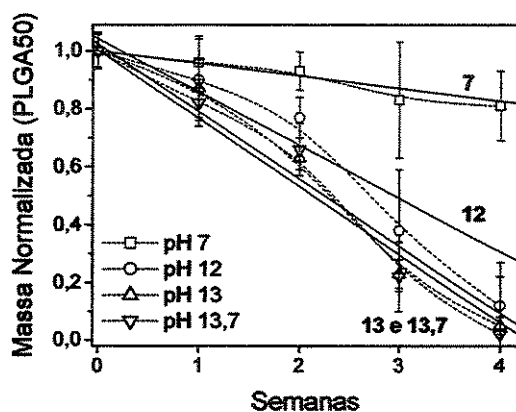
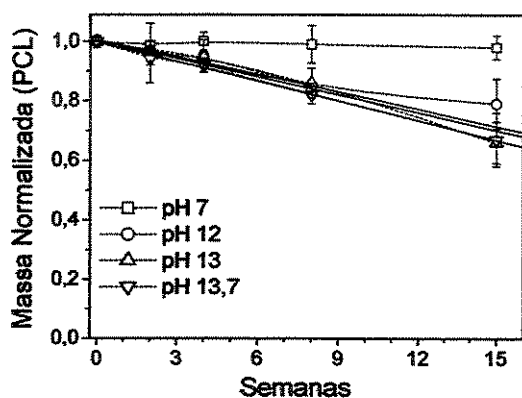


Figura 32 – Variação da massa normalizada na degradação *in vitro* em NaOH (pH 7, 12, 13 e 13,7) de amostras densas de PCL e PLGA50.

Pela regressão linear da variação da massa normalizada em função do tempo e pH, o coeficiente angular representa a taxa de decaimento das amostras. A relação direta entre o valor do pH e a taxa de decaimento é verificada pelos dados da Tab. 16. Nas amostras de PCL, a variação não é tão intensa e entre os valores de pH 13 e 13,7 não há uma diferenciação significativa ao longo do tempo de degradação.

Tabela 16 – Taxa de decaimento da massa normalizada em amostras de PCL e PLGA50 na degradação *in vitro* em meio alcalino NaOH.

pH	PLGA50	PCL
	Taxa de decaimento da massa normalizada (semanas ⁻¹)	Taxa de decaimento da massa normalizada (semanas ⁻¹)
7	-0,0432	-
12	-0,1837	-0,0195
13	-0,2354	-0,0201
13,7	-0,2327	-0,0221

Representada de forma gráfica (Fig. 33), a regressão linear da taxa de decaimento da massa, em função do pH, mostra a interpolação para pH = 7,4 e a ordenada da reta (taxa de decaimento) em -0,0852 semanas⁻¹ para amostras de PLGA50 e -0,0025 semanas⁻¹ para amostras de PCL. Nossos resultados de variação de massa indicam que as amostras de PLGA50 possuem uma velocidade de perda de massa 40 vezes superior às amostras de PCL.

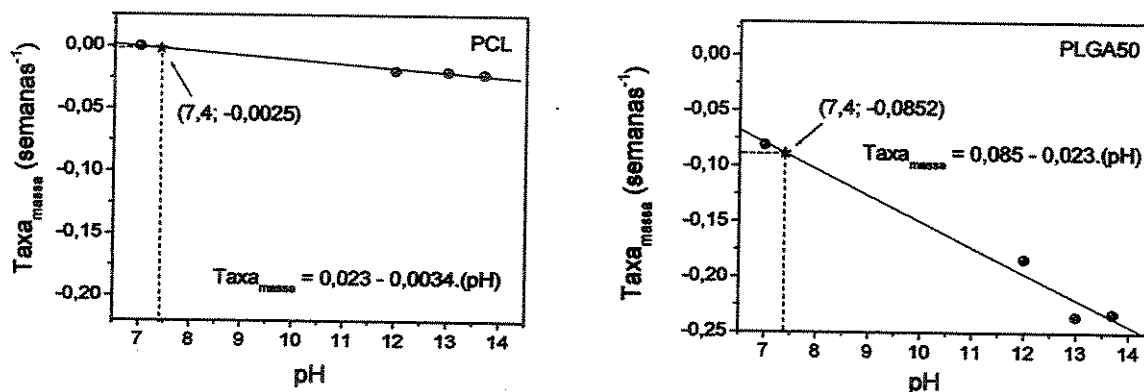


Figura 33 – Taxa de decaimento da massa normalizada durante a degradação *in vitro* em solução alcalina de NaOH em função do pH.

Obtida pela curva de degradação *in vitro* em soluções de NaOH, a interpolação da reta em pH 7,4 forneceria uma estimativa da degradação em meio fisiológico. Apesar do ambiente químico ser distinto, a hidrólise dos polímeros bioreabsorvíveis vem sendo descrita com mecanismos semelhantes. Buscando estabelecer o mecanismo de degradação *in vitro* de amostras de PLA e PLGA (50/50) na presença de H^+ e OH^- , Jong *et al.* (2001), descrevem a reação de hidrólise através de um modelo de reação secundária de eliminação de monômeros. Após o rompimento da ligação éster, o terminal álcool, das macromoléculas resultantes da degradação, reage com o meio alcalino, promovendo a eliminação de um monômero lactato ou glicolato, dependendo da composição do material. O mecanismo parece ocorrer de forma semelhante àquele descrito pela degradação térmica das amostras de PCL (Sivalingam *et al.*, 2003).

Os resultados de predição da perda de massa em tampão mostram-se de acordo com ensaios de degradação *in vitro* em tampão fosfato, descritos na literatura. A Fig. 34 relaciona o decaimento da massa normalizada, calculado pela interpolação da degradação em NaOH, com os valores citados pela literatura. Os trabalhos comparados na Fig. 34 referem-se a amostras de PCL e PLGA (50/50) com geometrias diferentes (membranas, pinos), entretanto sugere que o protocolo de degradação acelerada proposto neste trabalho possui uma validação.

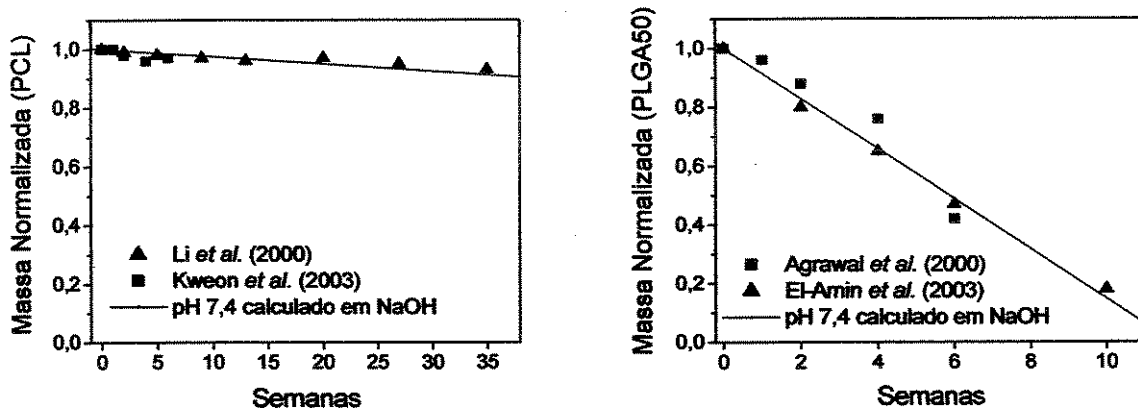


Figura 34 – Taxa de decaimento calculada da massa normalizada em pH 7,4 comparada aos dados da literatura.

6.2 Calorimetria Diferencial de Varredura na degradação em NaOH

O estudo da degradação em meio alcalino através da técnica de DSC mostrou variações significativas para as amostras de PCL e PLGA50. Os termogramas de DSC para amostras de PCL em diferentes concentrações de NaOH são mostrados na Fig. 35, sendo típicos de um material semicristalino. As amostras não degradadas apresentaram T_m entre 63 e 64 °C e, após resfriamento padronizado (10 °C/min), o material apresentou picos de cristalização em 25 °C, não mostrados nos termogramas (valores apresentados na Tab. 17). A T_g das amostras de PCL foi obtida no segundo aquecimento, em valores de aproximadamente -63 °C. Prosseguindo o segundo aquecimento, as amostras apresentaram novo pico de fusão em 56 °C. Através da variação da entalpia de fusão, de forma semelhante aos estudos anteriores, foi possível determinar o grau de cristalinidade das amostras.

Antes da degradação, as amostras de PCL possuem propriedades térmicas semelhantes aos valores obtidos para o estudo do efeito da lixiviação do sal (capítulo 4) e da degradação em tampão fosfato (capítulo 5). A analogia dos dados iniciais permite uma comparação entre os meios durante o processo de degradação.

Durante o período de 15 semanas de degradação *in vitro*, amostras de PCL imersas em água destilada (pH 7), não apresentaram variações significativas em suas propriedades. Em meios alcalinos, o comportamento das propriedades térmicas das amostras foi proporcional à concentração da solução de NaOH. De maneira geral, durante a degradação, T_g apresenta uma tendência de decaimento, e tanto T_m quanto o grau de cristalinidade uma tendência de aumento dos seus valores. Os valores de T_g , T_m e o grau de cristalinidade durante o período de degradação são apresentados nas Tab. 17 e 18.

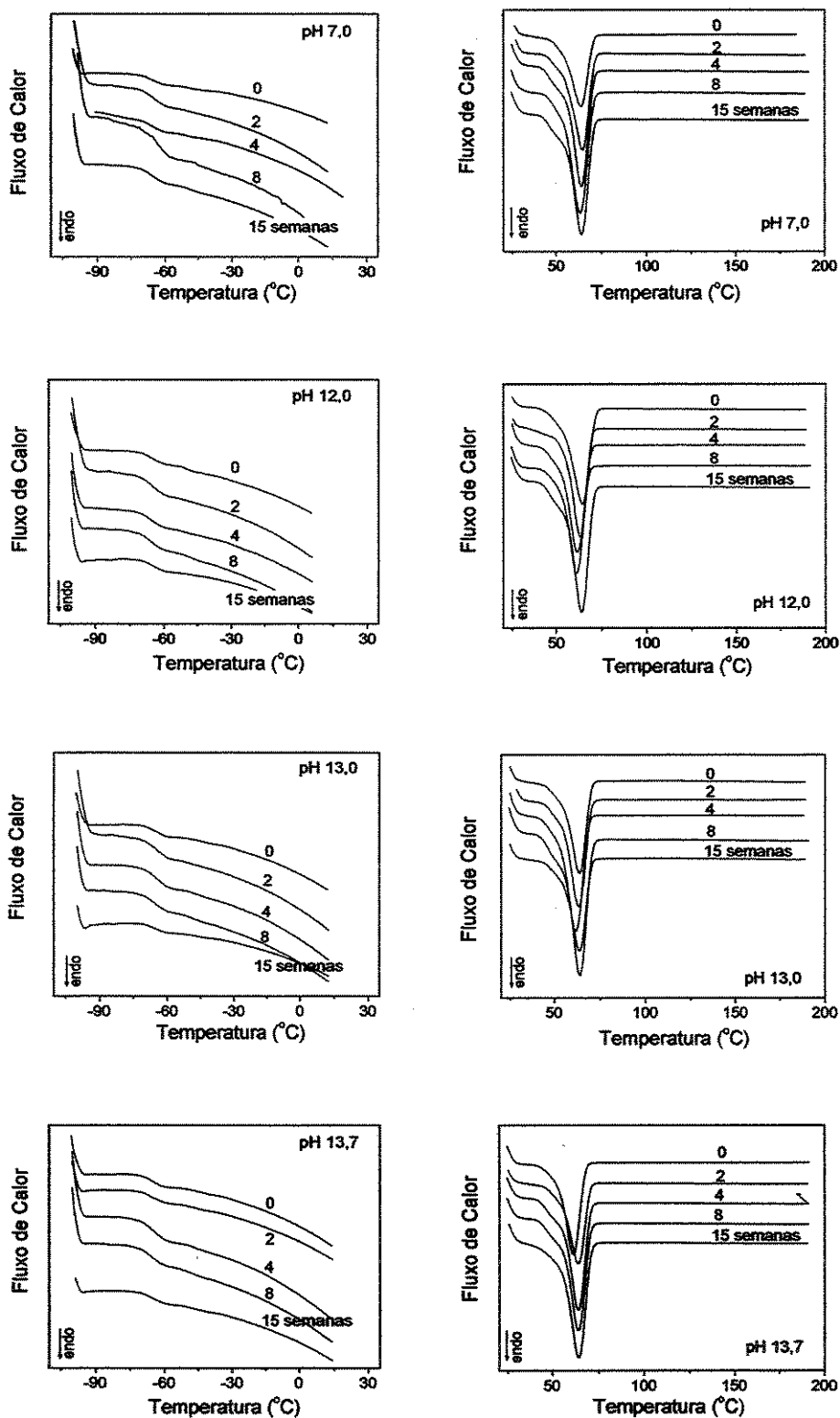


Figura 35 – Termogramas de DSC de amostras de PCL na degradação *in vitro* em NaOH. A coluna da esquerda mostra T_g no segundo aquecimento e a coluna da direita mostra T_m no primeiro aquecimento.

Tabela 17 – Dados de DSC no primeiro aquecimento de amostras PCL na degradação *in vitro* em meio alcalino NaOH. (Tg) temperatura de transição vítrea; (Tm) temperatura de fusão; (ΔH_m) variação da entalpia de fusão.

PCL												
pH	Tg ⁽²⁾ (°C)			Tm ⁽¹⁾ (°C)			ΔH_m ⁽¹⁾ (J/g)			Cristalinidade ⁽¹⁾ (%)		
	7	12	13	7	12	13	7	12	13	7	12	13
0	-63	-63	-63	64	64	63	84	84	84	60	60	60
2	-63	-63	-63	64	65	65	85	86	89	61	62	64
4	-63	-64	-64	65	65	66	84	89	92	60	64	66
8	-64	-64	-65	64	66	69	85	92	96	61	66	69
15	-63	-65	-66	65	66	70	85	93	98	61	67	70
(1) 1° aquecimento; (2) 2° aquecimento												

Tabela 18 – Dados de DSC no segundo aquecimento de amostras PCL na degradação *in vitro* em meio alcalino NaOH. (Tc) temperatura de cristalização; (Tm) temperatura de fusão; (ΔH_m) variação da entalpia de fusão.

PCL												
pH	Tc ^(R) (°C)			Tm ⁽²⁾ (°C)			ΔH_m ⁽²⁾ (J/g)			Cristalinidade ⁽²⁾ (%)		
	7	12	13	7	12	13	7	12	13	7	12	13
0	25	25	24	56	56	57	70	69	71	50	49	51
2	25	25	26	56	57	57	71	67	68	51	48	49
4	25	26	26	57	57	58	70	70	73	50	50	52
8	25	26	25	57	58	59	68	73	71	49	52	51
15	24	23	24	58	57	61	70	73	75	50	52	54
(R) Resfriamento; (1) 1° aquecimento; (2) 2° aquecimento												

A Fig. 36a a seguir, mostra a variação de Tg em função do tempo e do pH da solução de NaOH. De maneira geral, o decaimento de Tg mostra ser mais acentuado nas soluções de maior concentração, sendo muito semelhantes os valores obtidos pela variação entre pH 13 e 13,7 (decaimento de aproximadamente 3 °C). A diminuição tem sido atribuída, primordialmente, a dois fatores: a diminuição da massa molar e o conseqüente aumento da flexibilidade das cadeias, e também pela presença da água proveniente do meio de imersão, atuando como um plastificante no material (Duck *et al.*, 1999). Numa análise preliminar, as amostras de PCL, imersas em água destilada, não mostraram um efeito plastificante significativo, sugerindo que a diminuição observada em outros valores de pH, esteja ocorrendo pela degradação das cadeias macromoleculares.

A taxa de decaimento de Tg (°C/semana) correlacionada com o pH é apresentada pela Fig. 36b. A interpolação do valor em pH 7,4 forneceria o comportamento de decaimento para valores em pH fisiológico. Obtido o valor de -0,011 °C/semana da regressão linear, os valores são apresentados em comparação ao estudo do capítulo 5 (tampão fosfato) e aos dados da literatura (Coombes *et al.*, 2004) com longo tempo de degradação em tampão fosfato (Fig. 36c).

O comportamento de Tg mostra não ter um padrão linear que permita predizer sobre longos tempos de degradação. Fica difícil a comparação entre os valores apresentados neste capítulo com a literatura, ora pela ausência de dados na bibliografia específica com longos tempos de degradação de amostras de PCL, ora pela grande variação de meios, tipos de amostras de PCL e métodos de preparação.

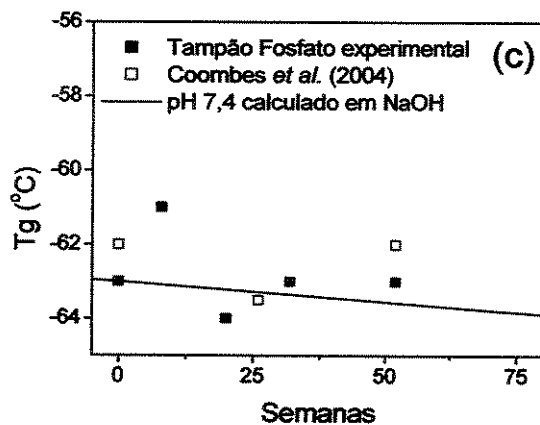
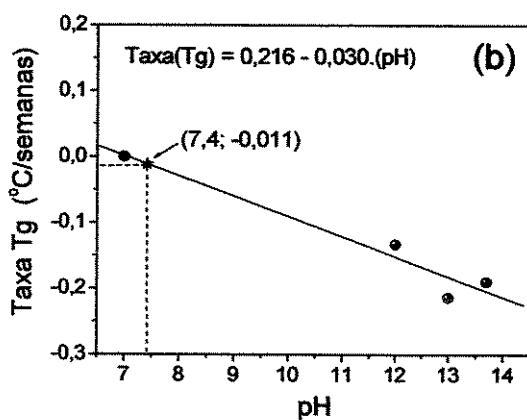
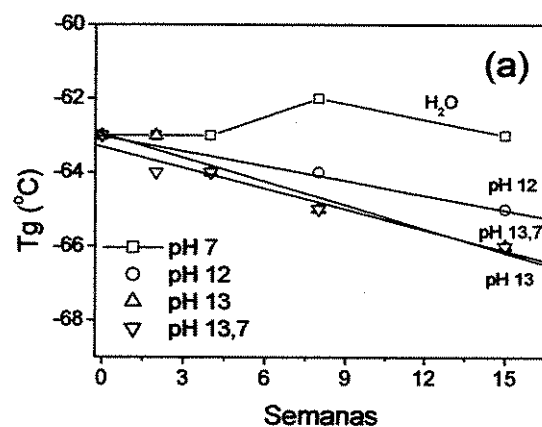


Figura 36 – (a) Variação de T_g , (b) taxa de decaimento em função do pH e (c) comparação da degradação *in vitro* de amostras de PCL em NaOH.

A avaliação de T_m durante o estudo da degradação em NaOH foi feita de forma análoga à descrita anteriormente. T_m apresenta um comportamento de aumento e, mostra ser mais acentuado com o aumento da concentração de NaOH (Fig. 37a). Apesar do aumento de T_m não demonstrar uma boa correlação linear (linha contínua em comparação à linha tracejada), os valores de aumento de T_m foram correlacionados para padronização das análises. Em estudos da degradação de fibras de polímeros bioreabsorvíveis em meio alcalino NaOH, Yuan *et al.* (2003) atribuem o aumento na temperatura de fusão à mobilidade das cadeias de menor massa molar e ao conseqüente aumento na “perfeição” dos cristais. A comparação dos resultados obtidos pela degradação *in vitro* em NaOH em pH 7,4, mostra valores intermediários entre o estudo da degradação em tampão fosfato (capítulo 5) e os dados de degradação publicados por Coombes *et al.* (2004).

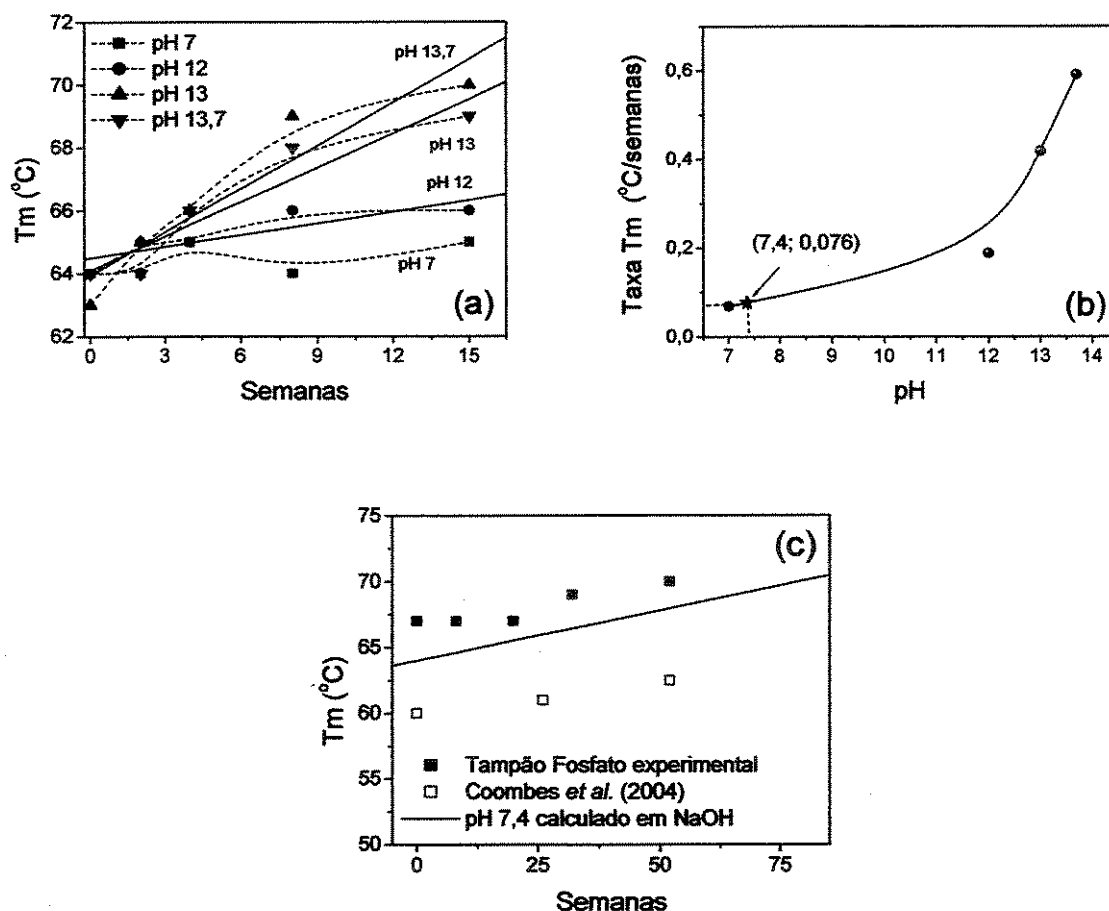


Figura 37 – (a) Variação de T_m , (b) taxa de decaimento em função do pH e (c) comparação da degradação *in vitro* de amostras de PCL em NaOH.

A Fig. 38 mostra o grau de cristalinidade das amostras de PCL, obtido pela relação entre as variações de entalpia. Com exceção das amostras imersas em água destilada (pH 7), os resultados indicam um aumento do percentual do grau de cristalinidade (Fig. 38a) diretamente proporcional ao aumento da concentração da solução de NaOH. Não há diferenças significativas entre o aumento das amostras imersas em pH 13 e 13,7.

A literatura tem atribuído o aumento do grau de cristalinidade dos polímeros bioreabsorvíveis à disposição espacial das cadeias poliméricas, influenciando na taxa de absorção de água pelo material. 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 (Li, 1999). Dessa forma, há um aumento porcentual da porção cristalina e pela formação de novos cristais, através do rearranjo das cadeias de menor massa molar, originadas no processo de degradação (Duek *et al.*, 1999).

Utilizando-se a mesma metodologia empregada anteriormente, e através da regressão linear dos valores experimentais, foi obtida, pela interpolação dos dados, a taxa de aumento do grau de cristalinidade em função do pH das amostras. A interpolação dos dados, apresentados na Fig. 38b, mostra uma taxa de acréscimo de 0,077 %/semana em pH 7,4. Comparado com os resultados experimentais da degradação em tampão fosfato (Fig. 38c), e com os valores publicados por Coombes *et al.* (2004), o modelo proposto se aproxima mais dos resultados da literatura do que os valores obtidos pelo nosso experimento em tampão.

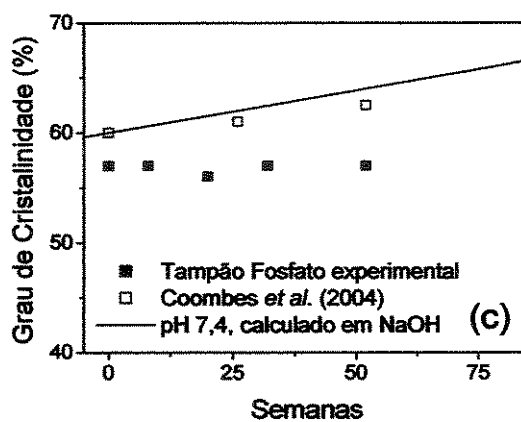
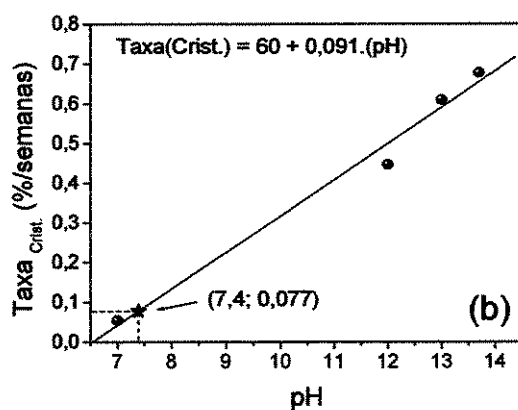
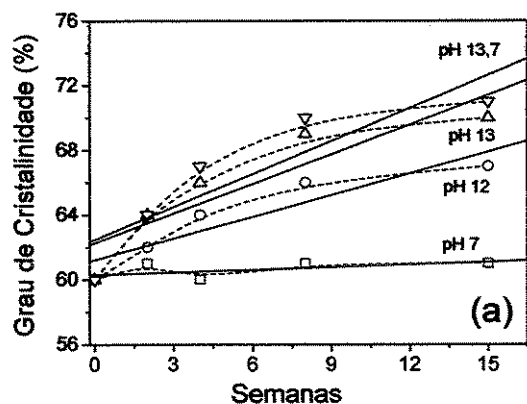


Figura 38 – (a) Variação do grau de cristalinidade no primeiro aquecimento, (b) taxa de aumento em função do pH e (c) comparação da degradação *in vitro* de amostras de PCL em NaOH.

Para amostras de PLGA50, os resultados da análise de DSC são apresentadas pelos termogramas da Fig. 39 e pelos dados da Tab. 19. Os valores de Tg foram obtidos tanto no primeiro como no segundo aquecimento, apresentando-se próximos: 44 °C no primeiro aquecimento e 42 °C no segundo. Durante o processo de degradação, a análise da variação das propriedades térmicas das amostras de PLGA50 foram feitas usando-se os valores do segundo aquecimento, pois a presença da relaxação de tensão molecular no primeiro aquecimento pode ser suficiente para deslocar o valor da temperatura na curva de DSC (Lucas *et al.*, 2001).

Tabela 19 – Dados de DSC de amostras PLGA50 na degradação *in vitro* em meio alcalino NaOH. (Tg) temperatura de transição vítrea; (Tm) temperatura de fusão.

PLGA50												
pH	Tg ⁽¹⁾ (°C)				Tg ⁽²⁾ (°C)				Tm ⁽¹⁾ (°C)			
	7	12	13	13,7	7	12	13	13,7	7	12	13	13,7
Semanas	0	44	44	44	44	42	42	42	42	-	-	-
	1	42	42	41	41	35	43	39	37	-	-	-
	2	39	36	37	39	28	33	22	24	-	-	-
	3	33	30	23	24	22	18	13	17	-	-	-

(1) 1º aquecimento; (2) 2º aquecimento; (-) não observado.

A Fig. 40a mostra a variação de Tg para as amostras de PLGA50 em função do pH da solução de NaOH. O cálculo da taxa de decaimento de Tg durante o processo de degradação é representado pela Fig. 40b. Verifica-se tanto pela regressão linear dos dados, como pela curva média, que os valores para o pH 7,4 calculado e experimental divergem em 2 °C/semana. Comparados a literatura, a curva obtida para a degradação de amostras de PLGA50 em pH 7,4 acompanha a tendência de decaimento.

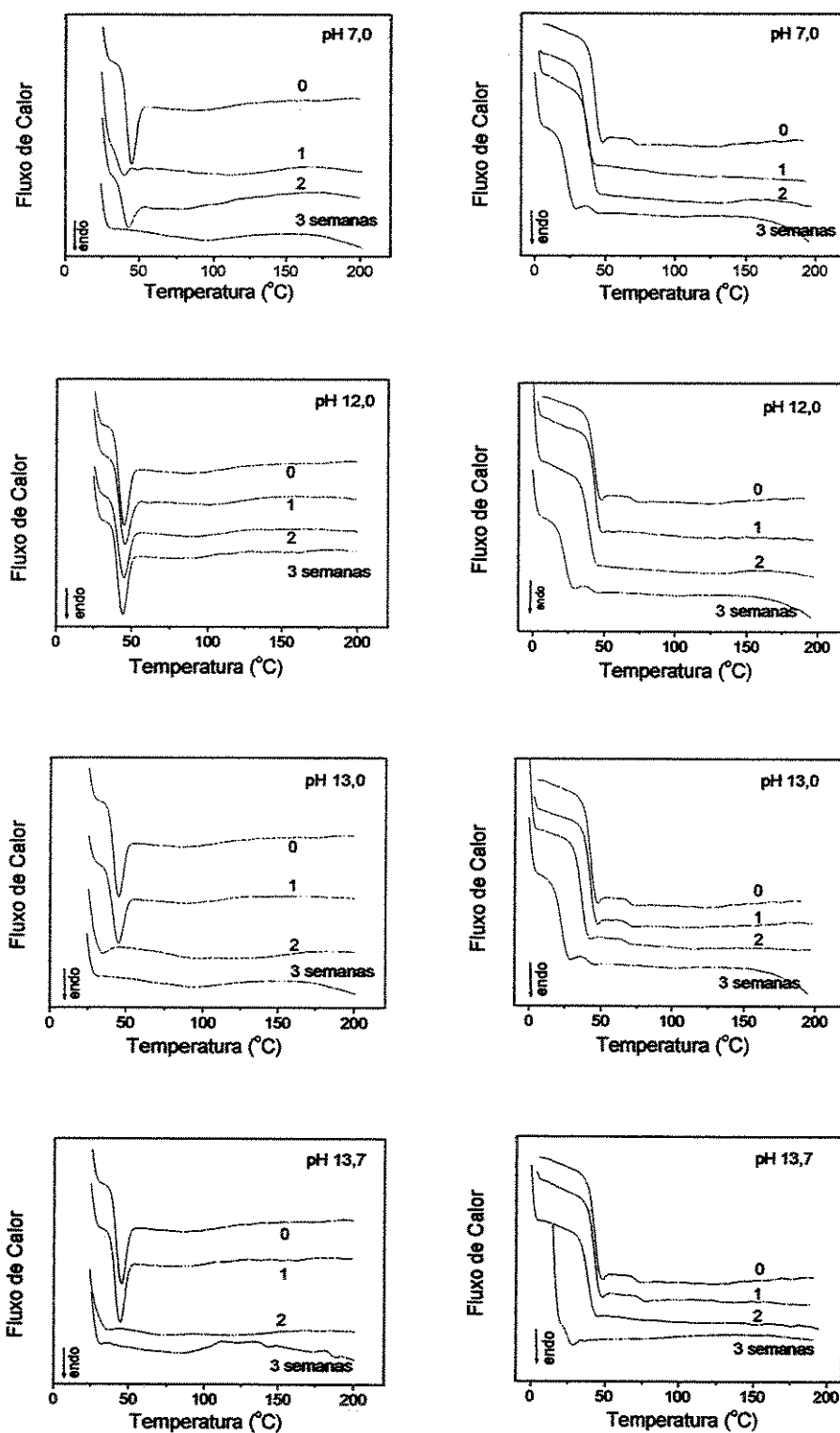


Figura 39 – Termogramas de DSC de amostras de PLGA50 na degradação *in vitro* em NaOH (pH 7, 12, 13 e 13,7). A coluna da esquerda mostra Tg no primeiro e a da direita no segundo aquecimento.

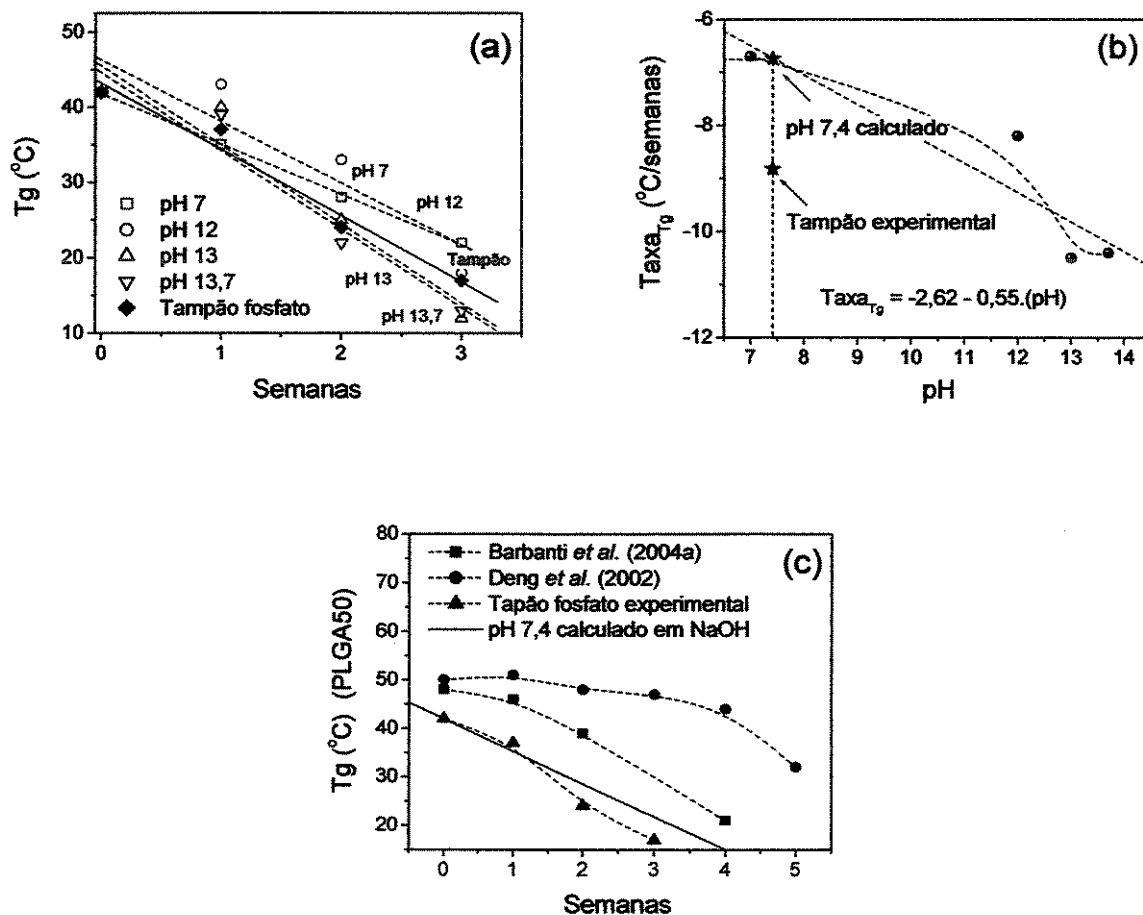


Figura 40 – (a) Variação de T_g , (b) taxa de decaimento e (c) comparação de modelo com valores em tampão fosfato em amostras de PLGA50 na degradação *in vitro* em NaOH.

6.3 Microscopia eletrônica de varredura na degradação em NaOH

A microscopia eletrônica de varredura das amostras densas de PLGA50 e PCL na degradação em NaOH está representada pela Fig. 41. Devido ao grande número de amostras e micrografias optou-se por apresentar as que melhor representavam o processo de alteração morfológica.

As Fig. 41A a 41D representam amostras de PLGA50 imersas em solução de NaOH, pH 13,7, durante o período de 0 a 3 semanas. A micrografia 41A (detalhe em 41E) se assemelha morfológicamente às amostras densas de PLGA50, descritas no estudo do efeito da retirada do sal

(capítulo 4). O material mostra-se com morfologia densa, compacta, sem a presença de poros em sua extensão. Durante o processo de degradação *in vitro*, amostras com uma semana de degradação apresentaram erosão superficial (Fig. 41B, aumento em 41F), gradativa e proporcionalmente ao tempo de imersão. Pontos de erosão podem ser observados em seu interior (Fig. 41C - aumento em 41G, e 41D - aumento em 41H). O efeito da erosão interna é novamente verificado, sendo mais acentuado no período de 2 e 3 semanas (micrografias 41C e 41D, respectivamente).

As amostras de PCL imersas em meio NaOH, pH 13, estão representadas pelas Fig. 41I a 41L. A morfologia das amostras não degradadas (Fig. 41I) é semelhante às amostras de PLGA50: densas, sem a presença de poros na superfície e no interior. Com 4 semanas de degradação *in vitro* (Fig. 41J), as amostras apresentam uma degradação superficial, verificada também com 8 semanas (Fig. 41K) de degradação. Em 8 semanas, a degradação é superficial, entretanto em maior intensidade. Após 15 semanas de degradação em meio alcalino, as amostras de PCL apresentaram-se com diversas zonas de erosão, irregulares (mostrado em maior aumento na Fig. 41L).

A análise das amostras por microscopia eletrônica de varredura no estudo da degradação *in vitro* em meio alcalino não se mostrou útil na tentativa de utilizar o ensaio para prever as propriedades morfológicas das amostras de PCL e PLGA50. A variação dos resultados foi significativa, e em alguns grupos, conflitantes com os resultados de variação de massa.

Entretanto, os resultados morfológicos em comparação com a literatura têm mostrado aplicações promissoras na modificação da superfície de polímeros bioreabsorvíveis tratados com NaOH. Num recente estudo, Park *et al.* (2005) avaliaram suportes de PLGA (50/50) tratados previamente com NaOH nas funções celulares de condrócitos. Amostras porosas foram preparadas pelo processo de evaporação do solvente com adição e lixiviação do sal (partículas superiores a 250 μm), com imersão em solução 1 mol/L de NaOH por 10 min. A caracterização dos suportes mostrou um aumento significativo da porosidade e da área superficial nas amostras tratadas pela solução alcalina. Usando as amostras como suporte para cultura de condrócitos, o estudo mostrou um aumento na adesão, proliferação e síntese de matriz extracelular, como o colágeno total e glicosaminoglicanas (GAGs) durante 7 dias de cultura. As propriedades melhoradas do suporte são atribuídas às propriedades químicas e morfológicas (como a

rugosidade) da superfície e conseqüente resposta celular. Gao *et al.* (1998) mostraram que o tratamento de amostras de PGA com NaOH promove a exposição dos terminais carboxi-ácidos na superfície do material, aumentando assim a sua hidrofilicidade.

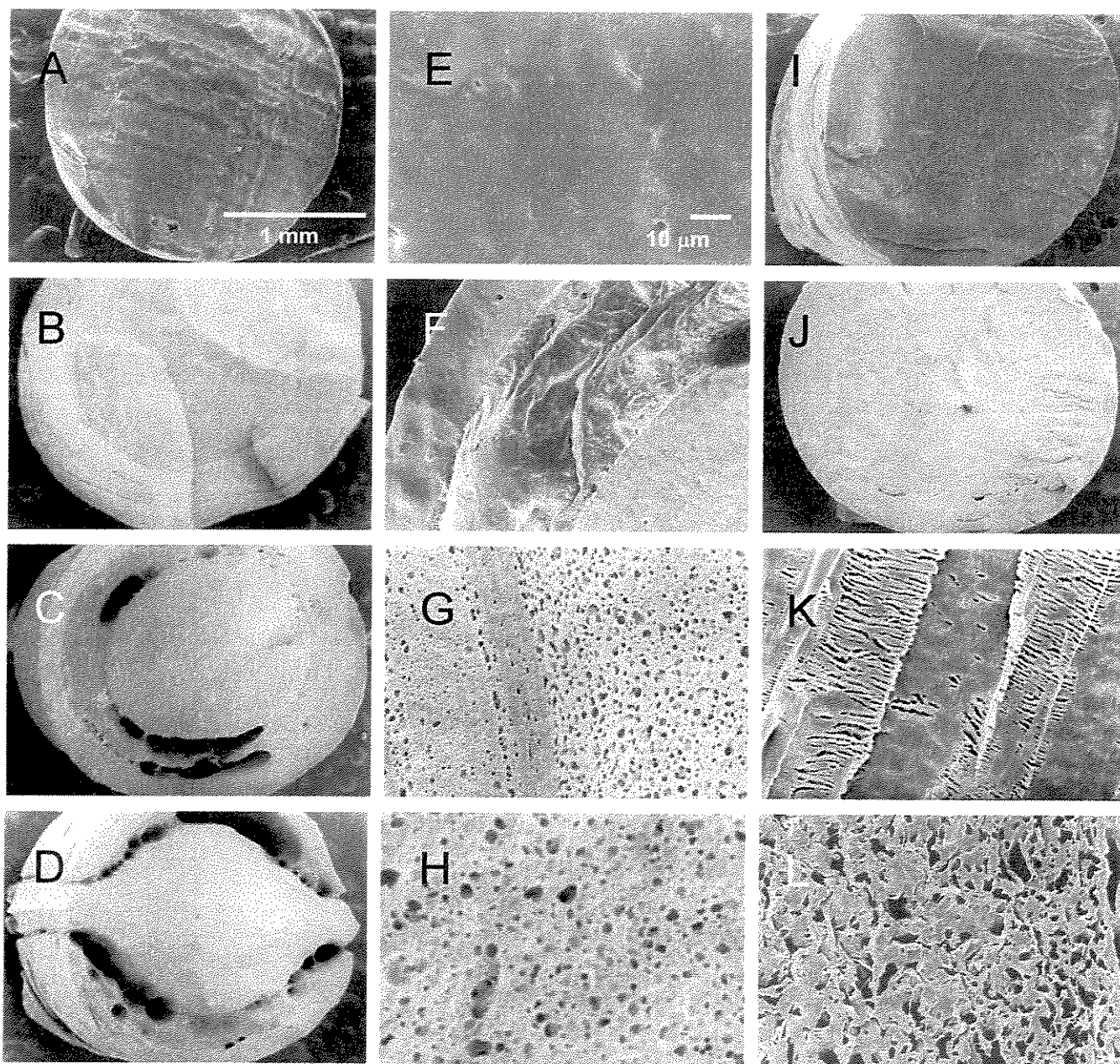


Figura 41 – Micrografias eletrônica de varredura de amostras densas de PLGA50 (A a H) e PCL (I a L) preparadas pela técnica de fusão e degradadas em meio NaOH. Barra de escala em (A) é igual as das figuras (B, C, D, I, J) e em (E) igual a (F, G, H, K, L).

6.4 Conclusões parciais

O estudo da degradação *in vitro* em meio alcalino representa uma alternativa aos tradicionais estudos de degradação com tampão fosfato (Li *et al.*, 2000; Yaum *et al.*, 2003). O baixo custo do ensaio e a possibilidade de variação das concentrações tornam seu uso versátil na avaliação das propriedades dos suportes de polímeros bioreabsorvíveis (Cam *et al.*, 1995). Nas amostras de PCL, a presença do íon hidróxido no meio é considerado como um importante enfoque de análise bioquímica do processo de degradação de implantes (Woodward *et al.*, 1985; Ali *et al.*, 1993b).

O método proposto neste capítulo buscou suprir a necessidade de uma avaliação mais rápida de materiais com longo tempo de degradação. A predição do comportamento do PCL foi adequada em propriedades de perda de massa e térmicas, avaliadas pela técnica de DSC. Amostras com curto tempo de degradação, tais como as de PLGA50, divergiram com os resultados apresentados pela literatura, e podem ser atribuídos, numa primeira análise, ao efeito do meio tamponado. A comparação com os dados da literatura também mostrou-se difícil pela escassez dos dados publicados.

A validade dos resultados e da metodologia de análise pode ser melhorada, seja pela presença de um maior número de amostras em diferentes tempos de coleta, seja pela melhor dispersão dos valores de pH, concentrados aqui entre 12 e 13,7. Um acompanhamento mais longo da degradação em tampão fosfato também mostrou-se fundamental para a comparação dos resultados entre os meios de degradação.

Capítulo 7

Cultura de células

O desenvolvimento de biomateriais capazes de direcionar o comportamento celular é, atualmente, uma área de pesquisa que avança rapidamente. A aplicação de polímeros bioreabsorvíveis como materiais de suporte para cultura de células tem tido destaque em diversas áreas de aplicação médica, sobretudo na área ortopédica, na qual numerosos compostos vem sendo desenvolvidos e testados com células osteoblásticas (Agrawal *et al.*, 2001 e Nakagawa *et al.*, 2004). Neste capítulo são apresentados os dados de cultura de osteoblastos humanos sobre amostras de suportes porosos de PCL e PLGA50 preparados pelo método de fusão com adição e lixiviação do sal.

7.1 Adesão de osteoblastos

Os resultados obtidos pelo teste de adesão celular de osteoblastos indicaram que as amostras analisadas apresentaram adesão intermediária entre o controle negativo e positivo (Fig. 42 a seguir). No teste ANOVA, o resultado mostrou amostras significativamente diferentes ($F = 37,83858$, $p = 0,000001779$). Newman-Keuls indicou que o controle positivo (placa de polipropileno) e negativo (Teflon®) foram significativamente diferentes ($p < 0,01$) entre si e em relação às amostras analisadas.

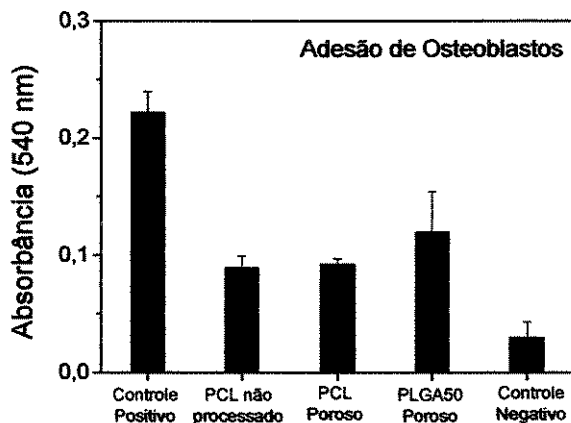


Figura 42 – Teste de adesão celular das amostras de PCL e PLGA50 preparadas pelo método de fusão. (Controle negativo) membranas de Teflon®, (Controle positivo) placa de polipropileno.

A primeira interação entre a célula e o substrato sintético é a adesão celular. O termo *adesão* envolve 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 as forças de dipolo induzido e permanente. A etapa seguinte é mais longa e estável, proteínas da matriz, ou da própria membrana plasmática, são depositadas e adsorvidas pelo material. Neste contexto, a interação entre as células e o material sintético depende, fundamentalmente, das características da superfície do material. A topografia, as propriedades químicas e a energia de superfície, determinam como as moléculas biológicas serão adsorvidas, influenciando nas etapas subsequentes de espalhamento, proliferação e diferenciação celular (Anselme, 2000).

A influência das características de superfície do suporte de cultura tem sido avaliada de forma inter-relacionada. A topografia da superfície de amostras lisas e rugosas mostra ter influência na adesão e proliferação das células (Boyan *et al.*, 1996). No experimento realizado com suportes de PCL e PLGA50, a variação da topografia, avaliada através das amostras não processadas e porosas de PCL, não mostrou diferenças significativas. A semelhança estatística entre elas nos permite inferir a respeito do processamento do material, sugerindo não ter influência, neste caso, na cultura de células. Superfícies lisas, geralmente facilitam a adesão

quando comparadas às rugosas, entretanto a invasão celular é maior nos substratos porosos (Böstman *et al.*, 2000).

Em relação à composição química, a hidrofobicidade/hidrofilicidade das amostras é também um parâmetro decisivo na característica da adesão celular (Dewez *et al.*, 1998). Substratos hidrofílicos, ou carregados eletricamente, facilitam a taxa de absorção de água pelo material, aumentando a interação celular. Amostras de PCL (Tang *et al.*, 2004) e de PLGA (Ishaug-Riley *et al.*, 1997) são descritas com características hidrofóbicas, sendo a hidrofobicidade mais intensa nas amostras de PCL devido à presença da cadeia de 5 carbonos. Adicionalmente, polímeros amorfos, como o PLGA50, facilitam a penetração e absorção de água quando comparados aos materiais semicristalinos (PCL) (Sung *et al.*, 2004). Barbanti *et al.* (2004a) mostraram que os osteoblastos têm um padrão bastante lento de adesão sobre membranas semicristalinas de PLLA, quando comparados às amostras de PLGA (50/50). Em adição a esses resultados, estudos com osteoblastos cultivados sobre filmes PLGA demonstram o aumento na atividade da enzima fosfatase alcalina, atribuído a mineralização da matriz óssea (Ishaug *et al.*, 1997; Ishaug-Riley *et al.*, 1998 e Sung *et al.*, 2004). Apesar de não ser significativo neste ensaio, os resultados da Fig. 42 mostra uma maior adesão das amostras porosas de PLGA50 quando comparadas às análogas de PCL, e poderiam ser justificados pela diferença de composição química e pela cristalinidade dos materiais (Mikos *et al.*, 1993b e Barbanti *et al.*, 2004a).

O fato do teste de adesão celular não ter se mostrado semelhante ao controle positivo não significa, necessariamente, uma baixa adesividade. Adiante, as análises das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostram um grande número de células aderidas nas amostras estudadas. Em nosso experimento, o tempo do teste de adesão é padronizado em função do controle positivo. Em protocolos com tempo maiores para a avaliação da adesão, as células iniciam a sua multiplicação sobre o substrato (Sung *et al.*, 2004). A adesão lenta a substratos sintéticos é um fenômeno amplamente descrito na literatura (Lombello *et al.*, 2002 e Santos *et al.*, 2004), e os resultados apresentados sugerem que este fenômeno ocorre sobre amostras porosas de PLGA50 e PCL.

Atualmente, novas abordagens têm sido propostas para facilitar a adesão de osteoblastos. As técnicas envolvem a mudança da composição do meio de cultura (Coelho *et al.*, 2000) e 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) aos polímeros bioreabsorvíveis tem sido amplamente utilizada para aumentar a produção de matriz óssea em relação aos controles (Whang *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2004 e Rai *et al.*, 2005).

7.2 Microscopia eletrônica de varredura com microanálise por espectrometria de energia dispersiva de raios-x (EDS)

A Fig. 43 mostra a análise de microscopia eletrônica de varredura para os diferentes suportes utilizados neste trabalho. Cultivadas por 24 h, as células osteoblásticas mostraram um padrão diferenciado de crescimento e morfologia. Sobre as lamínulas de vidro (Fig. 43A e 43B), o grupo controle mostra células semiconfluentes aderidas ao substrato. As células dispõem-se como uma monocamada, mostraram morfologia irregular com formas alongadas e grande quantidade de prolongamentos celulares longos e finos na sua superfície. Vistas em maior aumento (Fig. 43B) observam-se células ligadas umas às outras através de diversos filopódios, além de estruturas que se assemelham a microvilosidades e/ou vesículas por toda superfície celular.

Sobre amostras de PCL não processado (Fig. 43C e 43D) as células mostraram-se alongadas, aderidas ao substrato, entretanto em menor quantidade quando comparadas ao controle da lamínula. Nas amostras porosas de PCL a superfície do material é inteiramente coberta pelos osteoblastos, mostrando um padrão de semiconfluência, as quais estão firmemente aderidas e espalhadas sobre o substrato (Fig. 43E e 43F). As células mostram-se com morfologia plana, e em muitos pontos, observam-se células próximas, sugerindo comunicação intercelular. A Fig. 43E mostra sobre o material, células com abundante quantidade de vesículas, as quais sugerem a deposição de material orgânico.

Sobre as amostras porosas de PLGA50, as células osteoblásticas mostraram-se confluentes e bastante aderidas ao substrato. A morfologia celular predominantemente encontrada foi a

achatada (Fig. 43G e 43H), semelhante ao do controle sobre as lamínulas. O depósito de vesículas presentes nas amostras porosas de PCL não é observado com a mesma intensidade, entretanto, as células apresentam filopódios e proliferam sobre os poros de modo a ocupar toda a superfície do suporte estudado (Fig. 43H).

Uma vez estabelecida a adesão sobre o substrato, as células passam a responder a ele, alterando a sua morfologia, crescimento, proliferação e seu padrão de diferenciação (Santos *et al.*, 2001b). A morfologia das células, descritas nesse trabalho nas condições controle, apresentaram um padrão semelhante ao reportado por Pinho *et al.* (2004) no cultivo de osteoblastos sobre lamínulas de vidro e matriz óssea desmineralizada. Entretanto, quando cultivadas sobre amostras porosas de PCL, as células mostraram uma diferenciação na sua forma, ora com morfologia achatada, ora alongada ou discóide. Células achatadas sugerem grande interação celular com substrato (Dunn, 1999) e indicam que as amostras porosas de PCL obtidas pelo processo de fusão com adição e lixiviação de sal, são promissoras para o estudo da viabilidade no desenvolvimento de dispositivos voltados para a engenharia de tecidos ósseos.

O aparecimento de vesículas na superfície celular sugere um aumento na atividade metabólica das células sobre amostras porosas de PLGA50 e PCL. As interações celulares, representadas pelos filopódios, permitem às células aderirem umas às outras, estabelecendo relações entre si e conferindo aos tecidos, força e resistência à força de ruptura. Estas interações devem-se às moléculas de adesão celular (CAMs) (*cell-adhesion molecules*), proteínas na membrana que através de proteínas intracelulares de ligação, formam âncoras com o citoesqueleto celular. A variação na morfologia das células observadas nas amostras porosas de PCL e PLGA50 podem ser atribuídas à variação do comprimento dos filamentos do citoesqueleto de actina, que produz uma flexibilidade organizacional, permitindo que a célula assuma diversas formas, podendo variá-las com facilidade (El-Amin *et al.*, 2003).

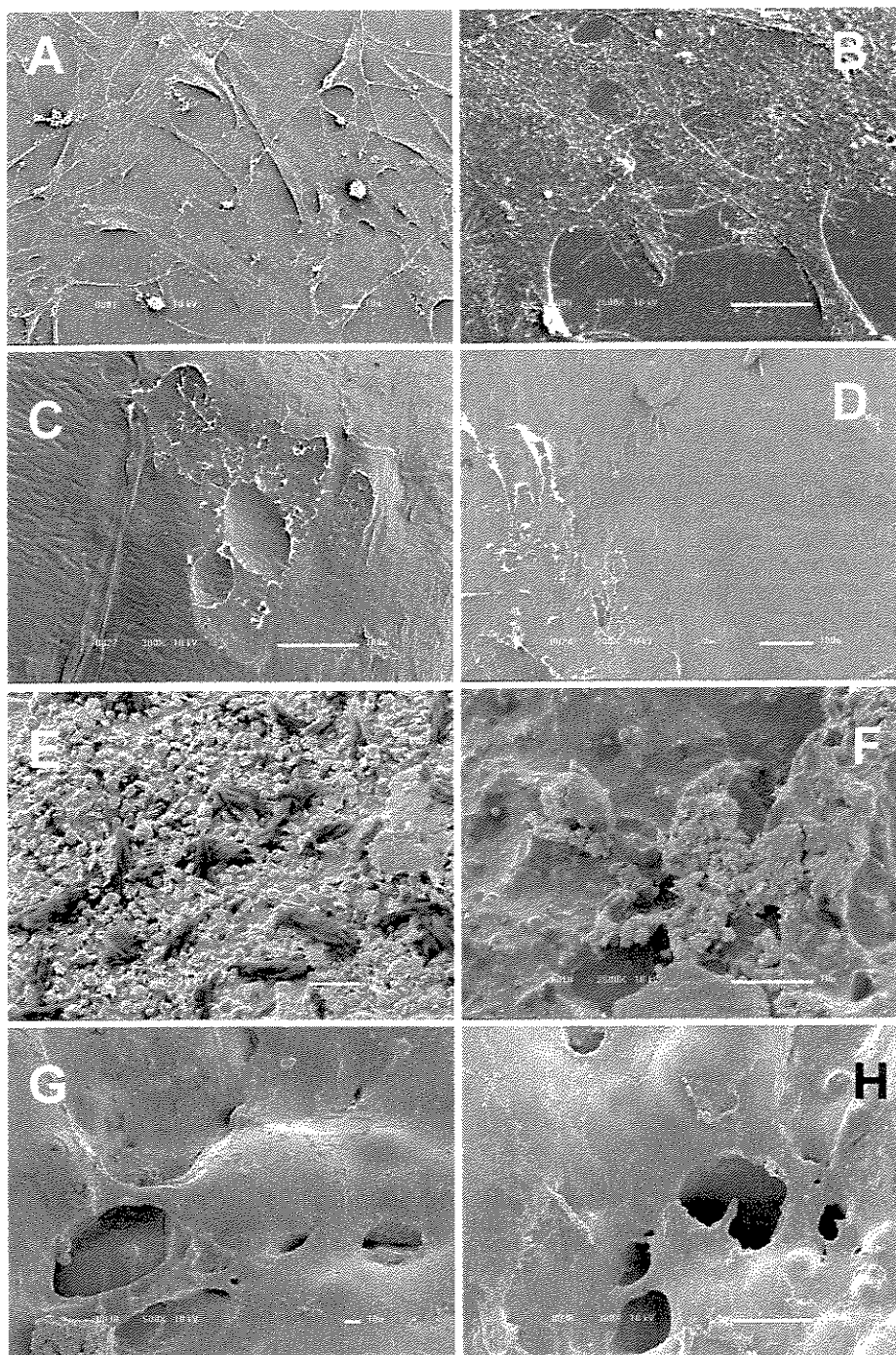


Figura 43 - Micrografias eletrônica de varredura dos osteoblastos hFOB 1.19 cultivados sobre os diferentes suportes. Em (A) e (B) células sobre laminulas de vidro; (C) e (D) PCL não processado; (E) e (F) PCL poroso; (G) e (H) PLGA50 poroso.

Durante a análise por microscopia eletrônica de varredura, foram observados grânulos cristalinos depositados na superfície das amostras. A diferenciação morfológica dos grânulos seria puramente especulativa, por isso a análise de espectrometria de energia dispersiva de raios-x (EDS) foi realizada para a caracterização das amostras. A análise por EDS, apresentada na Fig. 44, mostra diferentes elementos químicos presentes. A presença do ouro é atribuída à metalização das amostras para a microscopia eletrônica e a do silício sugere uma provável adsorção deste elemento durante o armazenamento do material, feito em dessecador a vácuo com sílica.

Comparados ao controle, os grânulos presentes nas amostras de PCL e PLGA50 não apresentaram na sua composição íons cálcio em quantidades significativas. No período estudado, a atividade celular dos osteoblastos não mostrou deposição mineral de cálcio sobre as células nos diferentes substratos, demonstrando não haver uma diferenciação precoce dos osteoblastos. A deposição de sais de cálcio sobre suportes sintéticos é, normalmente, detectada com cerca de 20 dias de cultura (Moreira *et al.*, 2004). Sobre matrizes ósseas desmineralizadas e suportes de polímeros bioreabsorvíveis incorporados com fatores de crescimento, observa-se a deposição de sais de cálcio precocemente, entretanto os suportes possuem uma série de fatores capazes de estimular fortemente a diferenciação osteoblástica.

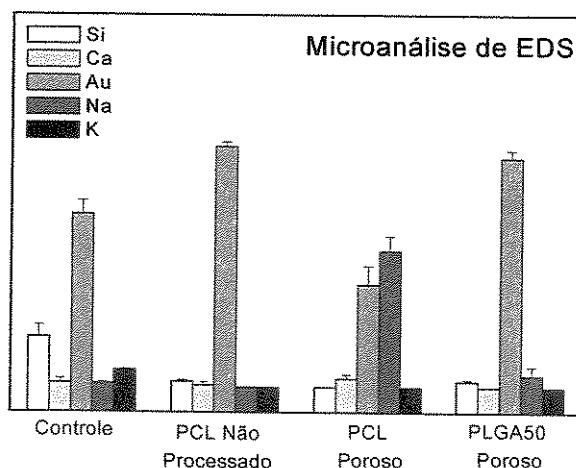


Figura 44 - Análise por espectrometria de energia dispersiva de raios-x.

7.3 Conclusões parciais

Os resultados da cultura de células sobre suportes porosos de PCL e PLGA50 preparados pela técnica de fusão com adição e lixiviação do sal indicaram serem capazes de promover a adesão, crescimento e proliferação sobre as amostras. A literatura descreve os fenômenos da adesão, crescimento e proliferação celular, como eventos inter-relacionados, mas não exclusivamente dependentes. A baixa adesão dos testes de cultura celular não implica necessariamente numa baixa proliferação. Assim, a avaliação *in vivo* dos suportes mostra-se necessária para o entendimento de como o local do implante e as condições orgânicas respondem à presença dos materiais.

Capítulo 8

Estudo *in vivo*

Aplicados aos suportes de polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos, o estudo *in vivo* representa a avaliação das amostras em sistemas complexos e que interagem entre si. Nos protocolos de desenvolvimento de biomateriais é uma etapa obrigatória e fundamental.

8.1 PLGA50 - Análise histológica

A análise histológica dos implantes densos de PLGA50, no período de 2 dias, mostra a região clara correspondente ao espaço ocupado pelo material sintético, sendo possível observar uma invasão celular. Ao redor do local do implante, observam-se células de medula óssea com vasos sanguíneos e células gordurosas (Fig. 45A). O implante de mesmo período de suportes porosos mostra a cavidade produzida pela inserção do material. Há invasão celular da medula óssea, entretanto não observa-se a formação de neotecido (Fig. 45B).

No período de 2 semanas, a análise das lâminas com implantes de suportes densos mostra a presença de células fusiformes provenientes do endóstio no limite da região lesada (camada cortical) (Fig. 45C). Da amostra de 4 animais implantados com suportes densos de PLGA50, dois apresentaram inchaço na região do implante. A Fig. 45D mostra a fotomicrografia do implante de suportes porosos de PLGA50 com 2 semanas de pós-operatório. A cavidade produzida para o implante do polímero está ocupada por células da medula óssea e verifica-se a presença de

células fusiformes provenientes do endósteo, com morfologia semelhante aos implantes de suporte denso.

Após 4 semanas pós-operatórias, as fotomicrografias de implantes densos de PLGA50 mostram a área de falha da camada cortical preenchida por neotecido. O implante do suporte polimérico não é mais observado, sugerindo sua bioreabsorção. Dentre os tecidos formados, verifica-se a presença de tecido rico em elementos de medula óssea e depósito de fibrina. Nota-se áreas com centro de ossificação primária no local do implante, com a presença de vasos sanguíneos e celularidade intensa (Fig. 45E). Em relação ao implante de PLGA50 poroso (Fig. 45F) é possível verificar a formação de tecido ósseo primário, contínuo com a cortical, na região da falha, ocupando toda a região de implante do suporte. O tecido ósseo primário está separado do tecido ósseo secundário da cortical pela linha cimentante. Observam-se osteoblastos recém aprisionados pela matriz óssea, característica de tecido ósseo primário.

Com 8 semanas de implante, a análise histológica das amostras de suportes densos (Fig. 45G) e porosos (Fig. 45H) não mostraram diferenças significativas entre a morfologia do material. Em ambos observa-se que a falha produzida foi preenchida por tecido ósseo primário com fibras dispostas em várias direções sem organização definida, com muitos osteócitos aprisionados, e com continuidade com a cortical na região da falha. O tecido primário formado com 4 semanas de implante sugere ser, gradativamente, substituído por tecido ósseo secundário, caracterizado por fibras organizadas em lamelas. As lamelas observadas estão dispostas em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, sugerindo a formação dos sistemas de Havers.

Nos implantes de suportes densos e porosos de PLGA50 após 12 semanas pós-operatórias, não foi localizado o limite da falha na região cortical para colocação dos suportes, sugerindo que o osso encontra-se em seu estado íntegro, regenerado (fotomicrografia não apresentada).

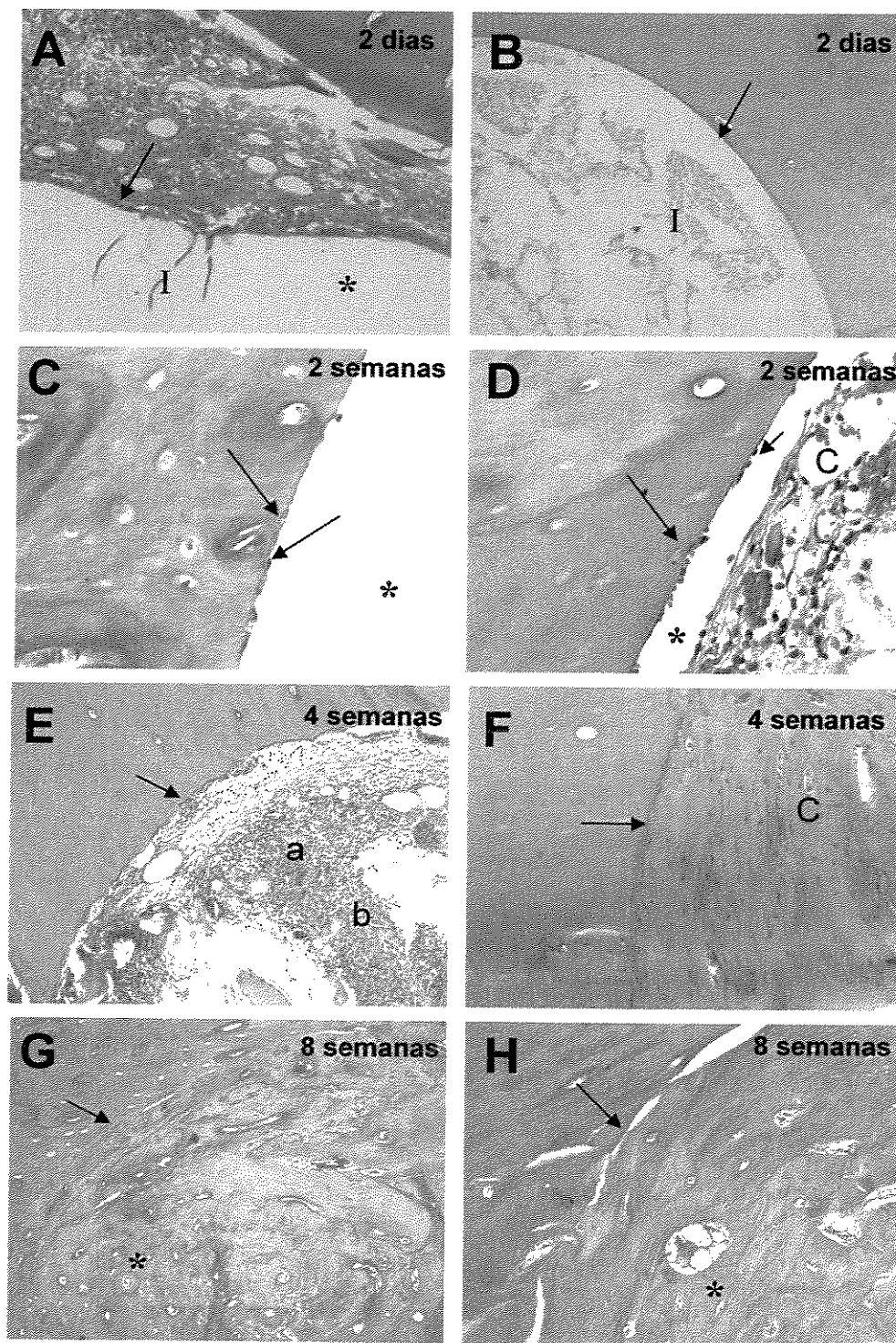


Figura 45 - Corte longitudinal do implante de suportes PLGA50 em tíbia de ratos Wistar. (A, C, E, G) denso. (B, D, F, H) poroso. Aumento (A, F) 200x; (B, E, G, H) 100x; (C, D) 400x. Observa-se: (*) a falha para implante; (setas) células fusiformes provenientes do endóstio e linha cimentante; (C) capilares sanguíneos; (I) invasão celular; (a) elementos de medula óssea; (b) depósito de fibrina. HE.

8.2 PCL - Análise histológica

A análise histológica dos cortes de tibia implantada com suportes densos de PCL mostrou, após 2 dias, a presença células fusiformes na interface entre o material sintético e o biológico, sem a ocorrência de invasão celular (Fig. 46A). Nas fotomicrografias obtidas das amostras de suportes porosos (Fig. 46B) observa-se a integridade do implante, entretanto com a formação de uma malha de fibrina, causada pela coagulação sanguínea após o procedimento cirúrgico traumático do local.

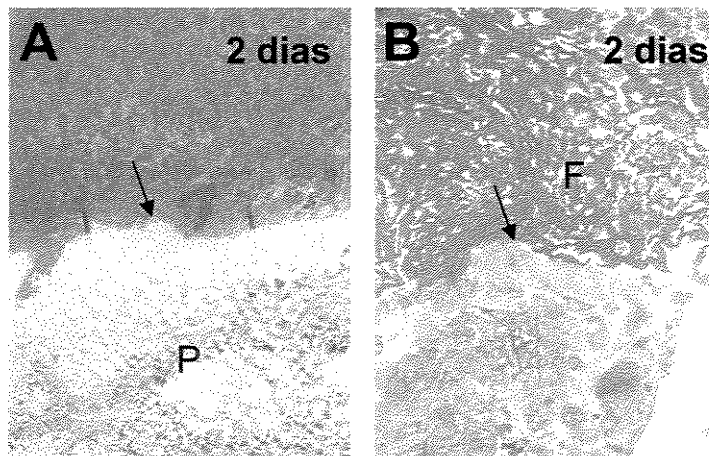


Figura 46 - Corte transversal do implante de suportes de PCL em tibia de ratos Wistar com 2 dias pós-operatórios. (A) denso, aumento 200x, (B) poroso, aumento 400x. Observa-se: (P) a presença do suporte polimérico; (setas) limite da falha para o implante; (F) malha de fibrina causada pela coagulação. Azul de toluidina.

Com 2 semanas pós-cirúrgicas de implante, as amostras densas de PCL apresentaram a formação de tecido ósseo imaturo (Fig. 47A). Nos suportes porosos, a grande quantidade de células sanguíneas, indica uma área hemorrágica em decorrência da lesão realizada para colocação do implante (Fig. 47B). Não foi observada invasão celular nas amostras analisadas. Com 4 semanas pós-operatórias, suportes densos (Fig. 47C) e porosos (Fig. 47D) de PCL apresentaram células fusiformes circundando o material sintético.

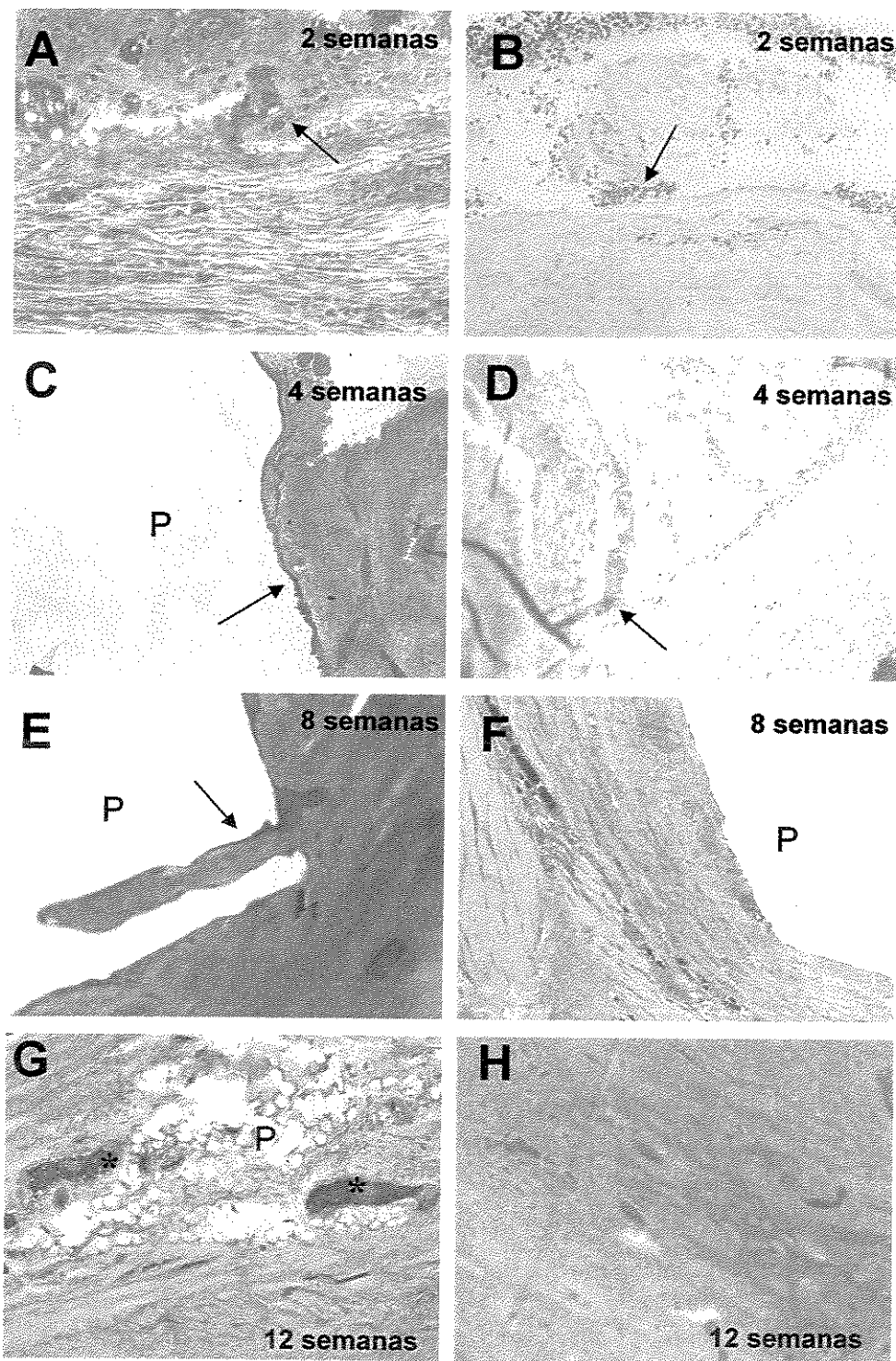


Figura 47 - Corte longitudinal do implante de suportes PCL em tíbia de ratos Wistar. (A, C, E, G) denso. (B, D, F, H) poroso. Aumento (C, E, G) 100x; (A, B, D, H) 200x; (F); 400x. Observe: (*) vasos sanguíneos; (setas) células fusiformes provenientes do endósteo; (P) suporte polimérico. Azul de toluidina.

Nos animais implantados com suportes densos de PCL com 8 semanas, nota-se a presença de uma fenda preenchida por tecido ósseo (Fig. 47E). A invasão por tecido ósseo na amostra densa pode ter sido ocasionada por uma falha do material durante o processo de injeção ou pela fratura do suporte durante o implante (Fig. 47F) Nas amostras de PCL com 12 semanas de implante, a análise histológica mostrou uma diferenciação nítida do comportamento do material. O suporte denso apresenta-se particulado, com invasão tecidual acentuada e com presença de vasos sanguíneos, conforme mostra a Fig. 47G. Nos implantes porosos, o material sugere ter sido bioreabsorvido, observando-se também estruturas semelhantes ao sistema de Havers (Fig. 47H).

Nos locais de implante, ou fratura óssea, ocorre hemorragia local, tanto pela lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas. Durante o processo de cicatrização, o coágulo sanguíneo, restos celulares e da matriz são progressivamente removidos pelos macrófagos, e o periósteo e endósteo próximos ao local de implante respondem com uma intensa proliferação celular.

O processo de neoformação óssea ao redor de implantes bioreabsorvíveis tem sido alvo de interesse de pesquisadores que realizam testes de biocompatibilidade de materiais (Ambrosio *et al.*, 2003). Tipicamente, o uso de implantes em tecidos biológicos vem acompanhado de uma reação inflamatória, que normalmente evolui para um granuloma de corpo estranho. Quando o material inerte é grande o suficiente para impedir a fagocitose pelo macrófago, e não suscita uma resposta inflamatória ou imune, as células epitelióides e células gigantes se justapõem à superfície e capsulam o material (Contran *et al.*, 2000).

Athanasious *et al.* (1996) fazem uma revisão histórica da biocompatibilidade e toxicidade de aplicações clínicas de materiais baseados em PLA e PGA. No reparo de defeitos ósseos, quase a totalidade dos resultados indica ausência de reações inflamatórias crônicas ou reações de corpo estranho. Efeitos adversos como a osteólise, observada em alguns estudos, têm sido atribuídas às técnicas de esterilização e ao uso de materiais com altas taxas de cristalinidade, hidrofobicidade e tempo de degradação (Böstman *et al.*, 1991 e Böstman *et al.*, 2000).

Aplicados à engenharia de tecidos ósseos, suportes de PLGA têm um efeito de osteocondução (Lewandrowski *et al.*, 1999). De acordo com Ohashi *et al.* (2000), o osso formado ao redor dos implantes tem sua origem a partir das células osteogênicas presentes no periósteo e endósteo, estimuladas durante a produção da falha óssea para a colocação do implante. Durante a produção das cavidades na tíbia de nossos animais, o periósteo foi rebatido e, após a colocação dos implantes, reposicionado em seu local original, o que contribuiu para a ativação das células osteogênicas presentes. O mecanismo é semelhante ao que ocorre na formação de calos ósseos externos e internos, freqüentes no reparo de fraturas ósseas. Efeitos de osteoindução têm sido relatados em suportes de PLGA agregados a fatores de crescimento como a proteína morfogenética recombinante de osso humano 2 (rhBMP-2) (Boyan *et al.*, 1999).

Suportes de PCL têm sido descritos com biocompatibilidade semelhantes aos de PLA e PGA, entretanto, devido ao longo tempo de degradação *in vitro*, os estudos que utilizam dispositivos puros de PCL são raros na literatura atual (Agrawal *et al.*, 2001). No experimento, não foram observadas reações adversas nas amostras densas e porosas de PCL. Apesar de não elencados como materiais de alta *performance* em aplicações na engenharia de tecidos ósseos, a literatura relata que suportes de PCL são capazes de promover crescimento de osteoblastos e fazer a sua própria manutenção, conforme apresentado neste trabalho. Recentemente, blendas com PCL vêm sendo utilizadas como uma alternativa para a melhoria das suas propriedades mecânicas (Ambrosio *et al.*, 2003).

Quanto ao tempo de degradação, as amostras densas e porosas de PLGA50 e PCL mostraram variações quando comparadas aos resultados dos estudos *in vitro* em tampão fosfato. A observação das lâminas permite concluir que os suportes baseados em PLGA50 possuem velocidade de degradação mais acentuada quando comparados aos seus análogos de PCL. Resultados semelhantes foram observados nos estudos *in vitro* e, conforme já mencionados, relacionam-se à diferença de composição química, cristalinidade, hidrofobicidade.

Apesar da concordância entre a diferença de materiais, as amostras de PLGA50 demonstraram um tempo de bioreabsorção maior *in vivo* (entre 4 e 8 semanas) quando comparado ao estudo de tampão fosfato (3 e 4 semanas). Ao contrário, os suportes de PCL,

estáveis na sua morfologia e geometria durante 52 semanas de degradação *in vitro*, mostraram serem bioreabsorvidos na análise das lâminas com 12 semanas pós-operatórias.

A velocidade de degradação de amostras de polímeros bioreabsorvíveis mostra-se variável nos estudos *in vivo* e *in vitro* em função do local e resposta fisiológica ao implante (Lu *et al.*, 2000b). Em estudo realizado sobre o efeito da taxa de degradação *in vivo* em suportes de PLGA (50/50) e PCL pelo crescimento celular e angiogênese, Sung *et al.* (2004) discutem a diferença de velocidade de degradação em função do meio local produzido pelo crescimento celular e vascularização. Segundo os autores, os maiores tempos de degradação *in vivo* nas amostras de PLGA, justificam-se pela condição estática do fluido de degradação *in vitro*, no qual diminui a taxa de difusão dos produtos ácidos gerados pela hidrólise, atuando no efeito autocatalítico dos poliésteres.

Nas amostras de PCL, apesar do tempo de degradação *in vivo* ser maior comparado às amostras de PLGA, ele é significativamente menor (52 semanas *in vitro* versus 12 semanas *in vivo*) nos ensaios de implante. A degradação das policaprolactonas tem influência significativa da ação enzimática e dos sinais inflamatórios (Woodward *et al.*, 1985). De maneira geral, a resposta inflamatória aos implantes é mediada por mudanças na vascularização (vasoconstrição imediata seguida de vasodilatação) e formação de exsudato rico em mediadores como as prostaglandinas e proteínas C5a, do sistema complemento, que ativam e atraem para o local neutrófilos e macrófagos. Na tentativa de engolfamento do corpo estranho, os macrófagos produzem grandes quantidades de opsoninas e que através de cascatas bioquímicas modificam o meio pela presença de radicais peróxidos, como o O_2^- e H_2O_2 . A presença de íons metálicos no meio segue com a produção de OH^- através de reações de Haber-Weiss. A presença dos grupamentos hidroxilas altera o pH do meio *in vivo* e tem sido usada para justificar a maior velocidade de degradação das amostras de PCL, conforme observadas em nosso experimento (Ali *et al.*, 1993b).

Em relação à morfologia do suporte, a porosa é desejável em muitas aplicações na engenharia de tecidos. Em nosso experimento, as amostras porosas avaliadas demonstraram intensa invasão celular. Os resultados observados são consistentes com aqueles publicados anteriormente, e mostram, em avaliações histológicas, tecido fibrovascular em crescimento

dentro dos poros depois de uma semana de implante em amostras de PLGA (50/50) (Lu *et al.*, 200b). O suporte polimérico deve apresentar uma estrutura de poros uniforme e interconectada de modo a permitir um crescimento celular homogeneamente distribuído no dispositivo, de tal forma a promover a formação de uma rede organizada (Mikos *et al.*, 1993a e Mikos *et al.*, 2000).

Na análise das amostras de PLGA50, suportes porosos mostraram tempo de bioreabsorção mais rápido quando comparados aos densos. Os resultados parecem conflitantes com os dados de degradação *in vitro* e a discussão feita nos capítulos anteriores sobre o efeito autocatalítico dos polímeros bioreabsorvíveis, entretanto duas diferenças básicas justificam a bioreabsorção mais acelerada das amostras porosas. A primeira, relacionada ao sistema biológico, mostra que as condições do meio não são estáveis, e o acúmulo dos terminais ácidos demonstra ser menos intenso com a invasão celular. A segunda está no fato da geometria do suporte sofrer alterações significativas durante a bioreabsorção *in vivo*. Enquanto nos sistemas *in vitro* observa-se o colapso dos poros, no meio biológico eles são preenchidos por tecido vascularizado com capacidade de bioreabsorção.

Mainil-Varlet *et al.* (1997) utilizaram o PLLA e PLDLA na forma de pinos para estudos *in vivo* em tíbias de ovelhas. Após um ano pós-operatório, os materiais não tinham sido completamente bioreabsorvidos, porém houve uma redução significativa da massa molar (40.000-50.000 para 500-3.000 g/mol). A variação da massa molar das amostras densas e porosas no estudo *in vivo* não foi realizada neste experimento, entretanto poderia auxiliar na diferenciação do mecanismo de degradação e perda de massa das amostras estudadas.

Capítulo 9

Conclusões

Visando aplicações na engenharia de tecidos, neste trabalho foram desenvolvidos suportes de PCL e PLGA50 pela da técnica de fusão, com morfologias densas e porosas, obtidas pelo processo de adição e lixiviação de sal. Os estudos de degradação *in vitro* dos materiais mostraram que suportes preparados com PCL possuem maior estabilidade quando comparados aos seus análogos de PLGA50.

Suportes de polímeros bioreabsorvíveis são dimensionados e projetados em função do tipo de aplicação. Na engenharia de tecidos ósseos, o uso de materiais com curtos tempos de degradação e propriedades mecânicas adequadas são preferenciais neste tipo de aplicação. A partir do objetivo deste trabalho, os suportes de PLGA50 obtidos, demonstraram serem os mais indicados no estudo da regeneração óssea. Suportes de PCL mostraram não serem considerados como materiais ideais para este propósito, porém encontram aplicações seja como um componente em blendas e compósitos de polímeros bioreabsorvíveis, seja como suportes para aplicações onde se requer um material com longo tempo de degradação.

Sugestões para próximos trabalhos

- Preparo e caracterização de suportes porosos de blendas de PCL e PLGA50.
- Análises complementares de cultura de células: crescimento celular e estudos citoquímicos.
- Modificações da superfície dos suportes através de tratamentos com soluções alcalinas e avaliação na cultura de células.
- Estudo *in vivo* de suportes pré-degradados termicamente ou através de imersão em soluções alcalinas.
- Estudo *in vivo* de suportes bioreabsorvíveis inoculados com cultura de células.

Referências bibliográficas

Abukawa, H., Shin, M., Williams, W. B., Vacanti, J. P., Kaban, L. B., Troulis, M. J. Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, v. 62, pp. 601-606, 2004.

Agrawal, C. M., Athanasiou, K. A. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PLGA implants. *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, v. 38, pp. 105-114, 1997.

Agrawal, C. M., McKinney, J. S., Lanctot, D., Athanasiou, K. A. Effects of fluid flow on the *in vitro* degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, v.21, pp. 2443-2453, 2000.

Agrawal, C. M., Ray, R. B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 55, pp. 141-150, 2001.

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, pp. 1409-1418, 1993a.

Ali, S. A. M., Zhong, S. -P., Doherty, P. J., Williams, D. F. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices I. Poly(caprolactone). *Biomaterials*, v.14 (9), pp. 648-656, 1993b.

Altpeter, H., Bevis, M.J., Grijpma, D. W., Feijen, J. Non-conventional injection molding of poly(lactide) and poly(epsilon-caprolactone) intended for orthopedic applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.15, pp. 175-184., 2004.

Ambrose, C. G., Clanton, T. O. Bioabsorbable implants: review of clinical experience in orthopedic surgery. *Annals of Biomedical Engineering*, v.32, pp. 171-177, 2004.

Ambrosio, L., Savarino, L., Granchi, D., Cenni, E., Baldini, N., Pagani, S., Guizzard, S., Causa, F., Giunti, A. Osteoblast growth and functions in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials*, v.23, pp. 3815-3824, 2003.

Andrade, A. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002, 388 p.

Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials: Review. *Biomaterials*, v.21, pp. 667-681, 2000.

Aoyagi, Y., Yamashita, K., Doi, Y. Thermal degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate], poly[ϵ -caprolactone] and poly[(S)-lactide]. *Polymer Degradation and Stability*, v.76, pp. 52-59, 2002.

Atala A. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Research*, v. 7, pp. 15-31, 2004.

Athanasίου, K. A., Niederauer, G. G. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/poly glycolic acid copolymers. *Biomaterials*, v.17, pp. 93-102, 1996.

Auger, F. A., Berthod, F., Moulin, V., Pouliot, R., Germain, L. Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v.39, pp. 263-275, 2004.

Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. Porous and dense poly(L-lactic acid) membranes: in vitro degradation. *Acta Microscopica*, v.11, (1), pp. 85-89, 2002.

Barbanti, S. H., Santos Jr., A. R., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. Porous and dense poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: in vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.15, pp. 1315-1321, 2004a.

Barbanti, S. H., França, M. T., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. Suportes de polímeros bioreabsorvíveis preparados pela técnica de fusão e lixiviação de sal. In: *Anais do III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*. Campinas, CD-ROM, 2004b.

Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. Efeito da lixiviação do sal em membranas e pinos porosos de polímeros bioreabsorvíveis. In: *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Engenharia de Materiais*, Porto Alegre, CD-ROM, 2004c.

Bendix, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability*, v.59, pp. 129-135, 1998.

Bergsma, J. E., Rozema, F. R., Bos, R. R. M., Boering, G., Joziase, C. A. P., Pennings, A. J. *In vitro* predegradation at elevated temperatures of poly(lactide). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.6, pp. 642-646, 1995.

Bergsma, J. E., Bos, R. R. M., Rozema, F. R., De Jong, W., Boering, G. Biocompatibility of intraosseously implanted predegraded poly(lactide): an animal study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.7, pp. 1-7, 1996.

Boccaccini, A. R., Blaker, J. J., Maquet, V., Day, R. M., Jérôme, R. Preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) and PLGA/Bioglass® composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering*, v.25, pp. 23-31, 2005.

Böstman, O. M. Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants. *Journal of Bone Joint Surgery*, v.73B, pp. 679-682, 1991.

Böstman, O. M., Pihlajamäki, H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*, v.21, pp. 2615-2621, 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, pp. 137-146, 1996.
- Boyan B. D., Lohmann, C. H., Somers, A., Niederauer, G. G., Wozney, J. M., Dean, D. D., Carnes, D. L. Jr, Schwartz, Z. Potential of porous poly-D,L-lactide-co-glycolide particles as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-2 during osteoinduction in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.46, pp. 51-59, 1999.
- Browne, J. E., Branch, T. P. Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, v.8, pp. 180-189, 2000.
- Burkersroda, F., Schedl, L., Göpferich, A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, v.23, pp. 4221-4231, 2002.
- Cam, D., Hyon, S. H., Ikada, Y. Degradation of high molecular weight poly(L-lactide) in alkaline medium. *Biomaterials*, v.16 (11), pp. 833-843, 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*, pp. 297-302, 1997.
- Chen, G., Zhou, P., Mei, N., Chen, X., Shao, Z., Pan, L., Wu, C. Silk fibroin modified porous poly(ϵ -caprolactone) scaffold for human fibroblast culture in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 15, pp. 671-677, 2004.
- Chu, C. C., *The Biomedical Engineering Handbook*, 2^a ed., CRC Press, 1999, Cap. 41, Biodegradable Polymeric Biomaterials: an Update Overview, pp. 41.
- Ciapetti, G., Ambrosio, L., Savarino, L., Granchi, D., Cenni, E., Baldini, E., Pagani, S., Guizzardi, S., Causa, F., Giunti, A. Osteoblast growth and function in porous poly ϵ -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study. *Biomaterials*, v.24, pp. 3815-3824, 2003.

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 (11), pp. 1087-1094, 2000.

Contran, R. S., Kumar, V., Collins, T. *Robbins, Patologia Estrutural e Funcional*, 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 3 Inflamação crônica e aguda, pp. 44-79.

Coombes, A. G. A., Heckman, J. D. Gel casting of resorbable polymers. 1 Processing and applications. *Biomaterials*, v.13, pp. 217-224, 1992.

Coombes, A. G. A., Rizzi, S. C., Williamson, M., Barralet, J. E., Downes, S., Wallace, W.A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*, v.25, pp. 315-325, 2004.

Corden, T. J., Jones, I. A., Rudd, C. D., Christian, P., Downes, S., McDougall, K. E. Physical and biocompatibility properties of poly-epsilon-caprolactone produced using in situ polymerisation: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. *Biomaterials*, v.21, pp. 713-724, 2000.

Cordewener, F. W., Geffen, M. F., Joziase, C. A. P., Schmitz, J. P., Bos, R. R. M., Rozema, F. R., Pennings, A. J. Cytotoxicity of poly(96L/4D-lactide): the influence of degradation and sterilization. *Biomaterials*, v.21, pp. 2433-2442, 2000.

Costanzo, L. S. *Fisiologia*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1999, Cap. 7, Fisiologia Ácido-Básica, pp. 243-264.

Crank, J., Park, G. S. *Diffusion in polymers*. Londres: Academic Press, 1968, citado em Burkeskoda *et al.*, 2002.

Deng, M., Uhrich, K. E. Effects of *in vitro* degradation on properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) pertinent to its biological performance. *Journal of Materials Science: Materials in*

Medicine, v.13, pp. 1091-1096, 2002.

Dewez J. -L., Lhoest, J.-B., Detrait, E., Berger, V., Dupont-gillain, C. C., Vincent, L.-M., Schneider, Y. -J., Bertrand, P., Rouxhet, P.G. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion of defined patterns. *Biomaterials*, v.19, pp. 1441-1445, 1998.

Duailibi, M. T., Duailibi, S. E., Young, C. S., Bartlett, J. D., Vacanti, J. P., Yelick, P. C. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *Journal of Dental Research*, v.83, pp. 523-528, 2004.

Duek, E. A. R., Zavaglia, C. A. C., Belangero, W. D. *In vitro* study of poly(lactic acid) pin degradation. *Polymer*, v.40, pp. 6465-6473, 1999.

Dunn, G. A. *The Biomedical Engineering Handbook*, 2^a ed., CRC Press, 1999, Cap. 117, Cell Motility and Tissue Architecture, pp.171.

El-Amin, S. F., Lu, H. H., Khan, Y., Burems, J., Mitchell, J., Tuan, R. S., Laurencin, C. T. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials*, v.24, pp. 1213-1221, 2003.

Eldsäter, C., Erlandsson, B., Renstad, R., Albertsson, A. -C., Karlsson, S. The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly(ϵ -caprolactone). *Polymer*, v.41, pp. 1297-1304, 2000.

Fang, Z., Starly, B., Sun, W. Computer-aided characterization for effective mechanical properties of porous tissue scaffolds. *Computer-Aided Desegn*, v.37, pp. 65-72, 2005.

Ferreira, B. M. P., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. Films of PLLA/PHBV: Thermal, morphological, and mechanical characterization. *Journal of Applied Polymer Science*, v.86, pp. 2898-2906, 2002.

Fisher, E. W., Sterzel, H. J., Wegner, G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Kolloid-Z Z Polymere*. v.251, pp. 980-990, 1973.

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, pp. 11-23, 1993.

Gao, J., Niklason, L., Langer, R. Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.42, pp. 417-424, 1998.

Gogolewski, S., Mainil-Varlet, P. Effect of thermal treatment on sterility, molecular and mechanical properties of various polylactides. *Biomaterials*, v.18, pp. 251-255, 1997.

Griffith, L. G., Naughton, G. Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*, v.295, (8), pp. 1009-1014, 2002.

Guan, J., Fujimoto, K. L., Sacks, M. S., Wagner, W. R. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials*, v.26, pp. 3961-3971, 2005.

Harris, L. D., Kim, B., Mooney, D. J. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.42, pp. 396-402, 1998.

Hedberg, E. L., Shih, C. K., Lemoine, J. J., Timmer, M. D., Liebschner, M. A., Jansen, J. A., Mikos, A. G. In Vitro Degradation of Porous Poly(propylene fumarate)/Poly(DL-lactic-co-glycolic acid) Composite Scaffolds, *Biomaterials*, v.26, pp. 3215-3225, 2005.

Hollinger, J. O., Battistone, G. C. Biodegradable bone repair materials. *Clinical Orthopaedics and Related Reserch*, v.207, pp. 290-305, 1986.

- Hou, Q., Grijpma, D.W., Feijen, J. Preparation of porous poly(ϵ -caprolactone) structures. *Macromolecules Rapid Communication*, v. 23, pp. 247-252, 2002.
- Hou, Q., Grijpma, D. W., Feijen, J. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials*, v.24, pp. 1937-1947, 2003.
- Hsu, S. H., Chang, C.J., Tang, C.M., Lin, F.T. In vitro and in vivo effects of Ginkgo biloba extract EGb 761 on seeded Schwann cells within poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits for peripheral nerve regeneration. *Journal of Biomaterials Applied*, v.19, pp. 163-182, 2004.
- Huang, W., Carlsen, B., Wulur, I., Rudkin, G., Ishida, K., Wu, B., Yamaguchi, D. T., Miller, T. A. BMP-2 exerts differential effects on differentiation of rabbit bone marrow stromal cells grown in two-dimensional and three-dimensional systems and is required for in vitro bone formation in a PLGA scaffold. *Experimental Cell Research*, v.299, pp. 325-334, 2004.
- Hutmacher, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, pp. 2529-2543, 2000.
- Hutmacher, D. W., Sittering, M., Risbud, M. V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnology*, v.22, pp. 354-362, 2004.
- 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., Gurlek, A., Miller, M. J., Yasko, A. W., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-latic-coglycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.36, pp. 1-8, 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*, v.19, pp. 1405-1412, 1998.

Ishida, H., Lee, Y. -H. Synergism observed in polybenzoxazine and poly(ϵ -caprolactone) blends by dynamic mechanical and thermogravimetric analysis. *Polymer*, v.42, pp. 6971-6979, 2001.

Itälä A. I., Ylänen, H. O., Ekholm, C., Karlsson, K. H., Aro, H. T. Pore diameter of more than 100 μm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, v. 58, pp. 679-683, 2001.

Jeong, S. I., Kim, S. H., Kim, Y. H., Jung, Y., Kwon, J. H., Kim, B. S., Lee, Y. M. Manufacture of elastic biodegradable PLCL scaffolds for mechano-active vascular tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, v.15, pp. 645-660, 2004.

Jong, S. J., Arias, E. R., Rijkers, D. T. S., van Nostrum, C. F., Kettenes-van den Bosch, J. J., Hennin, W. E. New insights into the hydrolytic degradation of poly(lactic acid): participation of the alcohol terminus. *Polymer*, v.42, pp. 2795-2802, 2001.

Kamil, S. H., Vacanti, M. P., Aminuddin, B. S., Jackson, M. J., Vacanti, C. A., Eavey, R. D. Tissue engineering of a human sized and shaped auricle using a mold. *Laryngoscope*, v.114, pp. 867-870, 2004.

Kellomäki, M., Tormala, P. Processing of resorbable poly-alpha-hydroxy acids for use as tissue-engineering scaffolds. *Methods in Molecular Biology*, v.238, pp. 1-10, 2004.

Khor, H. L., Ng, K. W., Schantz, J. T., Phan, T-T., Lim, T. C., Teoh, S. H., Hutmacher, D. W. Poly(ϵ -caprolactone) films as a potential substrate for tissue engineering na epidermal equivalent. *Materials Science and Engineering*, v.20C, pp. 71-75, 2002.

Kim, H-W., Knowles, J. C., Kim, H-E. Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials*, v.25, pp. 1279–1287, 2004.

Kojima, K., Vacanti, C. A. Generation of a tissue-engineered tracheal equivalent. *Biotechnology Applied Biochemistry*, v.39, pp. 257-262, 2004.

Kopinke, F.-D., Remmler, M., Mackenzie, K., Möder, M., Wachsen, O. Thermal decomposition of biodegradable polyesters-II. Poly(lactic acid). *Polymer Degradation and Stability*, v.53, pp. 329-342, 1996.

Kulkarni, R. K., Pani, K. C., Leuman, C., Leonard, F. Polylactic acid for surgical implants. *Archives of Surgery*, v.93, pp. 839-843, 1966.

Kweon, H. Y., Yoo, M. K., Park, I. K., Kim, T. H., Lee, H. C., Lee, H-S, Oh, J-S., Akaike, T., Cho, C-S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. *Biomaterials*, v.24, pp. 801-808, 2003.

Laine, P., Kontio, R., Lindqvist, C., Suuronen, R. Are there any complications with bioabsorbable fixation devices? A 10 years review in orthognathic surgery. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, v.33, pp. 240-244, 2004.

Lakes, R. *The Biomedical Engineering Handbook*, 2^a ed., CRC Press, 1999, Cap. 40, *Composite Biomaterials*, pp. 40.

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, pp. 181-193, 1994.

Langer, R., Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science*, v.260, pp. 920-926, 1993.

Langer, R., Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, v.428, pp. 487-492, 2004.

Lewandrowski, K. U., Bondre, S. P., Gresser, J. D., Wise, D. L., Tomford, W. W., Trantolo, D. J. Improved osteoconduction of cortical bone grafts by biodegradable foam coating. *Biomedical Materials Engineering*. v.9, pp. 265-275, 1999.

Li, 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, pp. 198-206, 1990a.

Li, 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, pp. 342-353, 1990b.

Li, 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, pp. 123-130, 1990c.

Li, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.48, (3), pp. 342-353, 1999a.

Li, S., McCarthy, S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide). *Biomaterials*, v.20, pp. 35-44, 1999b.

Li, S. M., Chen, X. H., Gross, R. A., McCarthy, S. P. Hydrolytic degradation of PCL/PEO copolymers in alkaline media. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.11, pp. 227-233, 2000.

- Li, W-J., Tuli, R., Okafor, C., Derfoul, A. Danielson, K. G., Hall, D. J., Tuan, R. S. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, v. 26, p. 599–609, 2005.
- Liu, T. V., Bhatia, S. N. Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced Drug Delivery Review*, v.56, p. 1635-1647, 2004.
- Lloyd-Evans, M. Regulation tissue engineering. *Materials Today*, May, pp. 48-55, 2004.
- Lombello, C. B., Santos Jr, A. R., Malmonge, S. M., Barbanti, S. H., Wada, M. L. F., Duek, E. A. R. Adhesion and morphology of fibroblastic cells cultured on different polymeric biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.13, pp. 867-874, 2002.
- Lu, 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, pp. 1595-1605, 2000a.
- Lu, 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, pp. 1837-1845, 2000b.
- Lucas, E. F., Soares, B. G., Monteiro, E. *Caracterização de polímeros*. 1ª ed., Rio de Janeiro: e-papers, 2001, 364 p.
- Luciano, R. M., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R., Alberto-Rincon, M. C. Synthesis and characterization of poly(L-lactic acid) membranes: studies in vivo and in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.14, pp. 87-94, 2003.
- Lysaght, M. J., Hazlehurst, A. L. Tissue engineering: the end of the beginning. *Tissue Engineering*, v.10, pp. 309-320, 2004.

Mainil-Varlet, P., Curtis, R., Gogolewski, S. Effect of *in vivo* and *in vitro* degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.36, pp. 360-380, 1997.

Maquet, V., Jerome, R. Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. *Materials Science Forum*, v.250, pp.15-42, 1997.

Merck KGaA. *ChemDat Online*. Darmstadt, Germany, Jan. 2005. Disponível em: <http://chemdat.merck.de/mda/int_en/index.html>. Acesso em: 25 jan. 2005.

Middleton, J. C., Tipton, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, v.21, pp. 2335-2346, 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, pp. 716-723, 1993a.

Mikos, A. G., Bao, Y., Cima, L. G., Ingber, D. E., Vacanti, J. P., Langer, R. Preparation of poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, pp. 183-189, 1993b.

Mikos, A. G., Sarakinos, G., Leite, S. M., Vacanti, J. P., Langer, R. Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering. *Biomaterials*, v.14, (5), pp. 323-330, 1993c.

Mikos, A. G., Temenoff, J. S. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biotechnology*, v.3, (2), pp. 114-119, 2000.

Mikos, A. G. In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DL-lactic-co-glycolic acid) composite scaffolds. *Biomaterials*, v. 26, pp.3215-3225, 2005.

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, pp. 711-719, 1977.
- Moore, T., Adhikari, R., Gunatillake, P. Chemosynthesis of bioresorbable poly(g-butyrolactone) by ring-opening polymerisation: a review. *Biomaterials*, v. 26, pp. 3771–3782, 2005.
- Moreira, P. L., An, Y. H., Santos Jr., A. R., Genari, S. C. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials*, v.15, pp. 229-237, 2004.
- Morrison, R., Boyd, R. *Química Orgânica*, 11ª ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, Cap. 20, Derivados Funcionais dos Ácidos Carboxílicos, Substituição Acíclica Nucleófila, pp. 978-1028.
- Mosmamm, T. J. A rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunological Methods*, v.65, pp. 55-63, 1983.
- Moyle, G. J., Lysakova, L., Brown, S., Sibtain, N., Healy, J., Priest, C., Mandalia, S., Barton, S. E. A randomized open-label study of immediate versus delayed polylactic acid injections for the cosmetic management of facial lipoatrophy in persons with HIV infection. *HIV Medicine*, v.5, pp. 82-87, 2004.
- Murphy, W. L., Dennis, R. G., Kileny, J. L., Mooney, D. J. Salt fusion: an approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering*, v.8, pp. 43-52, 2002.
- Nielsen, L.E. *Mechanical Properties of Polymers and Composites*, Marcel Dekker, N.Y., v.1, 1974.
- Nakagawa, K., Abukawa, H., Shin, M. Y., Terai, H., Troulis, M. J., Vacanti, J. P. Osteoclastogenesis on Tissue-Engineered Bone. *Tissue Engineering*, v.10, pp. 93-100, 2004.

Nava, D., Salom, C., Prolongo, M. G., Masegosa, R. M. Thermal properties and interactions in blends of poly(ϵ -caprolactone) with unsaturated polyester resins. *Journal of Materials Processing Technology*, v. 143, pp. 171–174, 2003.

Oh, S.H., Kang, S.G., Kim, E.S., Cho, S.H., Lee, J.H. Fabrication and characterization of hydrophilic poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method. *Biomaterials*, v.24, pp. 4011–4021, 2003.

Ohashi, H., Kobayashi, A., Kadoya, Y., Yamano, Y., Oonishi, H., Iwaki, H. Effect of particles and interface conditions on fibrous tissue interposition between bone and implant. A particle challenge model in rabbit. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.11, pp. 255–259, 2000.

Ohashi, K., Waugh, J. M., Dake, M. D., Yokoyama, T., Kuge, H., Nakajima, Y., L Yamanouchi, M., Naka, H., Yoshioka, A., Kay, M.A. Liver tissue engineering at extrahepatic sites in mice as a potential new therapy for genetic liver diseases. *Hepatology*. v.41, pp. 132–140, 2005.

Opitz, F., Schenke-Layland, K., Cohnert, T. U., Starcher. B., Halbhuber. K. J., Martin, D. P., Stock, U. A. Tissue engineering of aortic tissue: dire consequence of suboptimal elastic fiber synthesis in vivo. *Cardiovascular Research*, v.63, pp. 719–730, 2004.

Park, G. E., Pattison, M. A., Park, K., Webster, T. J. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials*, v.26, pp. 3075–3082, 2005.

Patist, C. M., Mulder, M. B., Gautier, S. E., Maquet, V., Jerome, R., Oudega, M. Freeze-dried poly(D,L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. *Biomaterials*, v.25, pp. 1569–1582, 2004.

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, pp. 901-908, 2000.

Pezzin, A. P. T., Duek, E. A. R. Hydrolytic degradation of poly(para-dioxanone) prepared by casting or phase separation. *Polymer Degradation and Stability*, v.78, pp. 405-411, 2002.

Pezzin, A. P. T., Cardoso, T. T., Zavaglia, C. A. C., Duek, E. A. R. Bioreabsorbable polymer scaffold as temporary meniscal prosthesis. *Artificial Organs*, v.27, pp. 428-431, 2003a.

Pezzin, A. P. T., Alberta van Ekenstein, G. O. R., Zavaglia, C. A. C., Brinke, G. T., Duek, E. A. R. Poly(para-dioxanone) and poly(L-lactic acid) blends: thermal, mechanical, and morphological properties. *Journal of Applied Polymer Science*, v.88, pp. 2744-2755, 2003b.

Pietrzak, W. S., Sarver, D. R., Verstynen, M. L. Bioabsorbable polymer science for the practicing surgeon. *Journal of Craniofacial Surgery*, v.2, pp. 87-91, 1997.

Pinho, F. O., Joazeiro, P. P., Santos Jr, A. R. Avaliação do crescimento e diferenciação de osteoblastos humanos sobre matriz óssea desmineralizada (MOD). In: *Anais do III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*. Campinas, CD-ROM, 2004.

Rai, B., Teoh, S. H., Hutmacher, D. W., Cao, T., Ho, K. H. Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. *Biomaterials*, v.26, pp. 3739-3748, 2005.

Rickert, D., Lendlein, A., Schmidt, A. M., Kelch, S., Roehlke, W., Fuhrmann, R., Franke, R. P. In vitro cytotoxicity testing of AB-polymer networks based on oligo(epsilon-caprolactone) segments after different sterilization techniques. *Journal of Biomedical Materials Research B Applied Biomaterials*. v. 67, pp. 722-731, 2003.

Rotter, N., Aigner, J., Naumann, A., Planck, H., Hammer, C., Burmester, G., Sittinger, M. Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.42, pp. 347-356, 1998.

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, (1), p. 7-13, 2001a.

Santos Jr, A. R., Wada, M. L. F. *A Célula*, Ed. Manole, 2001b, Cap. 7, Diferenciação celular, pp. 260-274.

Santos, A. R. Jr., Ferreira, B. M., Duek, E. A., Dolder, H., Wada, R. S., Wada, M. L. Differentiation pattern of Vero cells cultured on poly(L-lactic acid)/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) blends. *Artificial Organs*, v.28, pp. 381-389, 2004.

Sarazin, P., Roy, X., Favis, B.D. Controlled preparation and properties of porous poly(L-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. *Biomaterials*, v.25, pp. 5965-5978, 2004.

Schliecker, G., Schmidt, C. Fuchs, S., Wombacher, R., Kissel, T. Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity. *International Journal of Pharmaceutics*, v.266, pp. 39-49, 2003.

Seal, B. L., Otero, T. C., Panitch, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering*, v.34, pp. 147-230, 2001.

Shieh, S. J., Terada, S., Vacanti, J. P. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*, v.25, pp. 1545-1557, 2004.

Sittinger, M., Reitzel, D., Dauner, M., Hierlemann, H., Hammer, C., Kastenbauer, Plank, H., Burmester, G. R., Bujia, J. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*, v.13, pp. 57-63, 1996.

Sivalingam, G., Karthik, R., Madras, G. Kinetics of thermal degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v.70, p. 631-647, 2003.

Sundback, C., Hadlock, T., Cheney, M. Vacanti, J. Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. *Biomaterials*, v.24, pp. 819-830, 2003.

Sung, H-J., Meredith, C., Johnson, C., Galis, Z. S. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials*, v.25, pp. 5735-5742, 2004.

Sung, H. J., Su, J., Berglund, J. D., Russ, B. V., Meredith, J. C., Galis, Z. S. The use of temperature-composition combinatorial libraries to study the effects of biodegradable polymer blend surfaces on vascular cells. *Biomaterials*, v. 26, pp. 4557-4567, 2005.

Tabata, Y. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v.3, pp. 80-89, 2000.

Tamada, J. A., Langer, R. Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.90, (2), pp. 552-556, 1993.

Tang, Z. G., Black, R. A., Curran, J. M., Hunt, J. A., Rhodes, N. P., Williams, D. F. Surface properties and biocompatibility os solvet-cast poly[e-caprolactone] films. *Biomaterials*, v.25, pp. 4741-4748, 2004.

Tay, A. G., Farhadi, J., Suetterlin, R., Pierer, G., Heberer, M., Martin, I. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Engineering*, v.10, pp. 762-770, 2004.

Temenoff, J. S., Mikos, A. G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, v.21, pp. 431-440, 2000.

Texas Health Science Center, The University of. *Software Image Tool*. San Antonio, Texas, EUA. Disponível em: <<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>>. Acesso em: 20 mar. 2005.

Tsang, V. L., Bhatia, S. N. Three-dimensional tissue fabrication *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, pp. 1635–1647, 2004.

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, pp. 179-89, 2000.

Uematsu, K., Hattori, K., Ishimoto, Y., Yamauchi, J., Habata, T., Takakura, Y., Ohgushi, H., Fukuchi, T., Sato, M. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Biomaterials*, v.26, pp. 4273-4279, 2005.

Vacanti, C. A., Langer, R., Schloo, B., Vacanti, J. P. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, november, pp. 753-759, 1991.

Valimaa, T., Laaksovirta, S. Degradation behaviour of self-reinforced 80L/20G PLGA devices in vitro. *Biomaterials*. v.25, pp. 1225-1232, 2004.

Vert, M., Li, M. S., Spenlehauer, G., Guerin, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science*, v.3, pp. 432-436, 1992.

Wang, M., Chen, L. J., Weng, J., Yue, C. Y. Manufacture and evaluation of bioactive and biodegradable materials and scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.12, pp. 855-860, 2001.

Whang, K., Thomas, C. H., Healy, K. E. A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer*, v.36, (4), pp. 837-842, 1995.

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, pp. 491-499, 1998.

Widmer, M. S., Gupta, P. K., Lu, L., Meszlenyi, R. K., Evans, G. R. D., Brandt, K., Savel, T., Gurlek, A., Patrick, C. W., Mikos, A. G. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. *Biomaterials*, v.19, pp. 1945-1955, 1998.

Williams, J. M., Adewunmi, A., Schek, R. M., Flanagan, C. L., Krebsbach, P. H., Feinberg, S. E., Hollister, S. J., Das, S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. *Biomaterials*, v.23, pp. 4817-4827, 2005.

Williamson, M. R., Coombes, A. G. A. Gravity spinning of polycaprolactone fibres for applications in tissue engineering. *Biomaterials*, v.25, pp. 459-465, 2004.

Woodward, S. C., Brewer, P. S., Moatamed, F., Schindler, A., Pitt, C. G. Intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone). *Journal of Biomedical Materials Research*, v.19, pp. 437-444, 1985.

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

Xiong, Z., Yan, Y., Zhang, R., Sun, L. Fabrication of porous poly(L-lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering via precise extrusion. *Scripta Materialia*, v.45, pp. 773-779, 2001.

Yuan, X., Mak, A. F. T., Yao, K. Surface degradation of poly(L-lactic acid) fibres in a concentrated alkaline solution. *Polymer Degradation and Stability*, v.79, pp. 45-52, 2003.