



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS

**FIBRAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO)/POLIISOPRENO
PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Douglas Ramos Marques

Porto Alegre

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS

**FIBRAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO)/POLIISOPRENO
PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Engenharia. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais.

Doutorando: MSc. Douglas Ramos Marques

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos

Porto Alegre

2015



**Já não sofro, já não brilha
mas somos a mesma coisa:**

**Uma coisa tão diversa
da que pensava que fôssemos**

Carlos Drummond de Andrade

Agradimentos

Se cheguei até aqui por meus próprios passos e com meus próprios tropeços, é porque tinha sempre alguém a meu lado para me estender a mão e incentivar a seguir adiante. A cada um de vocês, minha gratidão.

Mãe e pai, sem vocês, não sou nada.

Luis Alberto, és mais que um orientador, és um amigo.

Julie and Sarah, thanks for letting me be a part of your group and make Manchester my home.

Colegas de Labiomat, cada um de vocês tem influência neste momento.

Amigos são poucos os que ficam nos momentos bons e ruins, mas eu tenho desses: Larissa, Hugo, Duda, Tamara, Deh, Keka. Minha devoção a vocês.

Mitchell, it was magic! Thank you!

Eu sei que, sem vocês, não chegaria aqui!

Por ter vocês eu sei: não acaba aqui!

Índice

EPÍGRAFE.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
ÍNDICE.....	V
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
 1. Revisão Bibliográfica.....	 1
1.1. Engenharia de Tecidos.....	1
1.2. Técnicas de Processamento	5
1.3. Polímeros Naturais	10
1.4. Polímeros Sintéticos.....	18
1.5. Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) / Poliisopreno.....	23
2. Objetivos.....	30
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1. Processo de Obtenção de Materiais.....	31
3.1.1. <i>Blenda Polimérica</i>	32
3.1.2. <i>Fibras Poliméricas - Gotejamento</i>	32
3.1.3. <i>Fibras Poliméricas - Electrospinning</i>	33
3.2. Caracterização - Blenda Polimérica	34
3.2.1. <i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier</i>	34
3.2.2. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i>	34
3.2.3. <i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>	35
3.2.4. <i>Análise Termogravimétrica</i>	35

3.2.5.	<i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>	35
3.2.6.	<i>Molhabilidade</i>	36
3.2.7.	<i>Ensaio de Tração</i>	36
3.3.	<i>Caracterização - Fibras Poliméricas</i>	36
3.3.1.	<i>Diâmetro de Fibras</i>	36
3.3.2.	<i>Porosidade e Densidade</i>	37
3.3.3.	<i>Ensaio de Compressão - Scaffolds</i>	37
3.3.4.	<i>Ensaio de Tração - Scaffolds</i>	38
3.4.	<i>Caracterização in vitro</i>	38
3.4.1.	<i>Subcultura e Manutenção de Células Mamárias</i>	38
3.4.2.	<i>Cultura Celular</i>	40
3.4.3.	<i>Azul de Toluidina</i>	41
3.4.4.	<i>Alamar Blue</i>	42
3.4.5.	<i>Quantificação de DNA de Cadeia Dupla</i>	43
3.4.6.	<i>Quantificação de Lactato Desidrogenase - LDH</i>	45
3.4.7.	<i>Ensaio Live/Dead</i>	46
4.	Resultados e Discussão	47
4.1.	<i>Caracterização - Blenda Polimérica</i>	47
4.1.1.	<i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier</i>	47
4.1.2.	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i>	48
4.1.3.	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>	50
4.1.4.	<i>Análise Termogravimétrica</i>	52
4.1.5.	<i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>	55
4.1.6.	<i>Molhabilidade</i>	56
4.1.7.	<i>Ensaio de Tração</i>	57
4.2.	<i>Caracterização - Fibras Poliméricas</i>	61
4.2.1.	<i>Diâmetro de Fibras</i>	61

4.2.2. Porosidade e Densidade	63
4.2.3. Molhabilidade - Scaffolds	65
4.2.4. Propriedades Mecânicas - Scaffolds	66
4.3. Caracterização <i>in vitro</i> - Observação Preliminar	71
4.3.1. Mioblastos Murinos	71
4.4. Caracterização <i>in vitro</i> - Fibras de <i>Electrospinning</i>	73
4.4.1. Efeito das Fibras Sobre Meio de Cultura.....	73
4.4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	76
4.4.3. Calorimetria Exploratória Diferencial	77
4.4.4. Análise Termogravimétrica.....	79
4.5. Caracterização <i>in vitro</i> - Fibras de Gotejamento	80
4.5.1. Mioblastos Murinos	81
4.5.2. Fibroblastos Dérmicos Humanos	86
4.5.3. Condrócitos Bovinos	90
4.5.4. Hepatocarcinomas Humanos	94
5. Conclusões.....	99
6. Sugestões de Trabalhos Futuros	101
7. Referências Bibliográficas	102
8. Publicações Originadas da Tese	131

Resumo

A perda ou falha de um órgão ou tecido é um dos problemas mais severos da saúde humana. A engenharia de tecidos, definida como o cultivo e adesão de células humanas *in vitro* em um *scaffold* ou arcabouço, surge como uma alternativa viável para reposição de órgãos e tecidos. Estas células proliferam, migram e se diferenciam num tecido específico enquanto produzem os componentes de matriz extracelular (ECM) necessários para criar este tecido. A obtenção de *scaffolds* fibrosos a partir da blenda polimérica de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) (PLGA) e Poliisopreno (PI) é proposta como uma alternativa à engenharia de tecidos moles. Este material foi processado como estrutura fibrosa por meio de métodos de gotejamento (FD) e *electrospinning* (FS). Caracterização físico-química foi aplicada à blenda e às fibras geradas. Também foi averiguada a viabilidade das fibras em culturas de mioblastos murinos, fibroblastos dérmicos humanos, condrócitos bovinos e hepatocarcinomas. Nota-se que o processo de obtenção da blenda não apresentou alterações na estrutura química dos polímeros, sendo apontada também a imiscibilidade entre eles. A ductilidade do material foi apontada como efeito da presença de PI na blenda, embora esta composição apresente similar molhabilidade entre a mistura e os polímeros puros. As fibras geradas por *electrospinning* geraram um *scaffold* com menor porosidade do que as fibras obtidas por gotejamento, mesmo apresentando um diâmetro menor e uma orientação paralela entre fibras. As fibras obtidas por gotejamento apresentaram fibras emaranhadas de maior diâmetro, mas maior tamanho de poros, gerando *scaffolds* de maior porosidade. As propriedades mecânicas de ambos *scaffolds* indicam sua aplicação enquanto substitutos de tecidos moles. Ensaio de viabilidade celular condenaram o uso das fibras FS, uma vez que estas apresentaram solvente residual no interior da fibra, causando indesejada lise celular. As fibras FD apresentaram resultados de adesão e proliferação adequados para mioblastos, fibroblastos e condrócitos, porém os resultados foram considerados impróprios para hepatócitos.

Palavras-Chave: arcabouço, Cellprene, condrócito, *electrospinning*, fibroblasto, gotejamento, mioblasto, PI, PLGA.

Abstrad

The lost or failure of an organ or tissue is one of the most severe problems in human health. Tissue engineering, defined as the seeding and adhesion of human cells *in vitro* over a *scaffold*, arises as an viable alternative for reproduction of organs and tissues. These cells proliferate, migrate and differentiate into a specific tissue while producing extracellular matrix components. The obtaining of fibrous *scaffolds* from a polymeric blend of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) (PLGA) and Polyisoprene (PI) is proposed as an alternative to soft tissue engineering. This material was processed as a fibrous structure through dripping (FD) and *electrospinning* (FS) methods. Physical-chemical characterization was applied to the blend and to the generated fibres. Fibres viability was also observed for murine myoblasts, human dermal fibroblasts, bovine chondrocytes and hepatocellular carcinoma cultures. It was noticed that the blending process didn't have any influence over polymer's chemical structure, being observed the immiscibility between the raw materials. Blend's ductile behaviour was pointed out as an effect of PI presence, although this mixture presents similar wettability to the one presented by these raw polymers. Fibres obtained by electrospinnig generated a *scaffold* with smaller porosity, even presenting fibres with smaller diameter and a parallel organized topography. The fibres obtained by dripping presented a tangled structure of thicker fibres, but assembling a *scaffold* with higher porosity and inner space. Mechanical properties of both *scaffolds* indicate their applicability as soft tissue substitutes. Cell viability assays condemn the use of FS fibres, seen that they present residual solvent trapped into the fibre, causing undesirable cell lysis. On the other hand, FD fibres presented positive adhesion and proliferation results for myoblasts, fibroblasts and chondrocytes cell lines, however the results were consider inappropriate for hepatocytes.

Key-Words: Cellprene, chondrocyte, dripping, electrospinning, fibroblast, myoblast, PI, PLGA.

Lista de Ilustrações

Figura 1: etapas da engenharia de tecidos (BARBANTI et al., 2004).....	2
Figura 2: Estrutura interna de <i>scaffolds</i> obtidos por (a) separação de fase por indução térmica (NAM & PARK, 1999), (b) <i>electrospinning</i> (SMITH & MA, 2004), (c) expansão de gás (LIPS, et. al., 2005), e (d) manufatura aditiva (BASTIEN, 2009).....	6
Figura 3: Traqueotomia: (a) stent em espiral Øext 9,1mm #1mm; (b) incisão longitudinal e exposição da traquéia (seta); (c) posicionamento do stent (seta) no interior da traqueia; (d) sutura externa.	26
Figura 4: Craniotomia (a) local do posicionamento da blenda; (b) sutura externa; (c) blenda <i>in situ</i> aos 60 dias de pós-operatório; (d) imagem de análise histológica apresentando Intensa neovascularização nos tecidos circunjacentes à blenda.....	28
Figura 5: Fluxograma experimental.	31
Figura 6: Amostras (a) FD tridimensional - vista de topo, (b) FD bidimensional, (c) FS tridimensional - vista de topo, e (d) FS bidimensional.	34
Figura 7: Espectro de infravermelho de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.	47
Figura 8: Espectro de RMN da blenda PLGA/PI.....	49
Figura 9: Termogramas de DSC de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.....	51
Figura 10: Curvas (a) TGA de PLGA, PI e blenda PLGA/PI e (b) derivadas das curvas TGA.....	53
Figura 11: Ângulo de contato para PLGA, PI e blenda PLGA/PI.....	57
Figura 12: Curvas tensão-deformação em tração de (a) PLGA, (b) PI, e (c) PLGA/PI.	58
Figura 13: Microscopia óptica de fibras (a) FD e (b) FS.....	61
Figura 14: Diâmetro de fibras e tamanho de poros em <i>scaffolds</i> FD e FS..	62
Figura 15: Porosidade de <i>scaffolds</i> FD e FS.....	63
Figura 16: Densidade de <i>scaffolds</i> FD e FS.....	64
Figura 17: Ângulo de contato para <i>scaffolds</i> FD e FS.....	65
Figura 18: Curva tensão-deformação em compressão de fibras (a) FD e (b) FS.....	67

Figura 19: Curvas tensão-deformação em tração de fibras (a) FD e (b) FS.	69
Figura 20: Microscopia óptica de cultura celular linhagem C2C12 em grupo controle, fibras FD e fibras FS. Barra de escala: 200µm.	72
Figura 21: Determinação de quantidade de lactato desidrogenase para C2C12 em diferentes meios de cultura.*diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	73
Figura 22: Microscopias de fluorescência de culturas celulares em diferentes meios de cultura após um e três dias. Barra de escala: 100µm.	75
Figura 23: Espectro de infravermelho de fibras FD e FS.....	76
Figura 24: Termogramas de DSC de fibras FS e FD.....	78
Figura 25: Curvas (a) TGA das fibras FS e FD e (b) derivadas das curvas TGA.	79
Figura 26: Determinação de quantidade celular de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	82
Figura 27: Determinação de quantidade de dsDNA de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	82
Figura 28: Microscopia óptica de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. Barra de escala: 200µm.....	83
Figura 29: Microscopia óptica de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. Setas indicam formação de matriz extracelular. Barra de escala: 50µm.	86
Figura 30: Determinação de quantidade celular de fibroblastos sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	87
Figura 31: Determinação de quantidade de dsDNA de fibroblastos sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	87
Figura 32: Microscopia óptica de fibroblastos sobre fibras FD e grupo controle. Barra de escala: 200µm.....	88

Figura 33: Determinação de quantidade celular de condrócitos sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	91
Figura 34: Determinação de quantidade de dsDNA de condrócitos sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	91
Figura 35: Microscopia óptica de condrócitos sobre fibras FD e grupo controle. Barra.....	92
Figura 36: Determinação de quantidade celular de hepatocarcinomas sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	95
Figura 37: Determinação de quantidade de dsDNA de hepatocarcinomas sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	95
Figura 38: Microscopia óptica de hepatocarcinomas sobre fibras FD e grupo controle. Barra de escala: 200 μ m.....	96

Lista de Tabelas

Tabela 1: composições de meios de cultura.

Tabela 2: propriedades de massa molecular e índice de polidispersão de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.

Tabela 3: propriedades mecânicas de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.

Tabela 4: propriedades mecânicas de compressão de *scaffolds* FD e FS.

Tabela 5: propriedades mecânicas de tração de *scaffolds* FD e FS.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

#	Espessura de Parede
%	Porcentagem
%mol	Porcentagem Molar
®	Marca Registrada
°	Graus
°C	Graus Celcius
¹ H NMR	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de Variância
Ch	Quitosana
cm	Centímetro(s)
cm ²	Centímetro(s) Quadrado(s)
cm ³	Centímetro(s) Cúbico(s)
CT	Grupo Controle
dd	Dia(s)
DL PLG	Poli (Ácido D-L-Láctico-co-Glicólico)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
ds-DNA	Ácido Desoxirribonucléico de Cadeia Dupla
ECM	Matriz Extracelular
FBS	Soro Bovino Fetal
FD	Fibras de Gotejamento
FS	Fibras de <i>Electrospinning</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
g	Gramas(s)
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
h	Hora(s)
HA	Hidroxiapatita
Hz	Hertz
IPD	Índice de Polidispersividade
J	Joule
KN	Quilo Newton(s)
kPa	Quilo Pascal
KV	Quilo Volt(s)
LDH	Lactato Desidrogenase
MC	Meio de Cultura
MC-FS	Meio de Cultura após Contato com Fibras de <i>Electrospinning</i>
MEME	Minimun Essential Medium Eagle

MF	Microfibras
mg	Miligrama(s)
ml	Mililitro(s)
Mm	Milímetro(s)
mM	Mili Molar
Mn	massa molecular numérica média
MP	Micropartículas
MPa	Mega Pascal
Mw	massa molecular mássica média
nm	Nanometro(s)
Ø	Diâmetro
Øext	Diâmetro externo
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCL	Poli (Caprolactona)
PEG	Poli (Etileno Glicol)
PEO	Poli (Óxido de Etileno)
PGA	Poli (Ácido Glicólico)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Poliisopreno
PLA	Poli (Ácido Láctico)
PLGA	Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico)
PLLA	Poli (Ácido L-Láctico)
PMMA	Poli (Metil Metacrilato)
ppm	Partes Por Milhão
PVA	Poli (Vinil Álcool)
rpm	Rotações Por Minuto
seg	Segundo(s)
Tg	Temperatura de Transição Vítrea
TGA	Análise Termogravimétrica
TIPS	Separação de Fase por Indução Térmica
Tm	Temperatura de Fusão
u.a.	Unidade Arbitrária
α	Grau de Confiabilidade
δ	Densidade
Σ	Porosidade
σ	Tensão
ϵ	Deformação
Mg	Micrograma(s)
µl	Microlitro(s)
µm	Micrometro(s)
Mseg	Microsegundo(s)
V	Volume

Revisão Bibliográfica

1.1. Engenharia de Tecidos

A perda ou falha de um órgão ou tecido é um dos problemas mais severos da saúde humana. Transplante de tecidos ou órgãos é uma terapia padrão usualmente aplicada para contornar este problema, porém é limitada à compatibilidade genética do paciente e dos doadores disponíveis (KIM & MOONEY, 1998; SHIN et al., 2005). Por esse motivo, outra área de pesquisa que tem recebido crescente atenção é a engenharia de tecidos. Consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do uso de tecidos do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivados *in vitro* sobre suportes biológicos ou sintéticos para serem reinseridos no paciente, visando a formação e ajuste de um microambiente para resposta celular adequada. (BARBANTI et al., 2004; SANTOS et al., 2005).

A engenharia de tecidos pode ser definida então como o cultivo e adesão de células humanas *in vitro* em um *scaffold* ou arcabouço. Estas células proliferam, migram e se diferenciam num tecido específico enquanto produzem os componentes de matriz extracelular (ECM) necessários para criar este tecido. O objetivo da engenharia de tecidos é portanto desenvolver um novo tecido ou órgão substituto para facilitar o restauro e manutenção de funções biológicas (KIM & MOONEY, 1998; SACHOLS & CZERNUSZKA, 2003; ZHANG et al., 2010). No esquema mostrado na Fig. 1 é possível identificar as etapas principais da engenharia de tecidos.

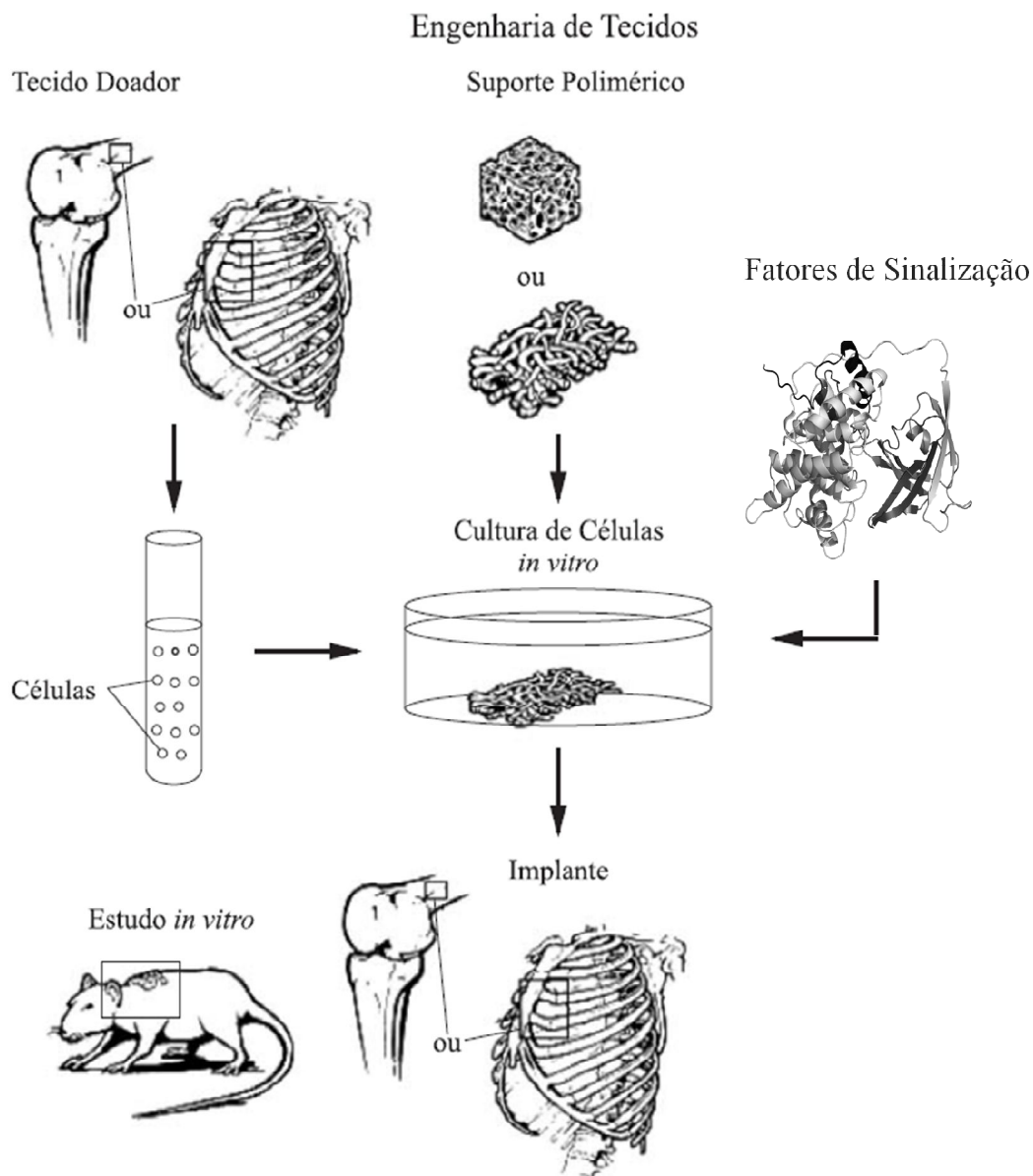


Figura 1: etapas da engenharia de tecidos (BARBANTI et al., 2004).

Enquanto a engenharia de tecidos se resume a três abordagens - células e substitutos celulares; indução de fatores de crescimento tecidual; cultivo de células em *scaffolds* - a terceira é a mais comum, o semeio de células em matrizes de biomateriais (SINGH & UDUPA, 1997). No entanto, várias exigências tem sido identificadas como cruciais na produção desses arcabouços. Tais suportes devem apresentar porosidade interconectada, com poros de escala apropriada para facilitar a integração tecidual e a

vascularização, devem incentivar a adesão, diferenciação e proliferação celular através de propriedades químicas apropriadas em sua superfície, e devem ser produzidos a partir de materiais com biodegradação e/ou bioreabsorção controlada a fim de que o tecido gerado eventualmente substitua o *scaffold*. Além disso o material deve ser facilmente manufaturado em uma variedade de formatos e tamanhos, e apresentar propriedades mecânicas condizentes com o local de implante, tudo isso sem induzir nenhuma reação adversa (MCCULLEN et al., 2011; SACHOLS & CZERNUSZKA, 2003; ZHANG et al., 2010).

Atender a estas características é uma tarefa complicada, embora o maior desafio no desenvolvimento de um biomaterial siga sendo a exploração da versatilidade das aplicações biomédicas usando um sistema simples, barato, robusto e reprodutível. Cada tecido ou órgão tem uma organização estrutural característica, a qual é fortemente relacionada com suas funções fisiológicas (MA & ZHANG, 2001). Arcabouços biomiméticos tem recebido considerável atenção na engenharia de tecidos nos últimos anos, especialmente porque eles simulam a matriz extracelular, provendo um ambiente fisiológico otimizado para as células (MISEREZ et al., 2015). O objetivo chave neste contexto é então projetar uma ECM que forneça as características essenciais presentes na matriz extracelular natural, especificamente na sua habilidade de direcionar e controlar o comportamento celular, mas apresentando o mínimo de complexidade (ZHOU et al., 2009).

Para simular o processo biológico durante a cura de um ferimento e a remodelagem de um tecido, a engenharia de tecidos considera o uso de componentes da ECM como um aspecto chave para o reparo tecidual. A matriz extracelular fornece não apenas o suporte estrutural mas também as características bioquímicas necessárias para moderar a fisiologia e o fenótipo celular (HIDALGO-BASTIDA & CARTMELL, 2010). Pode-se sugerir inclusive que, para células dependentes de adesão, parâmetros de superfície do material como a topografia podem desenvolver um papel de destaque na formação e manutenção da integridade tecidual, bem como na organização do tecido, controle de uma grande variedade de atividades celulares. As células respondem às diferenças nestes parâmetros superficiais alterando sua orientação, sua taxa de mobilidade e atividade, crescimento e diferenciação, e modulação da expressão genética (BEN-NISSAN et al., 2004). Uma relação

consistente entre a topografia do *scaffold* e a resposta celular a este ambiente pode ser crucial para o sucesso da formação tecidual. O arcabouço é, portanto, um componente primordial para a engenharia de tecidos (MA & ZHANG, 2001).

A aplicação de polímeros como biomateriais é bem conhecida desde a década de 1960, quando o uso de Poli (Ácido Lático-co-Glicólico) (PLGA) surgiu na área clínica como fio para sutura (MIDDLETON & TIPTON, 2000). Quando um polímero apresenta biocompatibilidade, biofuncionalidade, e bioadaptabilidade, se mostrando viável para aplicações médicas, ele pode ser chamado de biopolímero (VISSER et al., 1996). Em uma das abordagens sobre engenharia de tecidos, transita a ideia de criar um *scaffold* bioativo que proporcione uma liberação local de fatores de crescimento, influenciando a cura tecidual. Veículos de liberação como *scaffolds* de polímeros bioabsorvíveis são portanto uma fonte óbvia de interesse em pesquisa, visto que drogas ou mesmo proteínas influentes podem estar ligadas covalentemente dentro do polímero e ser liberadas *in situ* gradativamente, ou mesmo estar presas entre as cadeias dos polímeros, provendo fatores de crescimento iniciais no local do implante (CARTMELL, 2009).

A existência de uma ampla gama de polímeros, com as mais variadas propriedades, processabilidades e desempenhos, torna esta classe de materiais muito atrativa para a manufatura de diferentes tipos de arcabouços. Polímeros biodegradáveis de origem natural como o colágeno, a quitosana e a celulose, ou polímeros sintéticos como os Poli (α Hidróxi Ácidos), tem sido usados na fabricação de *scaffolds* (MARTEL-ESTRADA et al., 2012). No entanto, células não necessariamente reconhecem todos os tipos de superfícies, e mais importante, dependendo do processo de fabricação escolhido, as células podem apresentar dificuldades de migrar mais do que 500 μ m além da superfície do arcabouço, comprometendo a proliferação celular e a formação tecidual (SACHOLS & CZERNUSZKA, 2003). Por isso, o projeto do *scaffold* previamente à exposição a células é de vital importância. O *scaffold* deve apresentar uma superfície que promova adesão, crescimento e diferenciação celular, enquanto ofereça uma estrutura porosa para crescimento do tecido (BASTIEN, 2009; DUGAN et al., 2010; SMITH et al., 2009).

O alto número de técnicas de processamento disponíveis cria alternativas para alcançar suportes que de fato tenham algum efeito sobre o

crescimento tecidual. No entanto, nenhuma das estruturas obtidas até agora reproduz integralmente as propriedades da ECM. É extremamente importante que haja uma perspectiva plausível sobre a relação *scaffold*-célula. Combinar as propriedades específicas do material, a técnica de processamento adequada, e as necessidades particulares da linhagem celular que será cultivada continua sendo a melhor perspectiva para engenharia de tecidos.

1.2. Técnicas de Processamento

Uma ampla variedade de técnicas vem sendo aplicadas na fabricação de arcabouços para engenharia de tecidos: lixiviação de partículas salinas em polímeros dissolvidos; obtenção de espumas por aplicação e expansão de gás; secagem por congelamento; moldagem por injeção; formação de fibras; técnicas têxteis; separação de fase por indução térmica; *electrospinning*; *electrospraying*; entre outras. Cada técnica dispõe uma estrutura interna específica, cada uma com suas vantagens e desvantagens, mas todas visando um espaçamento satisfatório para proliferação celular em ambiente tridimensional durante a cultura (PISKIN et al., 2008; SHIN et al., 2005; SMITH et al., 2009). A fig.2 mostra distintos tipos de estrutura que um *scaffold* pode apresentar, dependendo da técnica de processamento aplicada.

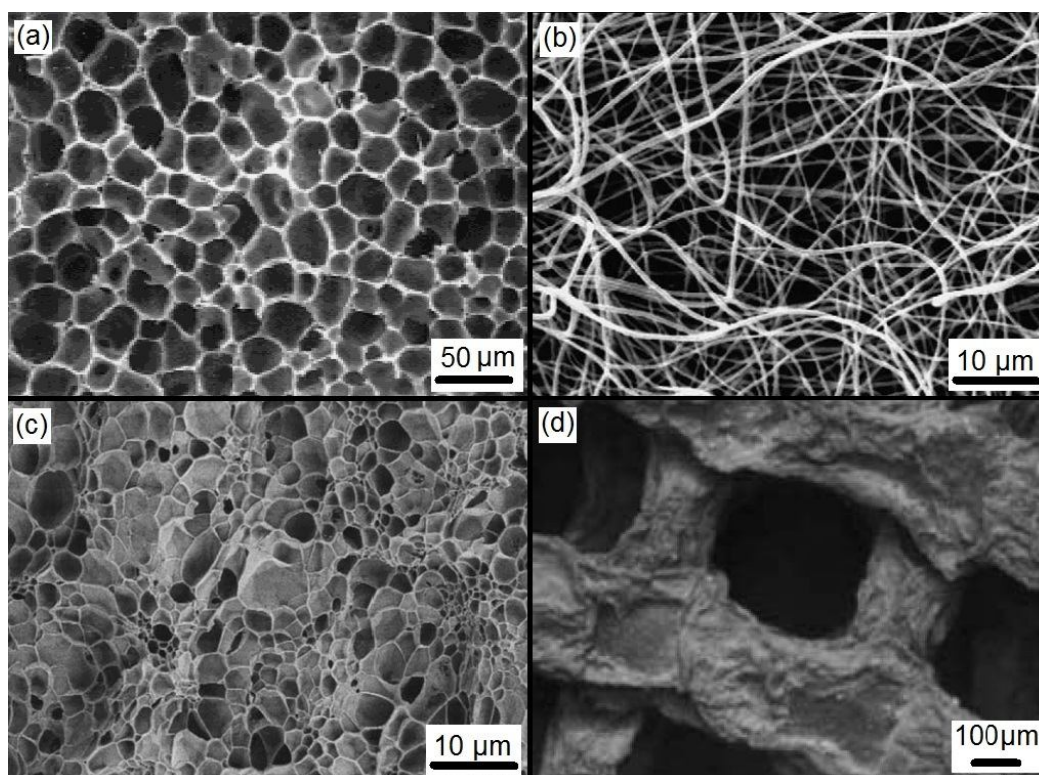


Figura 2: Estrutura interna de scaffolds obtidos por (a) separação de fase por indução térmica (NAM & PARK, 1999), (b) electrospinning (SMITH & MA, 2004), (c) expansão de gás (LIPS, et al., 2005), e (d) manufatura aditiva (BASTIEN, 2009).

A técnica de separação de fase é baseada na separação termodinâmica de uma mistura homogênea entre polímero e solvente. Trata-se da solubilização de um determinado material em solvente específico, visando homogeneidade na mistura. O material resultante é induzido a temperaturas extremamente baixas, levando a solução ao congelamento. Ocorre então a nucleação e crescimento de uma região metaestável. A região não estável é então decomposta e removida por sublimação a alto vácuo, proporcionando à estrutura remanescente uma morfologia porosa e interconectada. Esta técnica de secagem pode também ser útil para estruturas fibrosas obtidas previamente ao congelamento, onde o solvente removido por sublimação não exerce uma influência direta sobre a estrutura final formada (CHAN, 2006; GU et al., 1999; NAM & PARK, 1999; SACHLOS & CZERNUSZKA, 2003; YANG et al., 2006). Este fenômeno tem sido aplicado com sucesso em soluções poliméricas para fabricar materiais funcionais, como membranas poliméricas para filtração (JIAN & CHAN, 2007).

Dependendo da interação solvente-polímero, existem três mecanismos distintos de separação de fase por indução térmica (TIPS) (GU et al., 1999):

- I. TIPS sólido-líquido: o polímero cristaliza a partir da mistura dissolvida;
- II. TIPS líquido-sólido: ocorre cristalização do solvente a partir da mistura dissolvida, seguido de solidificação do polímero;
- III. TIPS líquido-líquido: forma-se uma matriz líquida rica em polímero, com uma região dispersa deficiente da presença de polímero, com subsequente solidificação do polímero.

Em todas elas a solução polimérica é seca em estado congelado a fim de produzir uma estrutura porosa. Uma das vantagens da técnica reside no fato que uma ampla variedade de estruturas porosas pode ser facilmente obtidas pelo ajuste de parâmetros cinéticos e termodinâmicos. No entanto, um controle restrito sobre a relação polímero-solvente pode ser crucial na obtenção de um tamanho e formato de poro ideal (NAM & PARK, 1999).

A técnica conhecida como *foaming* se baseia na criação de espaços internos em um polímero por adição de sais sólidos ou pela ação de expansão de gases, gerando uma estrutura interna similar a uma espuma. O processo com sais sólidos consiste basicamente da solidificação de uma solução polimérica e posterior lavagem dos sais, produzindo uma estrutura porosa. No entanto, a liberação do sal nem sempre é eficaz, deixando contaminantes em potencial dentro do *scaffold*. Como alternativa, o processo de expansão de gases faz uso da nucleação e crescimento de bolhas de gás (fase interna) dispersas através do polímero (fase contínua). Tais bolhas podem gerar porosidade por reação química ou pela adição de um gás inerte à fase polimérica, a baixas ou altas pressões. Com a diminuição da solubilidade do gás dentro do polímero por ações termodinâmicas, as moléculas de gás estouram em formas de núcleos. O formato de tais núcleos exercerá forte influência sobre a morfologia do *scaffold* e as propriedades do material. Antes do fim do processo, um surfactante é adicionado para estabilizar a estrutura interna, prevenindo o escoamento de líquidos remanescentes, o que geraria o colapso das bolhas. A desestabilidade da estrutura polimérica pode também

ser minimizada através do aumento da viscosidade da solução, utilizando polímeros que sofrem solidificação mais rápidas pela variação de temperatura, ou pela adição de um iniciador e um intercruzante ao polímero, induzindo assim uma rápida polimerização após a geração das bolhas. Apesar destas alternativas, o controle do tamanho de poros e sua interconectividade pode se tornar um empecilho durante a aplicação desta técnica (DEHGHANI & ANNABI, 2011; LIPS et al., 2005; MIKOS et al., 1993).

Um método amplamente estudado para obtenção de fibras é o *electrospinning*. A técnica procede através da injeção de uma solução polimérica por um capilar, formando uma gota suspensa pela força da gravidade ou bombeamento mecânico combinado com uma carga eletrostática. O jateamento do polímero é iniciado quando a carga eletrostática supera a tensão superficial da gota. As fibras se formam quando do aumento da carga, estreitando a superfície inferior da gota em direção a um coletor, onde a diferença de potencial está posicionada. A variação do diâmetro da fibra é controlada pela variação da concentração do polímero dissolvido, bem como pela carga aplicada entre a saída do capilar e o coletor. Outros parâmetros que influenciam o material resultante são: peso molecular e taxa de distribuição das cadeias poliméricas; viscosidade e condutividade da solução; diâmetro da saída do capilar; taxa de fluxo da solução; potencial elétrico aplicado; distância entre capilar e coletor permitindo a volatilização do solvente (SMITH & MA, 2004; SMITH et al., 2009; VASITA & KATTI, 2006; YANG et al., 2006)

Electrospinning convencional é aplicado para obtenção de micro e nano fibras orientadas randomicamente. No entanto, a aplicação de um coletor cilíndrico em rotação controlada pode proporcionar um alinhamento nas fibras. Embora a técnica seja tipicamente usada para produzir suportes de cultura 2D, a sobreposição das fibras geradas vem sendo investigada para cultura 3D. As dificuldades encontram-se na ausência de definição de uma estrutura homogeneamente interconectada, permitindo a proliferação do tecido, bem como de um espaçamento micrométrico entre as fibras, facilitando a cinética de proliferação das células. A ocorrência de uma alta variação no tamanho das fibras também pode ser considerado um fator agravante. No entanto, os arcabouços obtidos por fibras aumentam a funcionalidade celular se

comparados a *scaffolds* de parede sólida, permitindo que a cultura gere um tecido mais organizado e mais próximo à estrutura apresentada por matrizes extracelulares naturalmente alinhadas, como os tecidos musculares (AVISS et al., 2010; PISKIN et al., 2008; SMITH et al., 2009; VASITA & KATTI, 2006; YANG et al., 2006).

O método de gotejamento foi concebido como uma alternativa para obtenção de fibras poliméricas em escala micrométrica. Consistindo da exposição de um polímero dissolvido a um reagente orgânico, este método gera fibras pela precipitação do polímero e separação simultânea do solvente num reagente em rotação constante. Pelo controle da taxa de exposição do polímero, tipo de reagente de precipitação e sua velocidade de agitação mecânica, é possível controlar o diâmetro e uniformidade morfológica das fibras. Até então utilizadas como matrizes reforçadas mecanicamente com fosfato de cálcio para engenharia de tecidos ósseos, tais fibras foram obtidas em PLGA e em alginato de sódio, utilizando-se de álcool metílico, álcool etílico e/ou álcool isopropílico como reagentes de precipitação, sem sofrer alterações nos grupamentos químicos do polímero durante o processo. Para total separação da fase polimérica em meio alcoólico, liofilização é aplicada à emulsão pós-precipitação, proporcionando como resultado final fibras secas e sem orientação paralela que podem ser aplicadas então como reforço e possivelmente como *scaffolds* para engenharia de tecidos moles (DOS SANTOS et al., 2011; VASCONCELLOS & DOS SANTOS, 2012a; 2012b; 2013).

As limitações dos métodos convencionais tem conduzido à busca por uma técnica que proporcione designs customizados e fabrique *scaffolds* porosos com a rede de poros inteiramente interconectada. A tecnologia de manufatura aditiva foi lançada no mercado no fim dos anos 1980 com a introdução do sistema de estereolitografia, o qual é hoje utilizada em praticamente todas as áreas da engenharia. Atualmente, técnicas como modelagem por fusão-deposição e sinterização seletiva a laser são também muito populares. A manufatura aditiva se tornou então uma ferramenta poderosa para fabricação de arcabouços para engenharia de tecidos. Por esta técnica é possível desenvolver *scaffolds* diretamente a partir de uma imagem

obtida e/ou um modelo computadorizado da lesão do paciente, provendo um arcabouço estruturalmente e mecanicamente perfeito para a regeneração tecidual. A manufatura aditiva trata-se do processo de criar estruturas tridimensionais a partir da repetitiva deposição de camadas de material, usando equipamentos controlados por computador, baseado em dados obtidos pelo fatiamento de um modelo do *scaffold* projetado em *software* específico. Detendo total controle sobre porosidade da peça, permeabilidade, tamanho e formato de poro, a técnica de manufatura aditiva pode produzir estruturas com porosidade inteiramente interconectada. Além disto, a técnica permite a investigação do efeito da geometria do *scaffold* sobre o comportamento celular, permitindo uma mais profunda otimização do projeto do arcabouço. As diferentes técnicas de manufatura aditiva são particularmente uteis para a engenharia de tecidos, uma vez que permitem excelente reprodutibilidade no formato das peças, bem como a produção de praticamente qualquer tipo de design de estrutura, obviamente dentro das limitações específicas da técnica escolhida. É possível pois projetar uma estrutura que simule o tecido natural a ser substituído, ou mesmo criar implantes perfeitamente personalizados para a lesão do paciente. Infelizmente, esta técnica apresenta restrições quanto ao tipo de polímero que pode ser aplicado, bem como limitações na obtenção de estruturas com tamanho de poro reduzido (BASTIEN, 2009; BERTOL, 2008; HOQUE, 2011).

1.3. Polímeros Naturais

Polímeros encontrados na natureza e modificados para consumo são denominados polímeros naturais (LUCAS et al., 2001). Uma vez que eles estão disponíveis em abundância, esses materiais apresentam geralmente um baixo custo e estão sendo propostos como alternativa aos biomateriais atualmente utilizados em aplicações clínicas. Além disso, tais materiais apresentam excelente biocompatibilidade, versatilidade, baixa toxicidade e boa similaridade estrutural com tecidos humanos, especialmente por serem sintetizados a partir de ácidos fracos, polissacarídeos ou proteínas. Uma desvantagem da aplicação de polímeros naturais como biomateriais reside no fato de frequentemente apresentarem uma alta imunogenicidade, o que deriva

precisamente da sua similaridade com substâncias naturais. As reações adversas podem ser eliminadas desde que os antigênicos específicos tenham sido previamente modificados quimicamente (ARAÚJO, 2005; BARSAM et al., 2003; STEVENS, 1999; YANNAS, 1996). Além disso, a ausência de um controle preciso durante sua obtenção pode acarretar na ausência de uniformidade na composição química de tais polímeros em diferentes períodos. Entre os polímeros naturais mais utilizados na engenharia de tecido atualmente encontram-se alginato, quitosana, colágeno, celulose, agarose, entre outros.

Alginato de sódio é um polissacarídeo biocompatível, solúvel em água, extraído principalmente de algas marinhas castanhas, usado em liberação de fármacos, curativos para feridas, e engenharia de tecidos. Géis de alginato inter cruzados ionicamente são bioabsorvíveis, uma propriedade que pode ser ajustada pela modificação da composição e da massa molecular das cadeias poliméricas. Alginatos são fundamentalmente compostos de blocos de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G) (BONINO et al., 2011). Na presença de certos cátions, como Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} , o alginato tem a habilidade de formar hidrogéis estáveis através da interação iônica entre os cátions e o grupo funcional carboxila do bloco G do alginato. Este processo de inter cruzamento transforma o alginato em um composto insolúvel em meios aquosos, como meio de cultura, permitindo seu uso na produção de arcabouços tridimensionais (VALENTE et al., 2012).

Mantas nano fibrosas de alginato podem ser fabricadas por *electrospinning*. Embora as tentativas de processar solução de alginato em água por *electrospinning* tenham falhado, soluções de alginato tem sido misturadas com um segundo material a fim de formar nano fibras. Acredita-se que o segundo cosolvente/polímero atenua a repulsão entre as cadeias de alginato, melhorando a flexibilidade das cadeias, criando pontes de hidrogênio. Blendas de alginato com glicerol, Poli (Vinil Álcool) (PVA), e Poli (Óxido de Etileno) (PEO) tem mostrado resultados promissores entre as soluções com base de alginato processadas por *electrospinning*. Nanofibras de alginato puro podem ser obtidas pelo inter cruzamento das fibras de *electrospinning* com cálcio e posterior remoção do segundo material por imersão das nanofibras em

água. No entanto, tal processo pode ocasionar a redução do iâmetro das fibras e seu consequente enfraquecimento (BONINO et al., 2011).

Valente e colaboradores (2012) estudaram a produção de *scaffolds* a base de alginato. Foram produzidos arcabouços a partir de micropartículas (MP) e microfibras (MF) de alginato, visando aplicação em engenharia de tecidos ósseos. O diâmetro variou entre 500-750µm para as micropartículas e entre 300-400µm para as microfibras. Devido à natureza hidrofílica dos alginatos, as amostras apresentaram alta capacidade de inchamento, e a análise das propriedades mecânicas apontaram que o módulo elástico e a resistência a compressão de ambos os *scaffolds* era compatível para sua aplicação em regeneração de osso trabecular. Embora ambos arcabouços apresentarem uma porosidade similar, em torno de 7%, *scaffolds* MF mostraram maior tamanho de poro e maior área superficial apropriada para engenharia de tecido ósseo, quando comparados com *scaffolds* MP. Além disso, o aumento do diâmetro do poro devido à maior capacidade de inchamento do *scaffold* demonstra aplicabilidade à regeneração óssea.

Outro polímero natural aplicado à engenharia de tecidos, a quitosana é um polissacarídeo linear, consistindo de 2-amino-2-desoxi-β-D-glucopiranosose e 2-acetamido-2-desoxi-β-D-glucopiranosose. Trata-se do produto desacetilado da quitina, a qual pode ser obtida a partir de exoesqueletos de insetos e conchas de crustáceos.. Este biopolímero tem sido usado como veículo para liberação controlada de fármacos, materiais ortopédicos e cirúrgicos, tratamento de ferimentos, e arcabouços para engenharia de tecidos. Quitosana apresenta propriedades como bioatividade, biocompatibilidade e bioreabsorção, formação de poros espontânea, adequação ao crescimento celular e natureza antibacteriana intrínseca. No entanto, apesar de tais propriedades, quitosana apresenta propriedades mecânicas pobres, o que faz dela um polímero geralmente estudado na composição de blendas com outros materiais (MARTEL-ESTRADA et al., 2012; VENKATESAN et al., 2012).

Um destes estudos analisou a blenda de quitosana (Ch) com poli (ácido D-L-láctico-co-glicólico) (DL PLG). A superfície do DL PLG é hidrofóbica, o que desfavorece a biocompatibilidade durante o contato com ambiente

biológico. O uso da quitosana permite o aumento da hidrofília do compósito, aumentando a penetração do meio de cultura e melhorando a aderência e proliferação celular. Por outro lado, a adição de DL PLG melhora as propriedades mecânicas da quitosana. Os *scaffolds* foram então conformados em estrutura porosa por processo de liofilização. Tais arcabouços de Ch/DL PLG se mostraram não tóxicos, facilmente fabricáveis, e proveram porosidade com boa interconectividade para aplicações biológicas. Nos ensaios de cultura celular, osteoblastos apresentaram habilidade de aderir, proliferar e diferenciar no *scaffold*. Após 14 dias de cultivo, aderência e proliferação não apresentaram diferença significativa entre *scaffolds* de quitosana pura e *scaffolds* Ch/DL PLG, o que leva a concluir que as propriedades mecânicas deste último tornam-se um diferencial de tal material em aplicações para tecidos rígidos (MARTELESTRADA et al., 2012).

A fim de atingir níveis ainda mais altos de propriedades mecânicas, alguns pesquisadores combinam quitosana com biocerâmicas (BHAT & KUMAR, 2012; VENKATESAN et al., 2012). Um *scaffold* poroso foi obtido a partir da combinação de uma blenda quitosana/gelatina, misturada a diferentes proporções de vidro bioativo. O biovidro foi adicionado com o intuito de estimular biomineralização. Sendo os *scaffolds* preparados por separação de fase induzida termicamente, seu tamanho de poro pôde ser controlado pelas configurações de temperatura durante o processamento. Análises morfológicas e bioquímicas usando linhagens humanas de osteoblastos e células-tronco mostraram que as células mantêm sua atividade metabólica e habilidade de proliferação no *scaffold*. A diferenciação e proliferação foi observada com relevância nas células-tronco, sendo que o aumento da concentração de vidro bioativo foi observada como benéfica para a cultura celular. Tal fato indica a capacidade destes *scaffolds* em modular as propriedades osteogênicas das células (GENTILE et al., 2012).

Também um polímero natural, o colágeno é um composto peptídico, hidrofílico na sua conformação *in natura*, suscetível a degradação por ação enzimática (KANE et al., 1996). Nos tecidos de vertebrados, o colágeno ocorre em pelo menos dez formas diferentes, cada uma sendo dominante em tecidos específicos. Em pele, tendões e ossos, o colágeno Tipo I é majoritário,

enquanto o Tipo II é predominante em cartilagens. O colágeno representa quase 30% do total de proteínas do corpo humano (YANNAS, 1996). Dependendo do tratamento químico previamente à aplicação, este material pode apresentar imunogenicidade maior que aquela apresentada por polissacarídeos. No entanto, os colágenos apresentam propriedades imunogênicas fracas se comparadas à maioria das proteínas. Por ser uma substância amplamente estudada, o controle de suas propriedades físico-químicas é deveras conhecido, incluindo propriedades como deformação por viscoelasticidade e taxa de degradação, o que pode ser controlado ou pelo inter cruzamento das fibras de colágeno ou por incorporação de outras materiais (KANE et al., 1996). Com a necessidade de simular a matriz extracelular e formar *scaffolds* apropriados para formação tecidual, alcançar uma estrutura próxima à do colágeno pode conduzir à engenharia de tecidos mais parecidos com tecidos naturais. A estrutura fibrosa do colágeno torna-se então importante para adesão, proliferação e diferenciação celular, especialmente quando o diâmetro de fibras em *scaffolds* se aproximam ao tamanho dos feixes de fibras de colágeno, entre 50-500nm (SMITH & MA, 2004).

Uma vez que o colágeno é um componente relevante em tecidos ósseos, estudos sobre a mineralização e formação/crescimento ósseo estão em foco atualmente. Kruger e colaboradores (2011) compararam a mineralização de *scaffolds* de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e *scaffolds* de colágeno Tipo I, ambos conformados por *foaming*. O estudo consistiu de cultura de células-tronco mesenquimais, expostas por 12 semanas a meio de cultura osteogênico e angiogênico. Após oito semanas, as células-tronco cultivados em colágeno apresentaram densidade mineral significativamente maior do que a apresentada nos *scaffolds* PLGA. No entanto, os *scaffolds* de colágeno tipo I exibiram significativa contração em seu volume durante o cultivo celular a longo prazo. Enquanto os arcabouços de PLGA contraíram em média 32% ao fim de 12 semanas, os arcabouços de colágeno contraíram 99%. Tal fato implicou na mineralização prematura e em maior proporção apresentada pelos *scaffolds* de colágeno, não desmerecendo sua potencial aplicabilidade na cultura de células tronco para diferenciação a osteoblastos.

A agarose é um polissacarídeo naturalmente encontrado em algas marinhas. Conhecida como um biopolímero reabsorvível, tem sido selecionada como matriz orgânica na engenharia de tecidos por se tratar de um hidrogel que age como agente de gelificação, proporcionando géis mais fortes, rápida polimerização a temperatura ambiente, e propriedades relacionadas em termos de dureza e permeabilidade à água (SÁNCHEZ-SALCEDO et al., 2008). Agarose forma géis termoplásticos, ou seja, o processamento térmico é reversível, especificamente quando resfriado de 99°C a temperatura ambiente. Além disso, o polímero exibe propriedades moleculares similares à ECM natural, permitindo difusão e transporte de oxigênio, nutrientes essenciais e produtos de secreção através da estrutura (GU et al., 2003; SAKAI et al, 2007).

Recentemente, nanoestruturas fibrosas de agarose tem sido analisadas para aplicação em engenharia de tecidos da córnea. Este modelo de córnea artificial apresenta ótimos níveis de transparência, similares ao tecido nativo, além dos três tipos de células córnea (endotelial, estromal e epitelial) terem sido cultivados com sucesso tanto na superfície quanto no interior do *scaffold*, indicando um tratamento em potencial para regeneração da córnea por engenharia de tecidos (IONESCU et al., 2011). Pesquisas com hidrogel de agarose também são conduzidas para regeneração de cartilagem. A aplicabilidade de *scaffolds* no cultivo de condrócitos traz resultados promissores. A principal vantagem desta conformação reside na possibilidade de injetar a estrutura hidrogel/célula no local lesionado por processos minimamente invasivos, prezando pelo bem estar do paciente (BHAT et al., 2011).

A celulose é um polímero linear, apresentando um dissacarídeo como mero, sendo encontrado mais comumente em plantas de grande porte, algas, alguns fungos, bactérias e tunicatos. Em particular, o interesse por celulose bacteriana para aplicações clínicas tem crescido devido à combinação de propriedades mecânicas, porosidade, biocompatibilidade e habilidade de manter o ambiente de aplicação hidratado durante a cura de um ferimento. Apesar de ser considerada biocompatível, a celulose apresenta uma imunogenicidade apenas moderada no ambiente *in vivo*. A celulose também pode ser considerada como não reabsorvível devido à ausência de enzimas

específicas no corpo humano. Sua cristalinidade, hidratação e inchamento podem determinar a velocidade de degradação, no entanto este processo mostrar-se-á lento (DUGAN, 2011; KLEMM et al., 2005). Celulose tem sido usada como substrato para síntese de peptídeos sólidos e, mais recentemente, tem sido funcionalizada curtas sequências de peptídeos a fim de controlar sua interação com células cultivadas em sua superfície (MALASKAR et al., 2008).

Estudos recentes utilizando nanofibras de celulose exploraram o efeito da orientação da fibra sobre o tecido cultivado. O objetivo por trás do uso de nanofibras alinhadas é direcionar a diferenciação celular e obter um crescimento tecidual mais definido, simulando a matriz extracelular natural. Dugan e colaboradores (2010) cultivaram células musculares esqueléticas da linhagem C2C12 sobre nanofibras de celulose, obtida a partir de tunicatos. A orientação das fibras torna interessante no cultivo de células musculares devido ao fato que tais células podem atingir dimensões em torno de 100 µm de diâmetro e 30cm em uma única célula multinucleada, como comumente encontradas nos músculos da coxa (LEWIS et al., 2009). Foi observado que as fibras, obtidas por *electrospinning*, induziram na proliferação e diferenciação celular, sendo o material considerado promissor devido à excelente adesão tecidual promovida para tal linhagem (DUGAN et al., 2010).

Outro polímero obtido a partir de fontes naturais e comumente aplicado na área clínica é o látex. Extraído do caule da seringueira - *Hevea brasiliensis* - trata-se de um líquido leitoso, constituído majoritariamente de meros *cis* e *trans* Poliisopreno (PI) além de proteínas lipídicas e fosfolipídicas (LOPES, 2002). Apesar de também ser obtido a partir de sintetização em laboratório, a obtenção por fontes naturais segue sendo a mais popular, principalmente devido ao baixo custo e alta escala de produção. Apesar de ainda hoje ser aplicado mais expressivamente na indústria automobilística, graças ao processo de vulcanização pela adição de enxofre, idealizado por Charles Goodyear em 1839, o látex teve seu consumo na área médico-hospitalar extrapolado a partir da década de 1980, com a conscientização sobre enfermidades como AIDS e hepatite (APABOR, 2010; HALL et al., 2008). O uso obrigatório de luvas de látex por profissionais da saúde a partir deste

período trouxe uma maior clareza a respeito dos pontos positivos e negativos da aplicação deste material em contato direto com o corpo humano.

Apesar de apresentar excelentes propriedades elásticas e funcionalização como barreira biológica, o Poliisopreno pode provocar hipersensibilidade cutânea devido a presença de aproximadamente 60 proteínas alergênicas e mais de 200 tipos diferentes de aditivos químicos após o processamento do material em produto para consumo (LACKMAN, 2011; LOPES, 2002). Tai proteínas se devem ao composto ser naturalmente um exsudado citoplasmático do caule da planta, gerado para fins de cicatrização. Algumas soluções são indicadas para a redução da quantidade de proteínas alergênicas previamente à aplicação do polímero em contato com o corpo humano. Adição de enzimas proteolíticas ao material podem oportunizar a quebra de ligações peptídicas das proteínas com o PI. A adição de solventes polares na solução de borracha de látex centrifugada e/ou a subsequente centrifugação na presença de surfactantes tende a modificar o ambiente químico da solução, quebrando ligações e hidrogênio e níveis de nitrogênio entre proteínas e polímero (AMNUAYPORNRSRI et al., 2010; BRYDSON, 1988; LACKMAN, 2011; TARACHIWIN et al., 2005).

Por não ser um polímero bioreabsorvível ou mesmo biodegradável, o Poliisopreno não é até então aplicado à engenharia de tecidos (CHEN et al., 2013). No entanto, aplicações cirúrgicas previamente estudadas indicam uma indução a regeneração celular e neovascularização, provocadas pela presença deste polímero. Quando aplicado como membrana para reparo de diafragma de coelhos, o PI apresentou biocompatibilidade, adequada integração e ausência de rejeição, além de excelentes propriedades angiogênicas, que garantiram irrigação sanguínea no local do implante, acelerando o período de recuperação tecidual (FRIOLANI, 2008). O mesmo comportamento foi reportado pelo uso de membranas para reparo de perfuração timpânica em coelhos e humanos, bem como para aplicações oftalmológicas (MRUE et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2003; TALIERI et al., 2009). Este desencadeamento de angiogênese pelo látex incentivou também estudo na produção de substitutos arteriais. Consistindo de uma cânula de Poliamida e elastano embebida em látex natural centrifugado, o substituto arterial demonstrou propriedades

mecânicas como adaptabilidade, elasticidade, impermeabilidade e possibilidade de sutura, que favoreceram sua aplicação como substituto vascular. Em relação às propriedades biológicas, mostrou-se biocompatível no sistema arterial, apresentando adequada integração tecidual e crescimento endotelial além das regiões de contato com a artéria (BRANDÃO et al., 2007). Cabe ressaltar que em nenhum dos casos o Poliisopreno aplicado foi vulcanizado. Tais propriedades angiogênicas podem servir como um incentivo à utilização deste material na engenharia de tecidos que carecem de alta irrigação sanguínea durante cicatrização.

1.4. Polímeros Sintéticos

Polímeros sintéticos são aqueles obtidos industrialmente, em geral, a partir de moléculas de baixo peso molecular (LUCAS et al., 2001). Na sua maior parte originados a partir de monômeros oriundos de subprodutos do petróleo, os polímeros sintéticos podem ter características como peso molecular e comprimento de cadeia controladas durante seu processo de polimerização. Através deste controle é possível a manipulação do tempo de degradação/absorção *in situ*, o que indica um fator primordial na engenharia de tecidos. Dependendo da linhagem celular cultivada e do tecido a ser substituído, o tempo de degradação ideal diverge (RATHBONE et al., 2009). Polímeros como Poli (Caprolactona) (PCL), Poli (Etileno Glicol) (PEG), Poli (Ácido Lático) (PLA), Poli (Ácido Glicólico) (PGA), bem como blendas e copolímeros entre estes são amplamente estudados a fim de gerar uma ideal relação entre estrutura, resposta celular e taxa de degradação em *scaffolds* para engenharia de tecidos (AVISS et al., 2010; PISKIN et al., 2008; SHI et al., 2002; SHIN et al., 2005).

Quando se versa sobre biopolímeros é impossível não destacar a importância de PLA e PGA. Junto com seu copolímero Poli (Ácido Lático-co-Glicólico) (PLGA), estes representaram uma revolução no desenvolvimento de biomateriais para aplicações clínicas. Ora considerados uma descoberta desastrosa quando de sua descoberta na década de 1930 devido à sua instabilidade hidrolítica e consequente suscetibilidade à degradação, foi só em 1972 que tais polímeros foram direcionados a uma aplicação condizente com suas propriedades, quando introduzidos no mercado como fibras de alta

durabilidade e biocompatibilidade para aplicação como suturas médicas reabsorvíveis (JAHNO, 2005; LUNT, 1998; MIDDLETON & TIPTON, 2000). Com alta cristalinidade e baixa ductilidade, estes polímeros apresentam uma boa processabilidade e excelente biocompatibilidade, o que os conduzem como promissores materiais em estudos clínicos de complexas exigências, como a engenharia de tecidos.

Um arcabouço ideal deve ter sua taxa de degradação condizente com a taxa de crescimento celular, a fim de manter o suporte ideal até o desenvolvimento do novo tecido. No entanto, os produtos da degradação podem ser um problema quando polímeros sintéticos são usados como biomateriais. No caso do PLGA e seus homopolímeros, a degradação gera compostos de baixo peso molecular como lactide e glicolide, os quais ocorrem naturalmente e entram na rota metabólica do organismo, sendo excretados ou reabsorvidos. Outra vantagem do PLGA é a possibilidade de controle sobre sua taxa de degradação deste copolímero pela alteração da proporção de lactide e glicolide nele contido. Enquanto as proporções apresentando um dos monômeros como majoritário pode levar anos para degradar, composições com proporção mais igualitária degradam em poucas semanas. Apesar disso, acredita-se que a degradação do PLGA não exerce um efeito sobre o pH do meio de cultura, indicando este material como compatível para cultura tecidual de longo prazo, uma vez que o pH pode afetar a sobrevivência e o crescimento de culturas celulares (AVISS et al., 2010; MIDDLETON & TIPTON, 2000; SHI et al., 2002).

A processabilidade de PLA, PGA e PLGA também é uma vantagem relevante. Dependendo do processo de obtenção do arcabouço, a variação de parâmetros no processamento pode levar a diferentes estruturas porosas, condizentes com a necessidade particular de cada linhagem celular. PLGA processado por separação de fases por indução térmica, usando 1,4-dioxano como solvente, gerou uma estrutura microtubular orientada, com diâmetros internos dos tubos variando entre 40-240µm. A concentração de polímero na solução exerce efeito sobre a estrutura gerada, sendo que com o aumento desta concentração até um ponto crítico há uma melhora na regularidade dos microtubos e um aumento na espessura das paredes internas da estrutura tubular. Com posterior tratamento superficial de ancoragem de colágeno, estas

estruturas apresentaram resultados positivos no cultivo de células humanas cartilaginosas (linhagem H144), com migração efetiva e crescimento significativo níveis mais distantes da superfície do *scaffold* (YANG et al., 2006).

A obtenção de fibras de PLGA por *electrospinning* apresenta-se como uma alternativa atrativa para culturas celulares que exigem uma orientação topográfica a fim de atingir uma diferenciação eficiente. Dependendo dos parâmetros de processamento, fibras de diferentes diâmetros e distinta organização superficial são obtidas, influenciando a resposta celular *in vitro*. Além disso, as variações na composição do copolímero ditam propriedades mecânicas particulares que exercem influência sobre a diferenciação celular. É conhecido que composições de PLGA apresentando módulo de Young acima de 200kPa permitem a diferenciação de mioblastos em miotubos, suportando as cargas mecânicas exercidas pelo tecido em formação, enquanto os copolímeros com módulo mais baixo sofrem efeito significativo das forças exercidas pelos miotubos, colapsando o arcabouço. Além disso, a comparação entre fibras orientadas paralelamente e fibras com distribuição randômica evidencia que os mioblastos se organizam levando em consideração a topografia em que são semeados, sendo que em fibras alinhadas há expressiva formação de miotubos (AVISS et al., 2010; LEVI-MISHALI et al., 2009).

A aplicação de PLGA como *scaffold* para crescimento de tecido ósseo também é investigada. No entanto, tal tecido necessita de uma estrutura com grande poros e um aditivo que induza a mineralização *in vitro* ou *in situ*, uma vez que o osso é composto majoritariamente do composto cerâmico conhecido como hidroxiapatita (HA). O processamento do PLGA por expansão de gases ou por inserção de sais torna-se atrativo por proporcionar uma estrutura com grandes poros interconectados. A adição de fosfato de cálcio ao polímero em solução ou o cultivo celular em meio osteogênico surgem como alternativas viáveis para a compatibilização e funcionalização do PLGA para cultura óssea. Um estudo comparativo foi realizado entre este polímero e colágeno tipo I, ambos processados por lixiviação de sais para obtenção de estrutura porosa, isentos de fosfato de cálcio. O cultivo de células tronco mesenquimais em meio osteogênico sobre ambos arcabouços mostrou que, embora o PLGA induza a diferenciação das células em osteoblastos, seu processo de mineralização

ocorre tardiamente (após 12 semanas) comparando aos *scaffolds* de colágeno I (após 6 semanas), o que pode representar uma desvantagem na aplicação do copolímero usado para regeneração óssea (KIM et al., 2003; KRUGER et al., 2011). Por outro lado, nanofibras de PLA aditivadas com nanopartículas de HA foram obtidas por *electrospinning* e submetidas a cultura de osteoblastos. A presença da fase cerâmica não só aumentou o módulo elástico e reduziu a cristalinidade do polímero, como também indicou um aumento da atividade osteogênica das células a curto prazo, confirmando a influência da cerâmica e das propriedades mecânicas do substrato sobre a viabilidade de proliferação dos osteoblastos (RIBEIRO NETO et al., 2012).

Poli (Caprolactona) é outro polímero sintético aplicado em engenharia de tecidos. Com conhecida degradabilidade em aplicações clínicas e portando uma estrutura interna semi cristalina, possui uma temperatura de transição vítrea em torno de -60°C , o que confere a este material uma flexibilidade excepcional quando comparado a outros biopolímeros sintéticos, como PLA e PGA. Além de apresentar um baixo custo, este polímero é também solúvel em solventes comuns, como clorofórmio, tetrahidrofurano, tolueno, entre outros (GUPTA et al., 2012).

Apesar de sua flexibilidade, PCL foi apontado como potencial substituto ósseo para regiões com baixa exigência mecânica. Lâminas compostas de nanofibras deste material foram obtidas por *electrospinning* e modeladas em espiral para reparo de tecido ósseo no crânio de ratos. Implantados sem células semeadas ou componentes cerâmicos na estrutura, este substituto ósseo encontrou resultados positivos quando da incorporação do medicamento ativo silvastatina no polímero durante o processamento por *electrospinning*. Em observações por microtomografia após 6 dias do implante indicam uma osteointegração do *scaffold* e mineralização óssea no interior do arcabouço, o que evidencia o potencial do material enquanto substituto ósseo quando provido de um efetivo estimulante de crescimento (PISKIN et al., 2008).

Por outro lado, a adição de nanopartículas de hidroxiapatita ao PCL também gerou um material com potencial funcionalidade quando aplicado à engenharia de tecido ósseo. *Scaffolds* fabricados por manufatura aditiva - sinterização a laser - mostraram uma melhora nas propriedades mecânicas quando a proporção de HA se limitava a 15% da composição do pó sinterizado.

Isto se deve à limitação do movimento molecular das cadeias de PCL, imposta pela presença de partículas de HA. Há também um efeito visível na degradação do material, uma vez que o PCL puro pode levar até dois anos para decompor e a taxa de degradação é significativamente aumentada pela presença das partículas cerâmicas. Foi observada proliferação das células aderidas à superfície do *scaffold* e formação de uma camada de osteoblastos encapsulados nos microporos, com células migrando efetivamente a até 400µm da superfície do arcabouço (EOSOLY et al., 2012).

O Poli (Etileno Glicol) é um polímero que confere uma diferente abordagem à engenharia de tecidos. Enquanto a maioria dos estudos aponta uma preocupação com a estrutura do *scaffold* e sua porosidade, o PEG é amplamente avaliado na sua conformação de hidrogel. Esta conformação permite operações minimamente invasivas pela injeção de células encapsuladas em gel no local específico carente de tratamento e reposição tecidual. O uso de hidrogéis permite o tratamento efetivo a zonas de acesso limitado, como restauração de vértebras. O PEG é ideal para este tipo de tratamento não apenas por sua conformação mecânica, mas também por apresentar alta biocompatibilidade, características físicas versáteis baseadas na massa molecular, comprimento de cadeia polimérica e densidade de ligações cruzadas. Além disso, este polímero tem uma controlada transição entre estados líquido e sólido na presença de células em suspensão. Este processo de gelificação pode ser conduzido em condições não-tóxicas, o que faz do PEG um polímero apropriado para a liberação controlada de fármacos, proteínas e fatores de crescimento específicos à engenharia de tecidos. Devido a estas propriedades únicas, PEG também é alvo de pesquisa envolvendo sua copolimerização com outros monômeros biocompatíveis, alterando as propriedades do polímero final e permitindo uma outra abordagem ao cultivo celular (ALMANY & SELIKTAR, 2005; YU & DING, 2008).

Copolímeros de PLLA e PEG foram concebidos visando aumento da hidrofília dos polímeros e consequente melhora na proliferação celular. *Scaffolds* produzidos a partir deste copolímero por separação de fases induzida termicamente fizeram uso de uma combinação de água e dioxano como solventes. A afinidade celular foi confirmada pelo cultivo de fibroblastos (NIH 3T3) e osteoblastos (MC 3T3) murinos. Enquanto a proliferação de fibroblastos

ficou vinculada à quantidade de PEG incorporada às cadeias poliméricas, osteoblastos apresentaram uma proliferação efetiva por um período de quatro semanas (KIM et al., 2003; WAN et al., 2003).

Não apenas a copolimerização, mas a blenda de polímeros com Poli (Etileno Glicol) também tem efeito sobre as propriedades mecânicas de *scaffolds*. Wang e colaboradores (2012) trabalharam com a blenda de PEG e poliuretano (PU) produzidos por *electrospinning* a fim de reduzir o diâmetro das fibras obtidas. A conformação destas fibras em estrutura tubular apresentou propriedades mecânicas similares a artérias humanas e porcinas, com avaliação *in vitro* indicando hemocompatibilidade e endotelização - formação de tecido epitelial. Os melhores resultados de viabilidade e proliferação celular visando substituição de vasos sanguíneos foi apresentada por composições com 30% de PEG, onde observou-se porosidade de aproximadamente 64% nos *scaffolds* (WANG et al., 2012).

Visando reposição óssea, *scaffolds* fibrosos flexíveis foram compostos pela mistura de copolímeros triblocos de PEG-PCL-PEG e 30% nanopartículas de hidroxiapatita, processados por *electrospinning*. Estes arcabouços obtidos apresentaram boa habilidade de adesão e proliferação de osteoblastos *in vitro*. Durante a degradação dos *scaffolds*, as partículas de HA se tornavam paulatinamente expostas, provendo um microambiente ideal para reação e colonização das células, promovendo efetiva formação óssea (FU et al., 2012).

1.5. Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) / Poliisopreno

Por definição, uma blenda polimérica é a mistura física de dois ou mais polímeros ou copolímeros, que não estão ligados por ligações covalentes (STEVENS, 1999; WARD & HADLEY, 1995). Estas visam a obtenção de características novas através da combinação de propriedades de polímeros distintos (KADLA & KUBO, 2003; MANO, 1999). Uma blenda polimérica pode ser considerada miscível ou imiscível, dependendo das propriedades dos polímeros misturados e da relação que suas estruturas irão estabelecer. Enquanto uma blenda miscível sugere que o nível da mistura molecular de dois ou mais polímeros é adequado para promover propriedades macroscópicas relativas a um material com fase única, uma blenda de dois polímeros

imiscíveis apresenta uma estrutura molecular de duas fases, onde cada fase contém uma concentração diferente e finita de cada polímero. Por mais bem homogeneizada que seja a mistura, blendas imiscíveis apresentarão propriedades distintas dos polímeros, como a existência de duas temperaturas de transição vítrea, por exemplo. No entanto, mesmo misturas imiscíveis podem apresentar propriedades satisfatórias, como resistência à falha por tensão, à fricção e à tração, além de boa processabilidade. O controle sobre os parâmetros usados na técnica de mistura pode ditar as propriedades da blenda, independente de sua miscibilidade (OLABISI et al., 1979; ZOPPI et al., 2001).

O PLGA tem sido aplicado na área médica e farmacêutica não apenas como *scaffolds*, mas também como suturas, placas de fixação óssea, *stents*. Devido às suas excelentes propriedades *in vivo*, seu perfil de comportamento tornou-se um padrão de excelência nestas aplicações (PANDEY et al., 2008). No entanto, uma vez que se trata de um polímero frágil, com baixa deformação plástica, sua aplicação enquanto órtese/prótese conjugado a tecidos moles pode causar danos ao paciente durante o tratamento, especialmente o rasgo do tecido por fragmentos do PLGA gerados durante seu processo de reabsorção (ISOTALO et al., 2005).

Da necessidade de manipulação das propriedades mecânicas do PLGA surgiu a blenda entre este e o cis-1,4-Poliisopreno. Um estudo sobre a blenda de PLLA e PI sintético foi apresentado previamente, tentando, sem sucesso, a compatibilização química dos polímeros pela inserção de monômeros de acetato de vinila na cadeia do PI (JIN et al., 2000). Mesmo com a imiscibilidade do material já documentada, e uma vez que o objetivo da blenda PLGA/PI é reduzir o comportamento frágil do PLGA, cabem hipóteses ditando que *in vivo* o PLGA sofra bioreabsorção e o PI permaneça inerte no organismo, com um possível efeito neovascularizador gerado *in situ* (SAMPAIO, 2007). A blenda foi registrada como Cellprene® e teve patente solicitada em 2011 (MARQUES et al., 2011; UFRGS, 2013) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A blenda de Poli (ácido láctico-co-glicólico) e Poliisopreno foi obtida pela solubilização dos polímeros em solvente orgânico com posterior

volatilização do solvente. Foi constatado que o uso de clorofórmio como solvente não gerou efeito sobre a cadeia dos polímeros. Análises térmicas confirmaram a imiscibilidade entre PLGA e PI, mesmo após a variação de proporções dos polímeros na blenda. A blenda apresentou propriedades mecânicas muito abaixo das apresentadas pelo PLGA puro. No entanto houve a alteração do comportamento de frágil para dúctil, sendo que as blends apresentaram uma transformação plástica expressiva. Quanto ao comportamento em ambiente celular, a blenda mostrou-se não citotóxica para ensaios conduzidos com hepatocarcinomas da linhagem HepG2 (MARQUES, 2011).

Os primeiros estudos *in vivo* do Cellprene[®] foram voltados para o tratamento de estenose traqueal. A aplicação de um *stent* polimérico como suporte tecidual tem como objetivo principal evitar o fechamento de uma estrutura tubular e consequente obstrução de seu lúmen, seja esta estrutura um vaso sanguíneo, uretra, traqueia e brônquios, além de outros sistemas (TSUTSUI et al., 2008; WOOD et al., 2003). Para aplicação efetiva em sistema respiratório, o *stent* é considerado um tratamento conveniente para pacientes com estenose benigna, doença obstrutiva pulmonária crônica, doença cardíaca, diabetes e outras doenças sistêmicas, oferecendo alívio imediato nos sintomas de insuficiência respiratória (DUMON, 1990; THISTLETHWAITE et al., 2008; XAVIER et al., 2008). Um *stent* em espiral, como mostra a Fig.3(a), foi então conformado por processo de injeção e submetido a esterilização previamente ao implante em coelho da raça Nova Zelândia. Em posição de decúbito dorsal, foi submetido a uma incisão cervical mediana longitudinal com abordagem da traqueia cervical e a uma abertura de quatro anéis traqueais (Fig.3(b)). Posteriormente foi implantado o *stent* (Fig.3(c)), sendo que este não foi fixado com fio. A traqueotomia foi suturada com fio monofilamentar absorvível (Fig.3(d)). Foi observada a reação do animal no período pós-operatório de 21 dias (MARQUES et al., 2013).

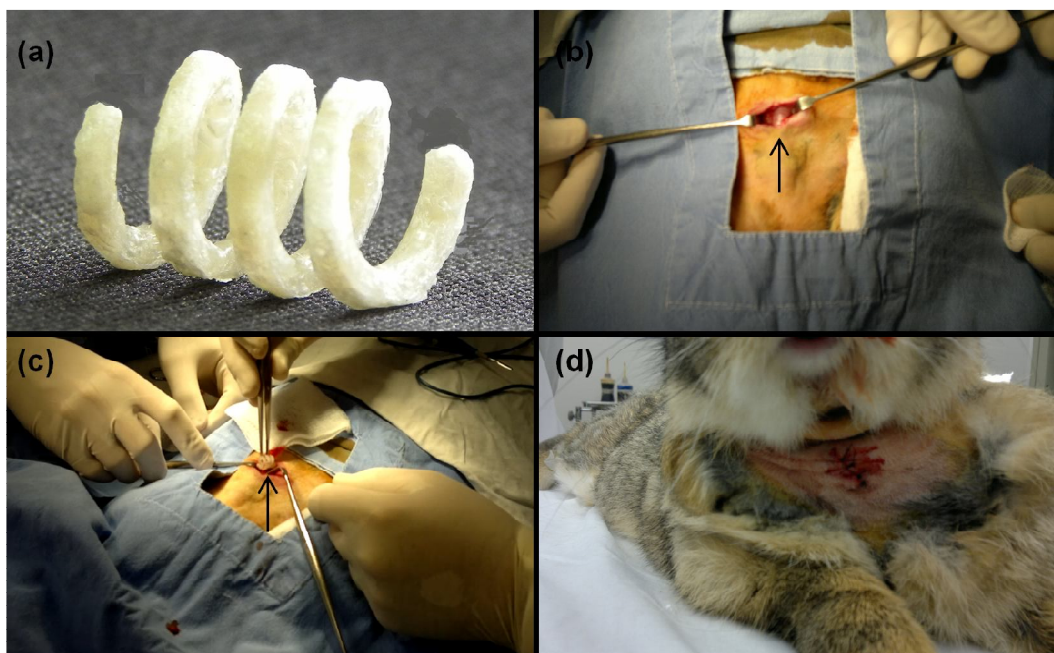


Figura 3: Traqueotomia: (a) stent em espiral Øext 9,1mm #1mm; (b) incisão longitudinal e exposição da traquéia (seta); (c) posicionamento do stent (seta) no interior da traqueia; (d) sutura externa.

Durante o período pós-operatório, os animais mostraram estridor, mesmo mantendo a saturação respiratória. Por procedimento de broncoscopia, após três semanas, foi possível averiguar que o *stent* manteve posição sem formação de granulomas, processo de infecção, obstrução respiratória ou enfisema. Houve no entanto a formação discreta de fibrose na extremidade proximal do *stent* devido a geometria de cantos agudos no fim do espiral (MARQUES et al., 2013).

O Cellprene[®] também foi avaliado em ambiente ósseo, em estudos visando o tratamento de craniosinostose. Esta doença que afeta um a cada 2500 crianças no mundo consiste do fechamento prematuro das suturas craniais, inibindo o crescimento lateral dos ossos do crânio, promovendo um crescimento compensatório nas suturas não afetadas, geralmente gerando

uma deformação da face (DI ROCCO et al., 2009; KOLAR, 2011). Atualmente os principais tratamentos consistem da osteotomia dessas suturas e posterior uso de terapias de expansão intracranial, separando os ossos pelo uso de molas metálicas (GUIMARÃES-FERREIRA et al., 2002; PEARSON et

al., 2008). A ideia de substituição destas molas metálicas por espaçadores de biopolímeros tem por principal objetivo reduzir os efeitos de um metal que geralmente é apenas tolerado pelo organismo, evitando também a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para retirada de tal dispositivo (DORNELLES et al., 2010).

A avaliação da blenda PLGA/PI foi realizada então em duas etapas distintas: análise da resposta do material e análise da resposta do espaçador. Num primeiro momento, fragmentos de PLGA puro e da blenda foram implantados, por processo de craniotomia, na calota cranial de ratos Wistar de linhagem albina e procedida análise de resposta histológica em períodos de 15, 30, 60 e 90 dias pós-cirúrgico. Na Fig. 4 é possível observar o posicionamento de implante do fragmento polimérico (a) e posição da sutura (b). Nos períodos de 15, 30 e 90 dias, não houve diferença significativa na resposta histológica dos dois materiais. é possível observar uma boa integração entre a blenda PLGA/PI e os tecidos formadores da calota cranial (Fig. 4(c)) após 60 dias do implante. É reportada também a ocorrência de áreas de intensa neovascularização (Fig. 4 (d)) nas áreas de tecido adjacente à blenda, o que leva a crer que o Cellprene[®] é viável para o estudo em aplicações na região cranial e/ou em ambiente ósseo (KIM, 2012).

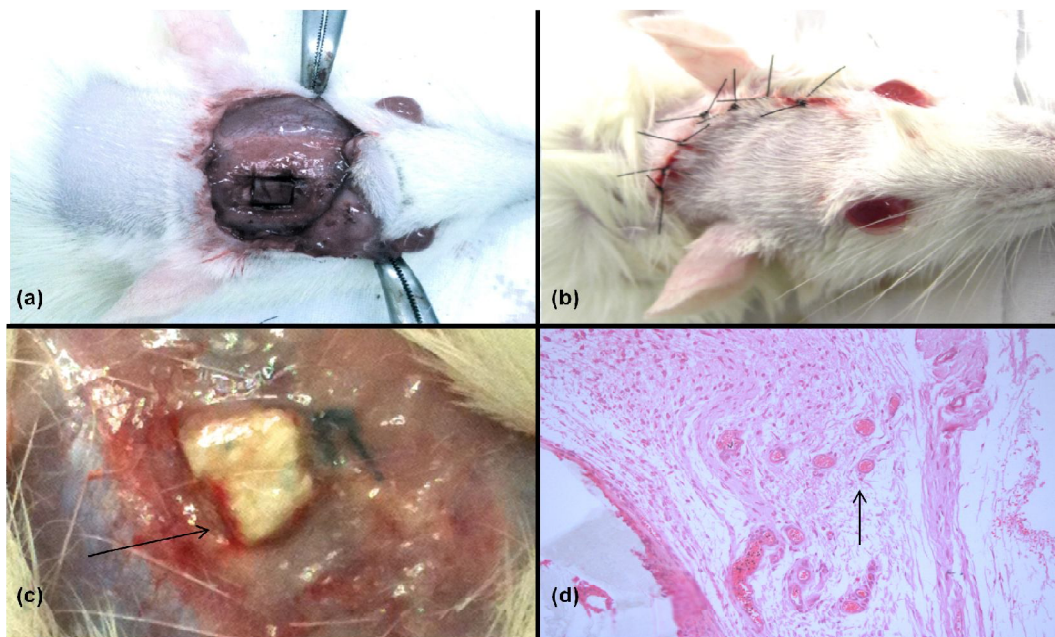


Figura 4: Craniotomia (a) local do posicionamento da blenda; (b) sutura externa; (c) blenda in situ aos 60 dias de pós-operatório; (d) imagem de análise histológica apresentando Intensa neovascularização nos tecidos circunjacentes à blenda.

Num segundo momento, espaçadores craniais foram confeccionados pro moldagem de injeção em formato de placa e posteriormente conformados por banho em água destilada a 70°C e aproximação das extremidades da placa, atingindo um produto final em formato U com tensões armazenadas na zona de dobra. Visando analisar a efetividade deste dispositivo como espaçador intracranial, tais espaçadores foram esterilizados e implantados em crânios de coelho da raça Nova Zelândia. Divididos em dois grupos, todos os coelhos foram submetidos a craniotomia linear, sendo que em um grupo foi implantado o espaçador a partir de PLGA/PI, e outro grupo foi suturado sem o espaçador, para servir de controle da movimentação natural da placa craniana. Com medições radiológicas efetuadas nas doze semanas subsequentes foi possível observar uma efetiva expansão craniana nos grupos tratados com o espaçador, um distanciamento intracranial significativamente maior que o apresentado no grupo controle. Análises histológicas apresentaram uma boa tolerabilidade dos tecidos circunjacentes ao implante, com evidente neovascularização nestas regiões e sem sinais de reação inflamatória (FALLER, 2012).

A partir dos resultados positivos apresentados em outras aplicações clínicas, surge a possibilidade de aplicação do Cellprene® em engenharia de tecidos, aprofundando os conhecimentos em torno do material e explorando novas técnicas de processamento, buscando atender as exigências fundamentais desta aplicação. Suas propriedades mecânicas sugerem que aplicações em tecidos moles como músculo, cartilagem e epitélio são mais condizentes com as características que o material pode oferecer para estudos *in vitro*.

Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo principal a obtenção de fibras de blenda polimérica a partir de Poli (Ácido Lático-co-Glicólico) e Poliisopreno (Cellprene[®]) e sua subsequente avaliação como *scaffolds* em engenharia de tecidos.

Materiais e Métodos

3.1. Processo de Obtenção de Materiais

O fluxograma da Fig. 5 apresenta as metodologias experimentais procedidas nesta pesquisa.

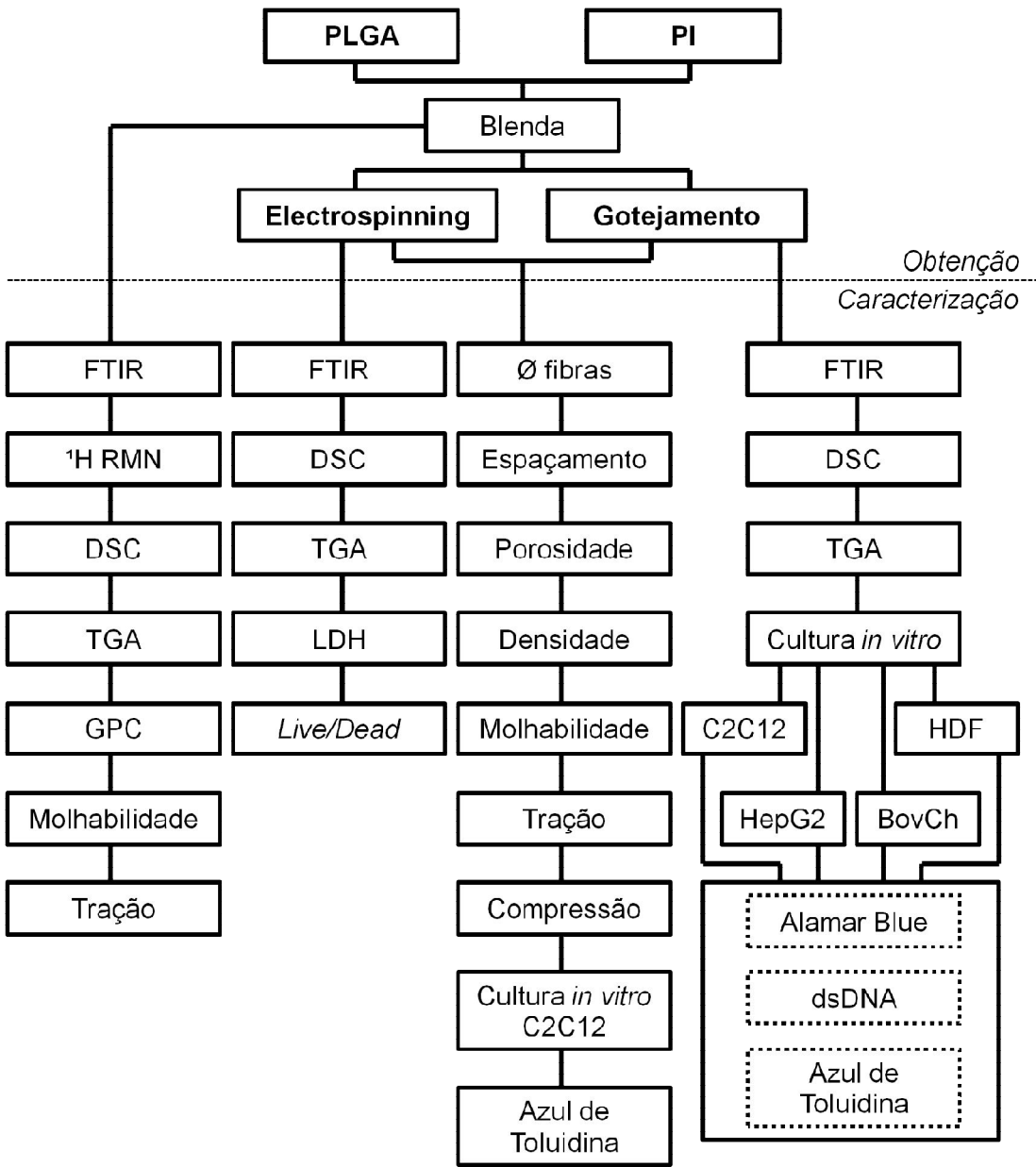


Figura 5: Fluxograma experimental.

3.1.1. Blenda Polimérica

Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) (Purac Biomaterials) é um copolímero apresentando 84 mol% de comonômero L-lactide e 16 mol% de comonômero glicolide. Com pH 7,2, o material foi utilizado como recebido, sem necessidade de purificação. O Poliisopreno (Mafer) foi neutralizado com Ácido Clorídrico 2M (Synth) a um intervalo de pH 7,2-7,8. Tal polímero foi então submetido a secagem completa em estufa a 40°C por 24h. Foi aplicado processo de purificação por reprecipitação, usando clorofórmio (CHCl₃) como solvente, com solução precipitada em metanol (CH₃OH) (TSUNEIZUMI et al., 2010). Clorofórmio (99,8%) (Synth) e metanol (99,8%) (Synth) foram utilizados como obtidos. Após precipitação, Poliisopreno foi submetido a secagem completa em estufa a 40°C por 24h.

PLGA e PI secos foram dissolvidos em clorofórmio e, uma vez homogeneizados, a blenda foi conduzida à estufa 40°C por 24h para volatilização do solvente. A blenda foi preparada com uma proporção mássica de 60% PLGA / 40% PI, e armazenada a 4°C para procedimentos posteriores.

3.1.2. Fibras Poliméricas - Gotejamento

O método de gotejamento (DOS SANTOS et al., 2011) consiste em expor a blenda diluída num recipiente com etanol, sob agitação rotacional, precipitando assim fibras poliméricas. A blenda PLGA/PI foi diluída em clorofórmio, concentração 1%, e exposta a 500ml de etanol (99.8%) (CH₃CH₂OH) (Synth) em rotação mecânica, com uma taxa de gotejamento de 400ml/h, a 25°C. Após o processo de gotejamento, as fibras formadas foram secas em liofilizador (Terroni Enterprise II) por 24h, sob ambiente de vácuo a -40°C. As fibras secas foram armazenadas à temperatura ambiente. As fibras obtidas por gotejamento serão referenciadas neste trabalho como FD.

Dois tipos de amostras foram preparadas a partir destas fibras. Amostras tridimensionais, também referidas como *scaffold* ou arcabouço, foram preparadas por moldagem de FD (peso: 1g) à temperatura ambiente em formato cilíndrico Ø12mm e altura de 5mm. Amostras bidimensionais ou laminares foram obtidas pelo fatiamento de amostras tridimensionais a 5µm de espessura e deposição das fatias individualmente sobre discos de vidro. As

amostras FD tridimensionais e bidimensionais podem ser observadas na fig. 6(a) e fig. 6(b), respectivamente.

3.1.3. Fibras Poliméricas - *Electrospinning*

O método *electrospinning* uma diferença de potencial a fim de formar fibras finas. A blenda PLGA/PI foi dissolvida em clorofórmio, concentração 3%, e induzida a um coletor metálico cilíndrico em rotação axial 500rpm, vazão 30ml/h, com uma diferença de potencial de 13KV entre o capilar de saída do material e o coletor. Fibras foram removidas do coletor e armazenadas em temperatura ambiente, mantendo a orientação das fibras obtidas. As fibras obtidas por *electrospinning* serão referenciadas neste trabalho como FS

Dois tipos de amostras foram preparadas a partir destas fibras. Amostras tridimensionais, também referidas como *scaffold* ou arcabouço, foram preparadas por enrolamento à temperatura ambiente de FS (peso: 1g) em formato cilíndrico Ø8mm e altura de 5mm. Houve a preocupação de manter a orientação das fibras, do topo para a base da amostra. Amostras bidimensionais ou laminares foram obtidas pelo corte das fibras após remoção do coletor e deposição das fatias individualmente sobre discos de vidro. As amostras FS tridimensionais e bidimensionais podem ser observadas na fig. 6(c) e fig. 6(d), respectivamente.

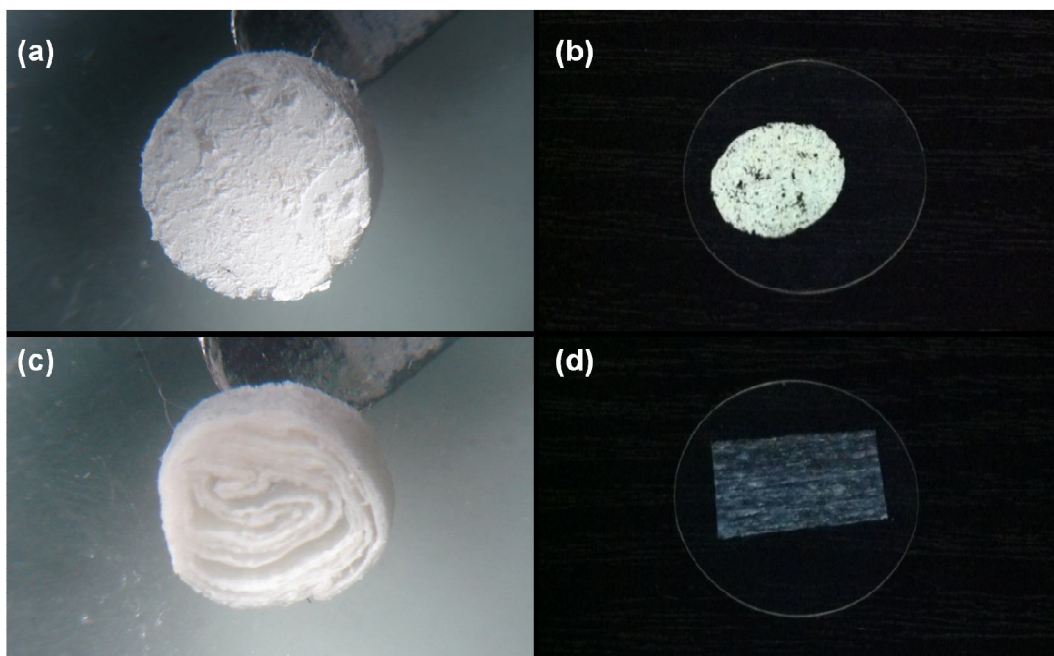


Figura 6: Amostras (a) FD tridimensional - vista de topo, (b) FD bidimensional, (c) FS tridimensional - vista de topo, e (d) FS bidimensional.

3.2. Caracterização - Blenda Polimérica

3.2.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi aplicada usando um espectrômetro Perkin Elmer Spectrum 1000, em temperatura ambiente, com espectro na região $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$, para amostras PLGA puro, PI puro, blenda PLGA/PI após volatilização do solvente, e fibras FD e FS. Espectros foram gerados usando *software* Origin Pro 8. Como base de parâmetros para procedimento, os ensaios obedeceram às regras descritas na norma ASTM D2702-05.

3.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (^1H NMR) foi aplicada usando equipamento Varian Inova 300, com um pulso de $6,5\mu\text{seg}$, $3,97\text{seg}$ de tempo de aquisição, 1seg de tempo de relaxação, e uma largura de espectro de 8250.8Hz . Espectro foi obtido para blenda PLGA/PI, diluída em clorofórmio deuterado (CDCl_3) (Merck). Espectro foi gerado usando *software*

Origin Pro 8. Como base de parâmetros para procedimento, os ensaios obedeceram às regras descritas na norma ASTM F2259-10.

3.2.3. Calorimetria Exploratória Diferencial

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi aplicada usando um calorímetro TA Instruments Q20, em atmosfera inerte, taxa de aquecimento de 10°C/min, com primeiro ciclo de aquecimento entre 25°C-190°C, seguido de resfriamento e segundo ciclo de aquecimento entre -80°C-190°C. A análise foi aplicada a amostras de PLGA puro, PI puro, blenda PLGA/PI após volatilização do solvente, e fibras FD e FS. Termogramas foram gerados usando *software* Origin Pro 8. Como base de parâmetros para procedimento, os ensaios obedeceram às regras descritas na norma ASTM D3418-03.

3.2.4. Análise Termogravimétrica

Análise Termogravimétrica (TGA) foi aplicada usando equipamento Seiko TG/DTA 220 Thermal System, com uma taxa de aquecimento de 10°C/min, entre 40-380°C. A análise foi aplicada a amostras de PLGA puro, PI puro, blenda PLGA/PI após volatilização e fibras FD e FS. Termogramas foram gerados usando *software* Origin Pro 8. Como base de parâmetros para procedimento, os ensaios obedeceram às regras descritas na norma ASTM D3850-12.

3.2.5. Cromatografia de Permeação em Gel

Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) foi aplicada usando um cromatógrafo Viscotek TDAmx, equipado com quatro colunas, as quais foram mantidas a 45°C. Os polímeros analisados foram dissolvidos em tetraidrofurano ((CH₂)₄O) (Synth) e injetados a uma taxa de 1ml/min. Foram obtidos cromatogramas das amostras de PLGA puro, PI puro, blenda PLGA/PI após volatilização. Tais cromatogramas foram gerados usando *software* Origin Pro 8. Como base de parâmetros para procedimento, os ensaios obedeceram às regras descritas na norma ASTM D5296-97.

3.2.6. Molhabilidade

Ensaio de molhabilidade foi aplicado a amostras de PLGA puro, PI puro, e blenda PLGA/PI após volatilização, e fibras FD e FS. Sobre a superfície plana dos materiais secos foi posicionada uma gota 10 µl de água deionizada. O ângulo de contato entre a fase sólida - polímero - e a fase líquida - água - foi medido por *software* Surftens Measure, usando imagens capturadas por Digital Microscope Suite 2.0. Para cada material, foram feitas 25 medições.

3.2.7. Ensaio de Tração

Para caracterização mecânica do material foi aplicado ensaio de tração. Os corpos de prova foram preparados por injeção em injetora Haake Minijet II Thermo Scientific, a uma temperatura de processamento de 165°C. O ensaio foi aplicado a amostras de PLGA puro, PI puro, e blenda PLGA/PI após volatilização, o corpo de prova com empescoamento na área de tração, medindo em largura 4mm, comprimento 30mm, espessura 2mm. Foi utilizada célula de carga 50KN e taxa de deslocamento 2mm/min. Curvas relacionando tensão e deformação foram geradas em *software* Origin Pro 8. Como base de parâmetros para procedimento, os ensaios obedeceram às regras descritas na norma ISO 527-1.

3.3. Caracterização - Fibras Poliméricas

3.3.1. Diâmetro de Fibras

Para caracterização do diâmetro médio das fibras e do tamanho de poros, amostras tridimensionais FD e FS foram analisadas em microscópio óptico Carl Zeiss equipado com câmera Axio Cam ERc5s. As imagens foram tratadas e as fibras medidas com o uso de *software* Axio Vision 4.8. O tamanho de poros foi medido considerando o espaçamento entre fibras, com medição no mesmo sentido, em pontos aleatórios da microscopia. A fim de alcançar uma média significativa de cada parâmetro, 30 medições foram feitas em pontos aleatórios de cada amostra, tanto para diâmetro de fibra, como para tamanho de poros.

3.3.2. Porosidade e Densidade

As amostras tridimensionais de FD e FS foram submetidas a análise de porosidade e densidade. A técnica utilizada foi previamente descrita para aplicação em *scaffolds* porosos por Zhang & Ma (1998). O arcabouço de massa W foi imerso em um cilindro graduado contendo um volume conhecido (V_1) de etanol. Foi mantido por 5 minutos e pressurização a vácuo e aplicada a partir daí, a fim de que o etanol ocupasse todos os espaços internos do arcabouço, até que mais nenhuma bolha fosse observada saindo do arcabouço. O volume total de etanol e o arcabouço impregnado com etanol é denominado volume V_2 . A diferença de volume ($V_2 - V_1$) é o volume do arcabouço. O arcabouço impregnado de etanol foi removido do cilindro, e o volume restante denominado V_3 . A quantidade ($V_1 - V_3$) – volume de etanol dentro do arcabouço – determinado como o volume disponível no *scaffold* para crescimento celular. Portanto, o volume total do arcabouço é:

$$V = (V_2 - V_1) + (V_1 - V_3) \quad (eq. 1)$$

A densidade (δ) do arcabouço foi determinada como:

$$\delta = \frac{W}{(V_2 - V_3)} \quad (eq. 2)$$

A porosidade (Σ) foi calculada por:

$$\Sigma = \frac{(V_1 - V_3)}{(V_2 - V_3)} \quad (eq. 3)$$

Para averiguar reprodutibilidade, o ensaio foi aplicado em um grupo de cinco amostras para cada tipo de *scaffold*.

3.3.3. Ensaio de Compressão - *Scaffolds*

A fim de investigar as propriedades mecânicas dos *scaffolds*, ambas amostras tridimensionais FD e FS foram submetidas a ensaio de compressão em equipamento universal de ensaios da marca Instron modelo 3369, com célula de carga 2KN e taxa de compressão de 0,5mm/min. Curvas relacionando tensão e deformação foram geradas em *software* Origin Pro 8.

Para averiguar reprodutibilidade, o ensaio foi aplicado em um grupo de cinco amostras para cada tipo de *scaffold*.

3.3.4. Ensaio de Tração - *Scaffolds*

O ensaio de tração também foi aplicado ao feixe de ambas as fibras a fim de verificar o comportamento destas enquanto *scaffold*. As amostras FD foram preparadas na mesma proporção volumétrica das amostras tridimensionais, no formato de corpo de prova com empescoçamento na área de tração, medindo em largura 4mm, comprimento 30mm, espessura 2mm. As amostras FS foram recortadas no formato do corpo de prova quando retiradas do coletor, mantendo uma orientação das fibras da base para o topo, no sentido da tensão aplicada no ensaio. Para estas amostras o corpo de prova apresentou empescoçamento na área de tração medindo em largura 4mm, comprimento 30mm, e espessura individualmente medida em cada feixe previamente à tração. O ensaio foi procedido em equipamento universal de ensaios da marca Instron modelo 3369, com célula de carga 2KN e taxa de deslocamento de 0,1mm/min. Curvas relacionando tensão e deformação foram geradas em *software* Origin Pro 8. Para averiguar reprodutibilidade, o ensaio foi aplicado em um grupo de cinco amostras para cada tipo de *scaffold*. Como base de parâmetros para procedimento, os ensaios obedeceram às regras descritas na norma ISO 527-1.

3.4. Caracterização *in vitro*

3.4.1. Subcultura e Manutenção de Células Mamárias

A caracterização da blenda polimérica *in vitro* foi investigada usando quatro linhagens celulares distintas: Fibroblastos Dérmicos Humanos (HDF); Mioblastos (C2C12); Condrócitos (BovCh); e Hepatócitos (HepG2). Todas as linhagens foram adquiridas junto à Coleção Européia de Culturas Celulares (Health Protection Agency - United Kingdom). Os procedimentos *in vitro* foram desenvolvidos pelo próprio pesquisador durante programa de Doutorado Sanduíche - CNPq, na Universidade de Manchester, Manchester, Reino Unido.

Fibroblastos Dérmicos (fonte de linhagem mamífera: humanos) foram cultivados com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Sigma) contendo 2mM L-Glutamina (Glutamax), 10% de soro bovino fetal (FBS) e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). Mantidas em frascos de cultura 25cm², em estufa a 37°C, 95% de umidade e CO₂ a 5%, as células tiveram o meio de cultura trocado a cada 2-3 dias e foram subcultivadas a cada 7 dias, quando atingiam confluência de 80-90%. Para subcultivo, o meio de cultura foi removido, e a película de células no fundo do frasco lavada com tampão fosfato-salino (PBS) duas vezes. As células foram então removidas do fundo do frasco por exposição a 1ml tripsina a 37°C por 3 minutos. Foi então adicionado 9ml de novo meio de cultura e as células em suspensão transferidas a um tubo de centrifuga. As células foram precipitadas por centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, previamente ao processo de resuspensão. Neste ponto dois novos frascos de cultura 25cm² receberam meio de cultura e 10-15% das células resuspensas. Fibroblastos não foram utilizados além da 20ª passagem.

Mioblastos (fonte de linhagem mamífera: ratos) foram cultivados com meio de cultura DMEM contendo 2mM L-Glutamina, 10% de FBS e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina). Mantidas em frascos de cultura 25cm², em estufa a 37°C, 95% de umidade e CO₂ a 5%, as células foram subcultivadas a cada 2-3 dias, quando atingiam confluência de 80-90%. Para subcultivo, o meio de cultura foi removido, e a película de células no fundo do frasco lavada com PBS duas vezes. As células foram então removidas do fundo do frasco por exposição a 1ml tripsina a 37°C por 3 minutos. Foi então adicionado 9ml de novo meio de cultura e as células em suspensão transferidas a um tubo de centrifuga. As células foram precipitadas por centrifugação por 5 minutos a 1500rpm, previamente ao processo de resuspensão. Neste ponto dois novos frascos de cultura 25cm² receberam meio de cultura e 10-15% das células resuspensas. Mioblastos não foram utilizados além da 30ª passagem.

Condrócitos (fonte de linhagem mamífera: bovinos) foram cultivados com meio de cultura DMEM contendo 2mM L-Glutamina, 10% de FBS, 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), 4,5% de glicose, e 50mg/L ácido ascórbico-2-fosfato (Sigma). Mantidas em frascos de cultura 25cm², em estufa

a 37°C, 95% de umidade e CO₂ a 5%, as células foram subcultivadas a cada 2-3 dias, quando atingiam confluência de 80-90%. Para subcultivo, o meio de cultura foi removido, e a película de células no fundo do frasco lavada com PBS duas vezes. As células foram então removidas do fundo do frasco por exposição a 1ml tripsina a 37°C por 1 minutos. Foi então adicionado 9ml de novo meio de cultura e as células em suspensão transferidas a um tubo de centrifuga. As células foram precipitadas por centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, previamente ao processo de resuspensão. Neste ponto dois novos frascos de cultura 25cm² receberam meio de cultura e 10-15% das células resuspensas. Condócitos não foram utilizados além da 20ª passagem.

Hepatócitos (fonte de linhagem mamífera: humanos) foram cultivados com meio de cultura MEME (Minimun Essential Medium Eagle - Sigma) contendo 2mM L-Glutamina, 10% de FBS, 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina), e 1% solução MEM de aminoácidos não essenciais (Sigma). Mantidas em frascos de cultura 25cm², em estufa a 37°C, 95% de umidade e CO₂ a 5%, as células tiveram o meio de cultura trocado a cada 2-3 dias e foram subcultivadas a cada 7 dias, quando atingiam confluência de 70-80%. Para subcultivo, o meio de cultura foi removido, e a película de células no fundo do frasco lavada com PBS duas vezes. As células foram então removidas do fundo do frasco por exposição a 1ml tripsina a 37°C por 5 minutos. Foi então adicionado 9ml de novo meio de cultura e as células em suspensão transferidas a um tubo de centrifuga. As células foram precipitadas por centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, previamente ao processo de resuspensão. Neste ponto dois novos frascos de cultura 25cm² receberam meio de cultura e 15-30% das células resuspensas. Hepatócitos não foram utilizados além da 20ª passagem.

3.4.2. Cultura Celular

Para culturas celulares, as amostras foram esterilizadas por luz UV por 30 minutos e mantidas em cabine de fluxo circular a fim de evitar contaminação externa no período entre esterilização e cultivo. A esterilização procedeu-se com as amostras alocadas em placa de cultura de 12 poços aberto para evitar manuseios desnecessários da amostra até o período específico de

caracterização pós-cultura. As placas foram cultivadas e mantidas sob condições padrões em estufa a 37°C, 95% de umidade e CO₂ a 5%, durante todo o período experimental. As caracterizações *in vitro* foram aplicadas às amostras laminares bidimensionais FD e FS, bem como a discos de vidro isentos de polímeros, usados como grupo controle (CT).

Para cultivo, as células tiveram o meio de cultura removido, e a película de células no fundo do frasco de cultura lavada com PBS duas vezes. As células foram então removidas do fundo do frasco por exposição a 1ml tripsina a 37°C por 3-5 minutos. Foi então adicionado 9ml de novo meio de cultura e as células em suspensão transferidas a um tubo de centrifuga. As células foram precipitadas por centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, previamente ao processo de resuspensão. Seguida contagem da concentração de células em suspensão por uso de Câmara de Neubauer, as células eram transferidas para os poços de cultura através do uso de micropipetador. O volume nos poços era completado a 1,5ml com o meio de cultura correspondente à célula cultivada. A concentração de 50000 (5×10^4 células/poço) foi administrada para as quatro linhagens celulares estudadas.

Houve manutenção das placas cultivadas a cada 2 dias, com retirada do meio de cultura antigo, lavagem individual dos poços com PBS uma vez, e adição de 1,5ml de novo meio de cultura. Tal procedimento de manutenção foi realizado com o uso de um micropipetador com pontas descartáveis, para evitar contaminação entre poços.

3.4.3. Azul de Toluidina

Para observação da população celular sobre as amostras laminares FD, FS e grupo controle, foi precedida coloração com azul de toluidina. Para tanto, as células foram previamente fixadas à amostra nos devidos períodos de observação. As amostras foram transferidas para nova placa de cultura de 12 poços e lavadas com PBS duas vezes para eliminar totalmente o meio de cultura. Foi então adicionada sobre a amostra 300µL de solução de PBS aditivada com 4% (proporção volumétrica) de p-formaldeído (Sigma). Após período de 15 minutos, a solução foi retirada e as amostras novamente lavadas com PBS. Cada amostra foi então exposta a uma solução de 1% de azul de

toluidina (Sigma) por 1 minuto, ao fim do qual a solução era retirada em água corrente. As amostras foram observadas em microscópio óptico Leica DMRB, aumento de 10X.

Esta observação foi realizada após 1, 3, 7 e 14 dias de cultivo. Para amostras FD e grupo controle, este ensaio foi aplicado para as linhagens celulares HDF, C2C12, BovCh e HepG2. Para amostras FS, apenas a linhagem C2C12 foi observada, por motivos expostos futuramente no decorrer deste trabalho. Todas as observações foram realizadas em triplicata para garantir reprodutibilidade dos resultados.

3.4.4. Alamar Blue

A coloração por Alamar Blue foi aplicada para analisar a proliferação e atividade metabólica das células após determinados períodos de cultura. Para tanto o método consiste da leitura por fluorescência do meio de cultura celular aditivado com uma solução de Alamar Blue (89%PBS e 11% Resazurina (Sigma)). A leitura de fluorescência permite a obtenção de um valor estimado do número total de células vivas presente na amostra. Esta observação foi realizada após 1, 3, 7 e 14 dias de cultivo, para amostras FD e grupo controle, observando as linhagens celulares HDF, C2C12, BovCh e HepG2. Todas as observações foram realizadas em triplicata para garantir reprodutibilidade dos resultados.

No determinado período de observação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado do poço e substituído com 1ml de novo meio de cultura. Foi então adicionado 100µL de Alamar Blue e a placa levada à estufa a 37°C, 95% de umidade e CO₂ a 5%, por 2 horas. Após este período, 200µL da solução (meio de cultura + Alamar Blue) foram transferidos em triplicata para uma placa de leitura de 96 poços (Nunc), com ajuda de um micropipetador com pontas descartáveis, a fim de evitar contaminação entre amostras. A placa de 96 poços foi então posicionada em um espectrofluorômetro Fluostar Optima, sendo que a fluorescência foi medida a um comprimento de onda de 510nm-530nm para excitação e 590nm para emissão.

Para transformar os valores obtidos na fluorescência para número de células, uma equação foi gerada. Em uma placa de cultura de 6 poços foram

semeadas zero, 1000 (1×10^3), 5000 (5×10^3), 10000 (1×10^4), 50000 (5×10^4), e 100000 (1×10^5) células, cada quantidade correspondendo a um poço. Com volume completo por meio de cultura a 1ml, foi adicionado 100 μ L de Alamar Blue e a placa levada à estufa a 37°C, 95% de umidade e CO₂ a 5%, por 2 horas. Após este período, 200 μ L da solução (meio de cultura + Alamar Blue) foram transferidos em triplicata para uma placa de leitura de 96 poços, com ajuda de um micropipetador com pontas descartáveis, a fim de evitar contaminação entre amostras. A placa de 96 poços foi então posicionada em um espectrofluorômetro Fluostar Optima, sendo que a fluorescência foi medida a um comprimento de onda de 510nm-530nm para excitação e 590nm para emissão. Relacionando os valores previamente conhecidos do número de células semeadas em cada poço e a leitura de fluorescência obtida para tal, gerou-se um gráfico de pontos, uma linha de tendência linear e, por consequência, uma equação de reta. Esta equação foi então usada para converter os valores de fluorescência obtidos na caracterização para a relativa quantidade de células em cada poço. Cabe ressaltar que o procedimento acima descrito foi realizado para cada linhagem celular, sendo que cada tipo de célula tem sua equação de reta específica. . Para determinar a relevância da diferença entre valores obtidos, foi aplicada análise de variância - ANOVA com nível de confiabilidade de 97,5% ($\alpha=0,025$).

3.4.5. Quantificação de DNA de Cadeia Dupla

Reagente Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA é uma coloração para ácido nucleico ultra sensível à fluorescência usado para quantificação de DNA de cadeia dupla (dsDNA) em solução. Esta observação foi realizada após 1, 3, 7 e 14 dias de cultivo, para amostras FD e grupo controle, observando as linhagens celulares HDF, C2C12, BovCh e HepG2. Todas as observações foram realizadas em triplicata para garantir reprodutibilidade dos resultados.

No determinado período de observação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado do poço e as amostras foram lavadas com PBS duas vezes. As amostras foram então transferidas para uma nova placa de cultura para garantir que as leituras correspondam apenas às células depositadas sobre a amostra. Nos poços foi adicionada 1ml de solução tampão de lise

celular composta de água destilada, 2,5% solução tampão TE (Life Technologies), e 1% Triton-X100 (Sigma). Após 10 minutos de contato, a solução foi transferida para eppendorfs e estocada a -80°C por 48 horas. Após um ciclo repetido três vezes de descongelamento em banho de imersão 37°C , centrifugação a 12000rpm por 10 minutos e recongelamento a -80°C por 20 minutos, houve formação de precipitado nos eppendorfs. Tal precipitado foi transferido para uma placa de leitura de 96 poços e colorido com uma solução Pico Green composta de água destilada, 5% solução tampão TE, e 0,5% Quant-iT PicoGreen dsDNA, cobrindo a placa com papel alumínio, visto que a coloração é fotossensível. Após incubamento por 5 minutos a 37°C , a placa foi levada para leitura em espectrofotômetro Fluostar Optima, sendo que a fluorescência foi medida a um comprimento de onda de 485nm para excitação e 520nm para emissão.

Para transformar o valores obtidos na fluorescência para quantificação de DNA-dS ($\mu\text{g/ml}$) em cada amostra, uma equação foi gerada. Em placa de leitura 96 poços foram preparadas amostras de DNA em cinco variações distintas, usando o DNA padrão do fabricante, seguido de coloração com solução Pico Green. Após incubamento por 5 minutos a 37°C , a placa foi levada para leitura em espectrofotômetro Fluostar Optima, sendo que a fluorescência foi medida a um comprimento de onda de 485nm para excitação e 520nm para emissão. Relacionando os valores previamente conhecidos da quantidade de DNA concentrada em cada poço e a leitura de fluorescência obtida para tal, gerou-se um gráfico de pontos, uma linha de tendência linear e, por consequência, uma equação de reta. Esta equação foi então usada para converter os valores de fluorescência obtidos na caracterização para a relativa quantidade de DNA em cada poço. Cabe ressaltar que o procedimento acima descrito foi realizado apenas uma vez e aplicado para todas as linhagens celulares, visto que a equação da reta é gerada sobre a sensibilidade da coloração de DNA, e não sobre a peculiaridade de cada linhagem. Para determinar a relevância da diferença entre valores obtidos, foi aplicada análise de variância - ANOVA com nível de confiabilidade de 97,5% ($\alpha=0,025$).

3.4.6. Quantificação de Lactato Desidrogenase - LDH

Para averiguar possíveis efeitos contaminantes da fibra obtida por *electrospinning* sobre o meio de cultura a quantificação da enzima lactato desidrogenase foi realizada. A liberação desta enzima indica o nível de necrose celular em meio de cultura. Para tal, um meio de cultura especial foi preparado previamente à cultura de células da linhagem C2C12. A observação foi feita após 1 e 3 dias de cultivo.

Em placas de cultura 24 poços, foram dispostas amostras laminares FS e expostas por 24 horas a meio de cultura MC (DMEM, 2mM L-Glutamina, 10% de FBS e 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina)). A partir deste meio de cultura pós contato com FS (MC-FS) foram preparadas cinco composições de meio de cultura, nas proporções volumétricas expostas na Tabela 1.

Tabela 1: composições de meios de cultura.

Composição	MC-FS	MC
100	100%	0%
75/25	75%	25%
50/50	50%	50%
25/75	25%	75%
ZERO	0%	100%

Amostras do grupo controle (discos de vidro) foram semeadas com 150000 (15×10^4) células C2C12 por poço, alimentadas com as variações de composição do meio de cultura acima listados, sendo preparadas três amostras para cada composição. No determinado período de observação, 50µL do meio de cultura foram transferidos à placa de leitura 96 poços em triplicata, e adicionados 50µL de substrato reconstituído constante do kit de análise CytoTox 96 (Promega). Após 30 minutos a 25°C e protegido da luz, cada poço foi adicionado com solução Stop Solution (Promega) do mesmo kit de análise, e levado a espectrofluorômetro Fluostar Optima para medição a um comprimento de onda de 460nm para excitação e 520nm para emissão. A leitura da composição ZERO serviu como padrão de comportamento. A variação das leituras indicou uma maior ou menor presença da enzima lactato desidrogenase nas células presentes e eventual efeito das fibras FS sobre o meio de cultura. Para determinar a relevância da diferença entre valores

obtidos, foi aplicada análise variância - ANOVA com nível de confiabilidade de 97,5% ($\alpha=0,025$).

3.4.7. Ensaio *Live/Dead*

Nas mesmas condições e período do ensaio anterior, amostras foram submetidas a ensaio *Live/Dead* para observação visual de células vivas ou mortas em sua superfície. Foi utilizado o kit de viabilidade/citotoxicidade para células mámaria *Live/Dead* (Promokine). O ensaio *Live/Dead* foi utilizado para averiguar possíveis efeitos contaminantes da fibra obtida por *electrospinning* sobre o meio de cultura.

As amostras foram transferidas para nova placa de cultura e lavadas com a solução tampão do kit *Live/Dead*. As células sobre a amostra foram então expostas a uma solução preparada conforme indicação do fabricante, contendo corantes específicos (20% solução tampão, 6% EthIII, 6% Hoechst 33342). Após 15 minutos em incubadora 37°C, as amostras foram novamente lavadas com solução tampão, posicionadas em lâminas de microscopia e observadas em microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i. As imagens apresentam as células azuis como vivas e as células vermelhas como mortas.

Resultados e Discussão

4.1. Caracterização - Blenda Polimérica

4.1.1. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

A análise dos grupamentos químicos presentes em PLGA, PI, e sua blenda foi possível através da observação dos espectros gerados por FTIR, apresentados na fig. 7. Esta técnica permite identificar a ocorrência de reações entre os polímeros, bem como as possíveis interações ocasionadas pelo uso de solvente orgânico na obtenção da blenda (CIBULKOVÀ et al., 2006).

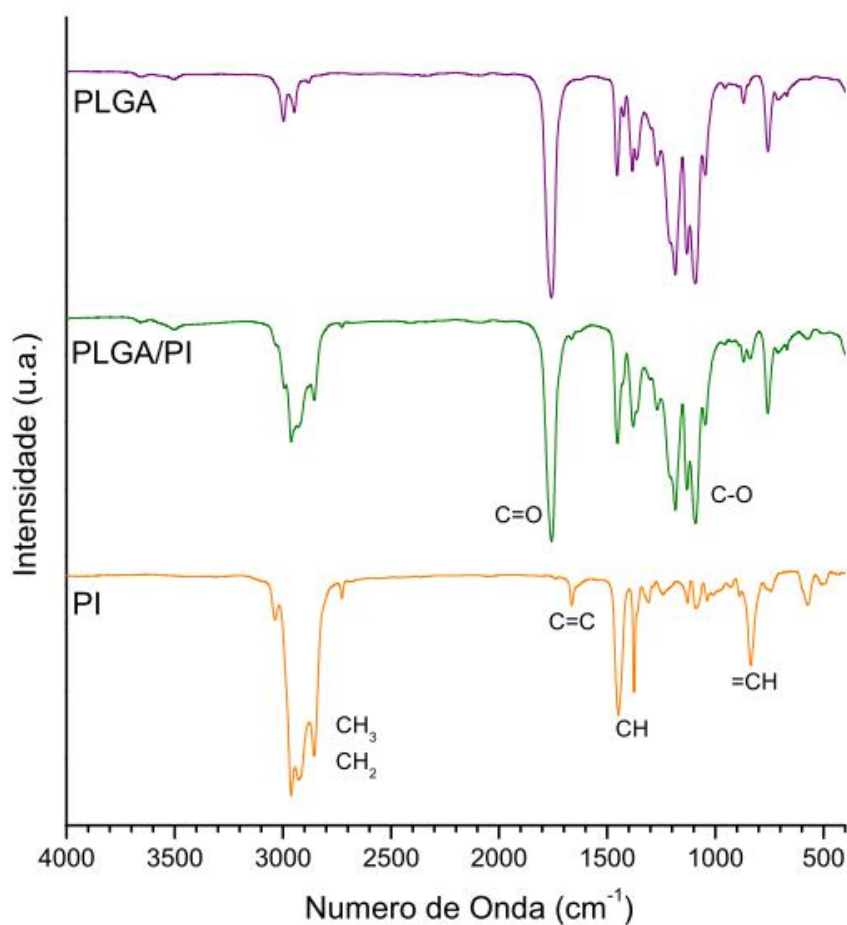


Figura 7: Espectro de infravermelho de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.

A partir das estruturas moleculares previamente conhecidas, espera-se observar bandas relativas aos grupamentos C=O e C-O, condizentes ao PLGA, e bandas relativas aos grupamentos CH₂, C=C e =CH, condizentes ao PI, além de vibrações nas regiões de CH₃, grupamento este presente em ambos polímeros.

As bandas características de estiramentos simétricos e assimétricos dos grupos CH₂ e CH₃ apresentam-se entre 2980-2850cm⁻¹ (MOTTA & DUEK, 2006; QUEIROZ, 2000). Estas bandas apresentam-se menos expressivas no espectro do PLGA do que no espectro do PI. A blenda, com uma quantidade reduzida de PI em sua composição, equivalente a aproximadamente 40% em massa, apresenta estas bandas com intensidade menor à apresentada no espectro do Poliisopreno (MARQUES et al., 2013).

A 1663cm⁻¹, uma banda aparece discreta no espectro de PI, referente ao alongamento da ligação C=C (KLÖPPFER, 1984). Tal banda aparece quase imperceptível no espectro da blenda, também relacionada com a redução da concentração de PI no composto. É observado também o estiramento =C-H a 836cm⁻¹, correspondendo a um dobramento fora do plano da ligação C-H (CIBULKOVÁ et al., 2006; QUEIROZ, 2000).

As bandas relativas aos grupamentos característicos do PLGA aparecem nos espectro deste e da blenda na mesma posição e com a mesma intensidade. O alongamento da ligação C=O se faz visível pela banda intensa e aguda a 1760cm⁻¹ (MOTTA & DUEK, 2006). Por sua vez, o estiramento de C-O característico de poliésteres alifáticos está indicado a 1185cm⁻¹ e a 1090cm⁻¹. Enquanto a banda em 1185cm⁻¹ refere-se ao estiramento C-C(=O)-O de ésteres saturados, a banda em 1090cm⁻¹ refere-se ao grupamento O-C-C (CHEN & QIAN, 2002; SILVERSTEIN et al., 2005). Como esperado, tais bandas estão ausentes no espectro de PI.

4.1.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Seguindo a análise da estrutura química do material, a blenda foi submetida a leitura por ressonância magnética nuclear protônica. Os

hidrogênios (H) presente nos grupos lactide, glicolide e isopreno foram caracterizados conforme exposto no espectro da fig. 8.

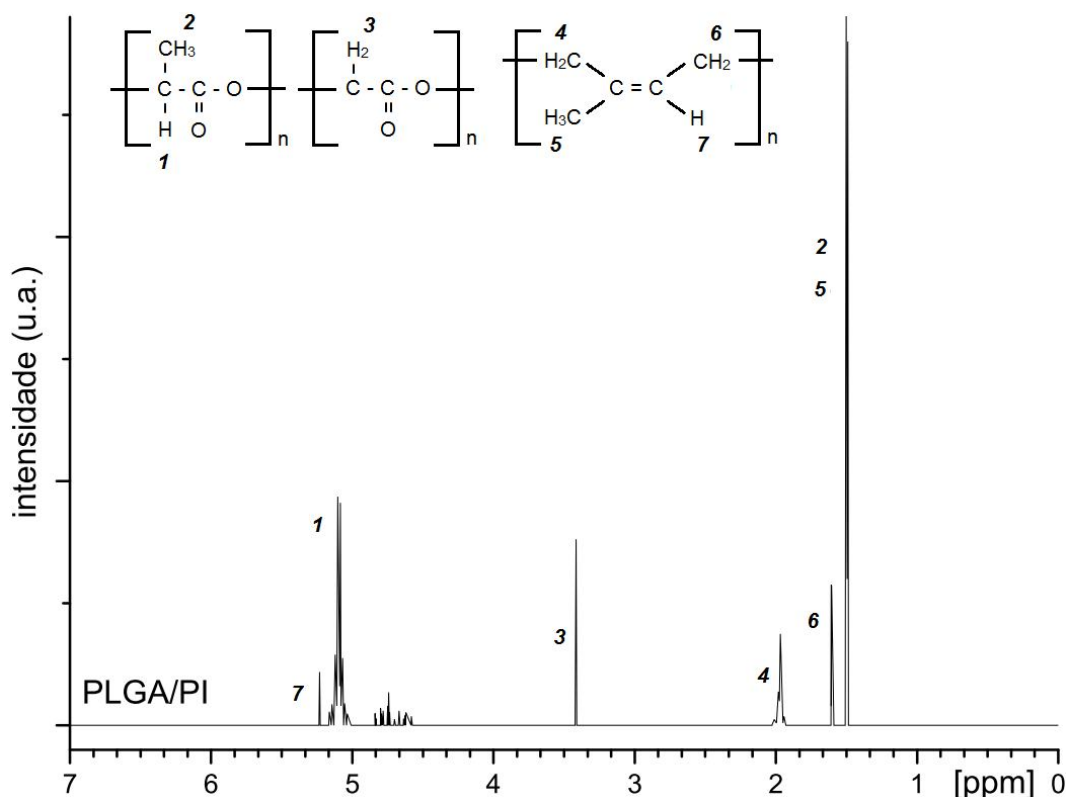


Figura 8: Espectro de RMN da blenda PLGA/PI.

Ligado a um carbono terciário no mero lactide, o H⁽¹⁾ mostra-se presente no quadrilete a 5,10ppm, enquanto os H⁽²⁾ do grupo metila substituinte identificam-se no sinal intenso a 1,49ppm (ASHJARI et al., 2012; JEONG et al, 2012; MOTTA & DUEK, 2006). Os H⁽³⁾ ligados a um carbono secundário no mero glicolide estão relacionados ao pico exibido em 3,41ppm. Um estudo envolvendo a copolimerização de Poli (Ácido Láctico) e Poli (Ácido Glicólico) indica inclusive uma variação da intensidade deste pico conforme a variação da composição do copolímero (PANDEY et al., 2008).

Os hidrogênios H⁽⁴⁾ e H⁽⁶⁾, da cadeia alifática do isopreno, apresentam sinal a 1,96ppm e 1,61ppm, respectivamente. Embora sejam ambos hidrogênios ditos alifáticos sofrendo possíveis efeitos de ressonância da ligação dupla, H⁽⁴⁾ sofre influência vicinal de um grupo metila, enquanto H⁽⁶⁾

está fadado à influência de um hidrogênio. Tal efeito explica o fato que hidrogênios tão similares apresentem sinais distintos no espectro. Já os $H^{(5)}$, ligados a um carbono primário, apresentam ressonância a 1,50ppm. Por estarem posicionados no mesmo sinal, é plausível acreditar que $H^{(5)}$ e $H^{(2)}$ ocasionem um efeito cumulativo sobre a intensidade do sinal. A 5,23ppm é possível observar o sinal discreto relacionado ao $H^{(7)}$. Por fim, os fracos sinais apresentados entre 4,5-5,0ppm referem-se ao sinal emitido pelos hidrogênios do grupo $=CH_2$ do fim das cadeias de PI (PILICHOWSKI et al., 2010; RICCI et al., 2009).

Por tratar-se de um polímero de fonte natural, do Poliisopreno utilizado neste estudo é esperada a presença de uma estrutura cis-1,4-poliisopreno em 97% da composição do polímero (MRUE et al., 2004). No entanto, o PI pode também apresentar a estrutura trans-1,4-poliisopreno, ou mesmo a estrutura 3,4-poliisopreno, onde a ligação dupla não faria parte da cadeia principal, mas sim de uma ramificação (ANNUNZIATA et al., 2011). No entanto, pela análise do espectro e da intensidade dos picos na região 5,0-5,5ppm, é possível deduzir a posição da ligação dupla. O sinal relativo ao $H^{(7)}$ não estaria presente em tamanha intensidade no espectro caso a estrutura 3,4-poliisopreno fosse majoritária. Uma vez observado o sinal relativo a este hidrogênio no espectro, é possível afirmar que o material trata-se de uma estrutura cis-1,4-poliisopreno (RICCI et al., 2009).

4.1.3. Calorimetria Exploratória Diferencial

Para observação de transições térmicas dos polímeros foi realizada análise de termogramas obtidos por calorimetria exploratória diferencial. A temperatura de fusão (T_m), uma transformação de primeira ordem, com formação de pico endotérmico, foi observada durante o primeiro ciclo de aquecimento. A temperatura de transição vítrea (T_g), uma transformação de segunda ordem, com deslocamento da linha base do termograma, foi observada durante o segundo ciclo de aquecimento (CANEVAROLO, 2003; LUCAS et al., 2001). Os termogramas para PLGA, PI e blenda PLGA/PI são apresentados na fig. 9.

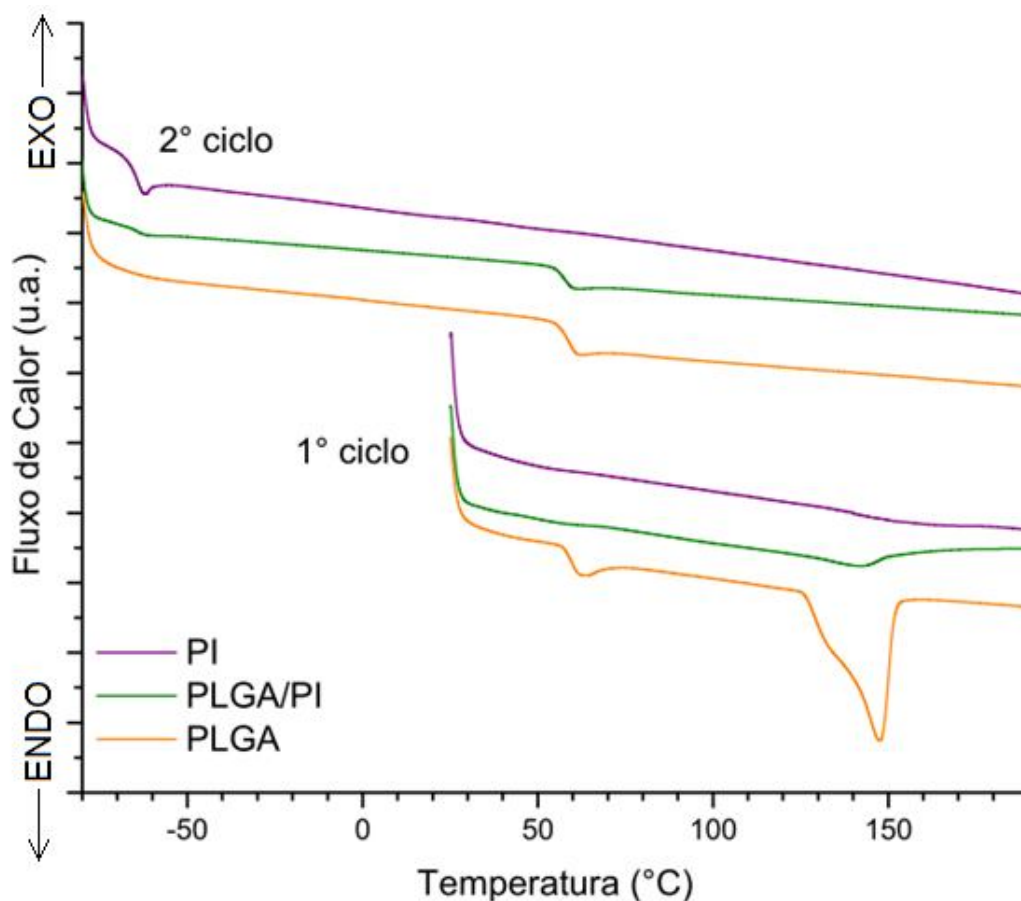


Figura 9: Termogramas de DSC de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.

Quando em estado sólido, as cadeias poliméricas podem apresentar um estado desordenado, formando um polímero amorfo, ou alinhadas em determinadas regiões, conferindo ao polímero certa cristalinidade. No entanto, tal cristalinidade é majoritariamente parcial nestes compostos. Portanto, polímeros com regiões cristalinas são ditos semi-cristalinos (AKCELRUD, 2007). As transformações observadas nos termogramas nada mais são do que alterações no comportamento das cadeias poliméricas quando expostas a variação térmica.

A temperatura de fusão cristalina dos polímeros é observada pela formação de um pico, como o observado a 149,45°C no termograma do PLGA (REZENDE et al., 2001). Trata-se da temperatura em que o sistema adquire energia suficiente para vencer as forças intermoleculares secundárias entre as cadeias da fase cristalina, destruindo a estrutura regular de empacotamento e

conduzindo a matéria para um estado mais viscoso (MARQUES, 2011). Esta transição é característica de materiais semicristalinos, sendo ausente em materiais amorfos. No termograma do PI, não são observadas transições desta ordem, o que leva a crer que o Poliisopreno trata-se de um material amorfo. O termograma da blenda na região da T_m do PLGA apresenta uma sutil variação térmica. Uma vez que a área do pico trata-se do calor de fusão, uma redução desta área corresponde a uma redução na energia necessária para vencer as forças intermoleculares da região cristalina do material (CANEVAROLO, 2003). Uma vez que a área do pico de T_m da blenda é visivelmente menor que a área do pico de T_m do PLGA, pode-se deduzir que a adição de PI na blenda reduz a incidência de regiões organizadas na cadeia polimérica e, conseqüentemente, a cristalinidade da blenda.

Por sua vez, a temperatura de transição vítrea dos polímeros foi obtida pela aplicação da regra da tangente (CHEN & QIAN, 2002). Tais transformações de segunda ordem, correspondentes ao início do movimento de segmentos das cadeias poliméricas, foram observadas a -66°C para Poliisopreno e a 59°C para Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico). O termograma da blenda apresentou ambas transições vítreas nas temperaturas relativas aos materiais puros. Pela observação de tal temperatura em blendas, é possível prever a miscibilidade dos seus polímeros componentes. Quando ocorre completa interação, as cadeias poliméricas se interpenetram como se tivessem a mesma estrutura, resultando em um único deslocamento relativo à T_g no termograma (KADLA & KUBO, 2003; PARASHAR et al., 2010). Para blendas parcialmente miscíveis, o termograma apresenta duas variações de linhas bases referente à T_g , com aproximação destas variações conforme a miscibilidade dos polímeros. No caso de misturas imiscíveis, apresentam-se as temperaturas de transição vítrea na mesma temperatura observada nos materiais puros (CANEVAROLO, 2003; CHEN & QIAN, 2002). A blenda PLGA/PI, por apresentar a T_g tanto em -66°C quanto em 59°C , pode ser considerada imiscível nesta proporção de composição.

4.1.4. Análise Termogravimétrica

As temperaturas de degradação térmica dos polímeros foram analisadas por TGA. Os termogramas permitem uma observação da perda de

massa do material com o aumento da temperatura, relacionando tal decréscimo com a gradativa perda de componentes. As curvas derivadas dos termogramas de TGA permitem uma análise mais precisa das temperaturas de degradação dos polímeros pela observação dos pontos de inflexão das curvas (GABBOTT, 2008). Ambas curvas são apresentadas na Fig. 10.

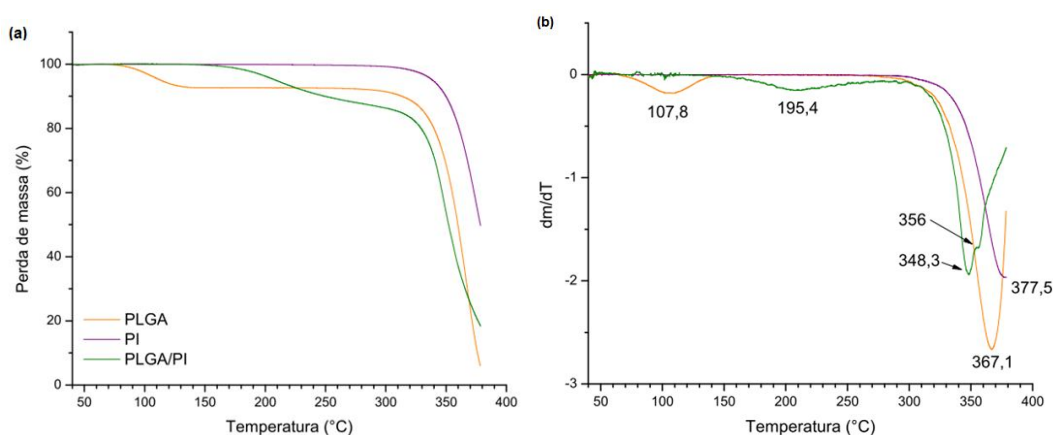


Figura 10: Curvas (a) TGA de PLGA, PI e blenda PLGA/PI e (b) derivadas das curvas TGA.

O PLGA apresenta uma perda de massa de aproximadamente 5% a 107,8°C e mantém estabilidade térmica até a completa degradação em 367,1°C. Esta perda inicial pode ser relacionada a evaporação de água absorvida ou residual no polímero (IAFISCO et al., 2012; SANKAR et al., 2012). Embora o Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) tenha sido usado como recebido, tal material é reconhecidamente hidrofílico, sendo plausível acreditar numa pequena absorção de água pela exposição a um ambiente de laboratório sem umidade controlada (SEVERINO et al., 2011). A temperatura de degradação térmica completa do material condiz com a literatura (CHOU et al., 2011; FOUAD et al., 2013; REZENDE & DUEK, 2003).

O Poliisopreno apresentou estabilidade térmica até uma drástica perda de massa a 377,5°C. Embora o ensaio não tenha sido aplicado numa variação de temperatura suficientemente elevada para observar 100% da degradação deste material, o dado encontrado condiz com a temperatura de degradação apresentada por outros pesquisadores (DONG et al., 2010; JOHN et al., 2010; MARTINS et al., 2006).

A blenda PLGA/PI tem sua degradação térmica completa observada nas inflexões a 348,3°C e 356°C. A apresentação de dois picos de degradação pode estar relacionada ao fato da blenda ser composta por polímeros imiscíveis, cada um reportando sua própria temperatura de degradação no mesmo termograma. Uma vez que as temperaturas de degradação de ambos os polímeros tem valores muito próximos, a sobreposição das duas temperaturas torna difícil a observação de uma degradação em dois estágios distintos (PETERSSON et al., 2007; SANKAR et al., 2012). Um leve desvio no comportamento linear da curva TGA a 360°C, com aproximadamente 40% de massa remanescente, pode sugerir o fim do estágio de degradação do PLGA e o início da degradação do PI até uma predizível degradação térmica completa acima de 380°C.

Previamente a essa perda mássica drástica, a blenda apresentou uma perda de massa gradual entre 150°C e 260°C, correspondendo a 12% da massa total. Pela análise da curva derivada, vemos esta perda no ponto de inflexão a 195,4°C. Esta perda apresenta um perfil de decomposição térmica com formação de agentes voláteis (GABBOTT, 2008). Tal temperatura apresenta valores muito elevados para representar a degradação de umidade, do clorofórmio usado como solvente, ou mesmo de monômeros lactide ou glicolide residuais no polímero (GRODOWSKA & PARCZEWSKI, 2010; JACOBS, 2006; SANKAR et al., 2012). Uma possível interpretação é a presença de umidade e/ou solventes aprisionados no interior da blenda, e não na sua superfície. A presença de tais componentes voláteis é plausível visto que a blenda submetida a esta caracterização foi obtida em formato de filme com secagem a 40°C, temperatura baixa para volatilização de água e clorofórmio, mas propícia a não ocasionar alterações nas características térmicas dos polímeros. A liberação e posterior degradação destes materiais seria possível apenas com a total mobilidade das cadeias poliméricas, alcançada na temperatura de fusão do componente semi-cristalino, o PLGA. Uma vez que o PLGA tem sua T_m a aproximadamente 150°C, apenas acima desta temperatura os solventes aprisionados teriam liberdade para sofrer os efeitos da degradação térmica.

4.1.5. Cromatografia de Permeação em Gel

A análise do material por cromatografia permitiu o cálculo da massa molecular numérica média (Mn), da massa molecular mássica média (Mw), e do índice de polidispersividade (IPD) de PLGA, PI e blenda, conforme valores expostos na Tabela 2. O índice de polidispersividade dos polímeros foi calculado pelo quociente entre Mw e Mn.

Tabela 2: Propriedades de massa molecular e índice de polidispersão de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.

Propriedade	PLGA	PI	PLGA/PI
Mn (g/mol)	249.340	294.847	107.652
Mw (g/mol)	460.250	720.425	226.713
IPD (Mw/Mn):	1,85	2,44	2,11

Verifica-se que para todos os materiais analisados, os valores de massa molecular apresentam-se na ordem de 10^5 g/mol. Comparando a resultados previamente encontrados na literatura, um estudo sobre a copolimerização do PLGA variando a concentração do catalisador apontou massas molares na mesma ordem de grandeza, apresentando resultados de índice de polidispersividade entre 1,7-2,0 para este material (HAN et al., 2012; MOTTA & DUEK, 2006).

O PI por sua vez, foi encontrado na bibliografia com dados inconsistentes com os apresentados acima. O estudo de Chávez & Saalwächter (2011) apontou que, embora houvesse variação significativa na massa molecular mássica média do Poliisopreno, de 17×10^3 g/mol a 1×10^6 g/mol, o índice de polidispersão manteve-se na faixa entre 1,02-1,05, o que aponta um crescimento proporcional entre Mn e Mw nos polímeros, proporcionalidade que não é observada no Poliisopreno, conforme tabela acima. Por outro lado, Annunziata e colaboradores (2011) estudaram os processos de polimerização por crescimento de cadeia do Poliisopreno usando agentes de transferência de cadeia. Nos resultados apresentados obtidos para a polimerização do Isopreno na ausência de tais agentes, observa-se um gradativo crescimento do índice de polidispersividade de 1,6 para 1,9 quando a massa molecular numérica média é manipulada de 47.800g/mol para

98.000g/mol. Pode-se esperar então um IPD ainda maior quando do aumento da M_n , como apresentado na tabela acima. No entanto, cabe ressaltar que o estudo apresentado também detectou que aproximadamente 90% da cadeia polimérica correspondia a uma estrutura trans-1,4-Poliisopreno (ANNUNZIATA et al., 2011). É possível que estruturas cis e estruturas trans não sejam passíveis de comparação direta quando se refere a sua massa molecular.

Ao analisar os valores da blenda PLGA/PI, é possível observar que a mistura obteve valores de massa molecular significativamente menores que os apresentados pelos polímeros puros, embora seu IPD encontre-se com valor intermediário entre PLGA e PI. No que se refere à massa molecular, o uso de solvente orgânico para obtenção da blenda pode ser o responsável pela redução do comprimento da cadeia polimérica e consequentemente, da massa molecular. Por sua vez, o índice de polidispersividade corresponde à distribuição do peso molecular das cadeias dentro do polímero. É plausível crer que, por ter um IPD menor, as cadeias de PLGA apresentam menor diferença de tamanho entre si, efeito contrário ao observado nas cadeias de PI. A blenda entre eles, em uma proporção de composição mássica de 60% PLGA + 40% PI e volumétrica de 51% PLGA + 49% PI, deve então apresentar uma distribuição de peso molecular intermediária à apresentada pelos polímeros puros. Tal constatação também leva a crer que o efeito do solvente orgânico é exercido sobre ambos os polímeros (CANEVAROLO, 2002; HAN et al., 2012).

4.1.6. Molhabilidade

A medição do ângulo de contato foi aplicada sobre superfícies lisas dos materiais com o intuito de determinar a molhabilidade destes. Tal molhabilidade é controlada majoritariamente pela energia superficial do material e pode determinar seu grau de interação com células e proteínas, por exemplo. O ângulo de contato é definido então como o ângulo formado entre a superfície sólida e a tangente à superfície do líquido no ponto de contato entre os dois, sendo que este ângulo determina condição de não-molhabilidade ou hidrofobia quando seu valor estiver acima de 90° , ou condição de molhabilidade ou hidrofília quando seu valor estiver abaixo de 90° (KALASKAR et al., 2008; SILVA, 2008). Para PLGA, PI e sua blenda, os valores encontrados estão expostos na fig. 11.

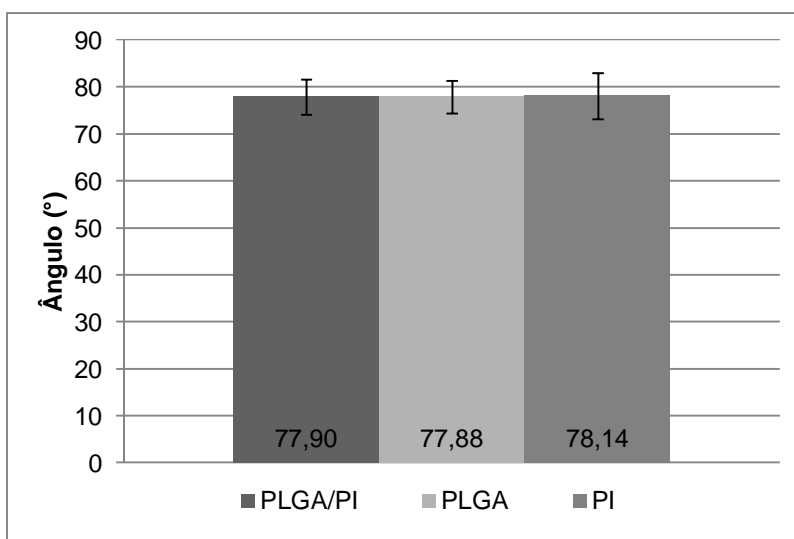


Figura 11: Ângulo de contato para PLGA, PI e blenda PLGA/PI.

Os três grupos apresentaram valores próximos de ângulo de contato, sem diferença significativa entre eles. Todos os materiais caracterizados nesta pesquisa podem ser ditos levemente hidrofílicos, o que pode vir a favorecer a cultura celular e os estudos para engenharia de tecidos (JÄRSTRÖM et al., 2010; RAVICHANDRAN et al., 2012; WAN et al., 2003; WIMPENNY et al., 2012).

4.1.7. Ensaio de Tração

O ensaio de tração permitiu observar as propriedades mecânicas intrínsecas dos polímeros. A partir das curvas geradas foi possível a aquisição de valores de tensão e deformação nos pontos de tensão máxima e na ruptura. Com os dados no ponto de escoamento, onde a curva abandona sua linearidade inicial, foi possível calcular o módulo de Young. A área sob a curva do ponto inicial até o ponto de escoamento e até a ruptura permitiu o cálculo de resiliência e tenacidade, respectivamente. A proporção de energia dispendida em deformação plástica e deformação elástica foi considerada relacionando os valores de tenacidade - energia de deformação à ruptura - e resiliência - energia de deformação elástica. Todos os valores estão expostos na Tabela 3,

enquanto as curvas tensão-deformação de PLGA, PI e PLGA/PI são apresentadas na Fig. 12.

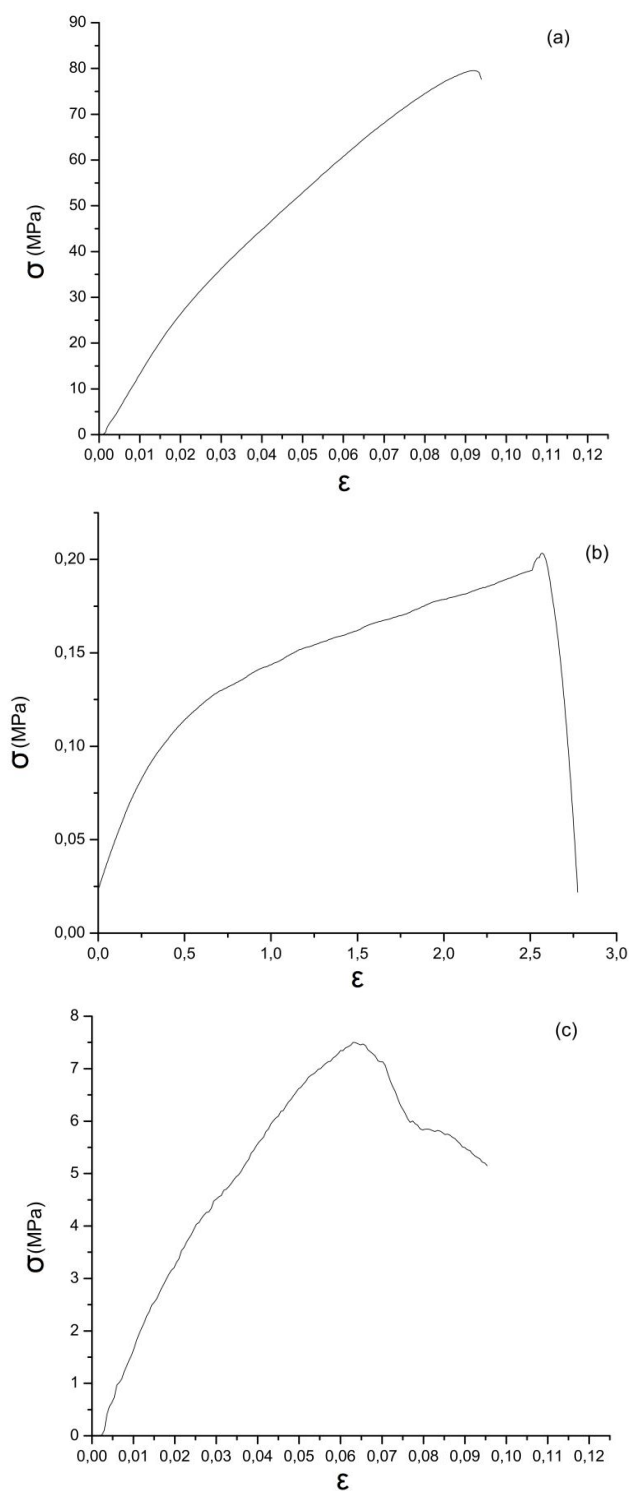


Figura 12: Curvas tensão-deformação em tração de (a) PLGA, (b) PI, e (c) PLGA/PI.

Tabela 3: Propriedades mecânicas de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.

	PLGA	PI	PLGA/PI
Módulo de Young (MPa)	891,1958	0,2245	137,7898
Tensão máxima (MPa)	79,9798	0,2024	7,6449
Tensão de ruptura (MPa)	74,6581	0,2024	5,8671
Deformação na tensão máxima (%)	9,4073	255,9164	7,2033
Deformação na tensão máxima (mm/mm)	0,0941	2,5591	0,0720
Deformação na ruptura (%)	9,8333	255,9164	9,7000
Deformação na ruptura (mm/mm)	0,0983	2,5591	0,0970
Tenacidade (J/cm³)	4,7065	0,4023	0,4831
Resiliência (J/cm³)	4,0147	0,0381	0,1830
Proporção de energia - def. elástica (%)	85,3019	9,4608	37,8744
Proporção de energia - def. plástica (%)	14,6981	90,5392	62,1256

A adição de Poliisopreno ao Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) reduziu todos os valores das propriedades apresentadas pela blenda quando comparada ao PLGA puro. Este efeito está intimamente ligado à adição de um polímero amorfo a um polímero semi-cristalino, visto que o comportamento mecânico para estes materiais estará intimamente ligado à sua morfologia inicial (STEVENS, 1999). Tal condição explica a presença de propriedades mecânicas tão elevadas para o PLGA e sua estrutura semi-cristalina. A redução considerável de massa molecular dos polímeros após o processamento - como visto na análise de cromatografia - também pode ter influência na redução de propriedades dos materiais puros após o evento da blenda (CIESIELSKI, 1999).

Tal ponto de vista das propriedades mecânicas, levando em consideração a cristalinidade, pode também ser útil para rotular o comportamento do material. Materiais com comportamento frágil apresentarão ruptura próxima ao ponto de escoamento, com relativamente baixa deformação plástica. Tal comportamento é observado com frequência em polímeros com maior cristalinidade, como o PLGA, visto que eles exibem apenas pequena alteração da estrutura molecular antes da quebra. O efeito contrário é esperado para materiais amorfos, como o PI, onde a proporção de deformação plástica é alta. Materiais com estas propriedades mecânicas são ditos como tendo comportamento dúctil (STEVENS, 1999; WARD & HADLEY, 1995).

Nota-se que a presença de Poliisopreno no material reduziu consideravelmente o valor do módulo de Young da blenda, uma vez que o PLGA atingiu módulo de Young elevado. O alto valor de módulo representa a alta capacidade de o material tolerar tensão sem deformar permanentemente. Upadhyay e colaboradores (2010) constataram que a adição de materiais semi-cristalinos a uma matriz polimérica aumentaram a cristalinidade da blenda, contribuindo para o aumento do módulo de Young, sendo que o comportamento inverso, com adição de materiais amorfos, pode ter influência na diminuição deste módulo. Em polímeros, o módulo no escoamento pode apresentar-se com valor elevado. Porém, além deste ponto, tensão suficiente é aplicada para desenovelar e permitir a fluência das cadeias poliméricas uma sobre as outras, sendo a deformação a partir deste ponto irreversível (STEVENS, 1999). John e colaboradores constataram que a adição de Poli (Metil Metacrilato) (PMMA), um material semi-cristalino, ao Poliisopreno, aumentou em dez vezes o valor da tensão máxima e trouxe o valor do módulo de Young de 30MPa para 500 MPa. A deformação na ruptura reduziu com o aumento da proporção de PMMA na blenda com PI. Embora os resultados reportem as características do PI intercruzado, eles expõem o efeito da blenda entre um material amorfo e um semicristalino (JOHN et al., 2010).

Outro comportamento peculiar apresentado pelo Poliisopreno neste ensaio foi a ocorrência da ruptura no ponto de máxima tensão. Tal comportamento no material também foi reportado por Amnuaypornsrri e colaboradores (2010). A borracha natural de látex previamente à vulcanização apresentou deformação máxima de aproximadamente 100% e tensão máxima 5,5 MPa, com ruptura no ponto de tensão e deformação máximas. Estes valores diminuem significativamente pelo uso de processos de purificação do material para retirada de proteínas remanescentes do polímero natural, o que pode explicar os valores de tensão mais baixos reportados para o PI na tabela 3 (AMNUAYPORNRSRI et al., 2010).

A adição de PI na blenda também reduz relevantemente a tenacidade e a resiliência da blenda quando comparada ao PLGA puro. No entanto, relacionando estas duas propriedades, percebe-se que as blendas gastam proporcionalmente maiores quantidades de energia na deformação plástica do

que o PLGA. Enquanto a blenda usa aproximadamente 62% da energia total após o ponto de escoamento, o PLGA puro usa menos de 15% em deformação plástica, o que caracteriza que o PLGA é um material mais frágil que a blenda PLGA/PI. Tal característica leva a crer que os produtos originados da blenda podem ser mais facilmente moldados em eventos pré-cirúrgicos, por exemplo, ou mesmo ter sua forma ajustada por forças internas do organismo onde está implantado, sem o risco de sofrer rupturas ou um colapso da estrutura *in situ*, desde que não se ultrapassem os limites da tensão máxima do material.

4.2. Caracterização - Fibras Poliméricas

4.2.1. Diâmetro de Fibras

Por microscopia foi possível analisar o diâmetro das fibras e o tamanho de poros, predizendo as condições topográficas disponíveis para o crescimento celular nos *scaffolds*. A fig. 13 mostra uma das 30 imagens obtidas para fibras obtidas por gotejamento e por *electrospinning*, enquanto o gráfico da fig. 14 apresenta a média encontrada para o diâmetro das fibras e seu tamanho de poros.

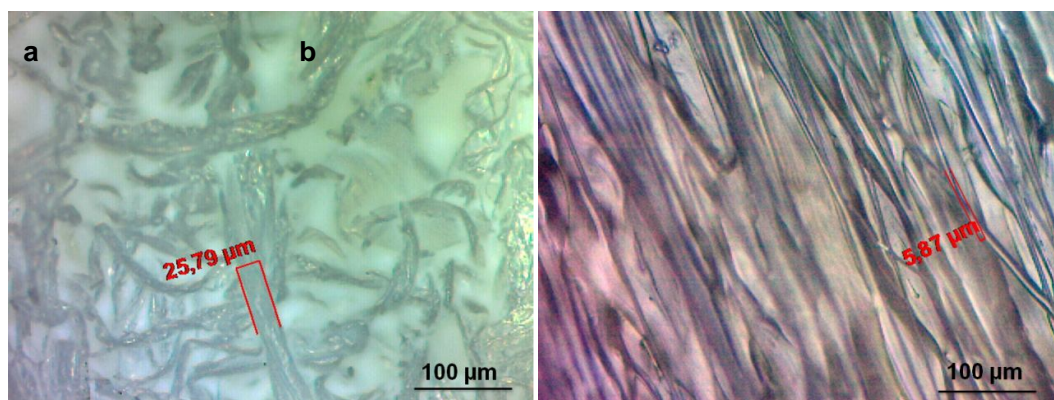


Figura 13: Microscopia óptica de fibras (a) FD e (b) FS.

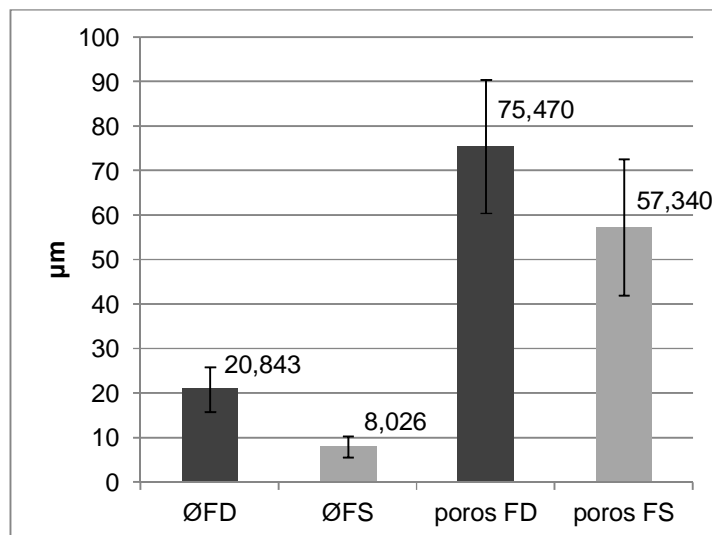


Figura 14: Diâmetro de fibras e tamanho de poros em scaffolds FD e FS.

As fibras obtidas por gotejamento apresentaram um diâmetro médio de 20,8 µm, com espaçamento entre fibras de 75,5 µm. Por sua vez, as fibras obtidas por *electrospinning* apresentaram um diâmetro médio de 8,02 µm, com espaçamento entre fibras de 57,3 µm. Estudos divergem de opinião sobre a influência do diâmetro das fibras na cultura celular. O uso de nanofibras permite uma rápida adesão celular, mas limita a capacidade de proliferação e formação de novo tecido. Pode-se até mesmo sugerir que *scaffolds* compostos de micro e nanofibras sejam vantajosos por combinarem as propriedades mecânicas das microfibras com o biomimetismo das nanofibras (WIMPENNY et al., 2012). No entanto, é correto afirmar que o aumento do diâmetro das fibras proporciona também um aumento no tamanho dos poros, devido a restrição espacial para sua distribuição (HE et al., 2010). Tal efeito é observado nas fibras FD e FS. Embora obtidas por processos distintos, o aumento no diâmetro das fibras proporciona um aumento em seu espaçamento. Apesar de fibras de maior diâmetro apresentarem maior tamanho de poros para a migração e proliferação de células, cabe ressaltar que o diâmetro das fibras deve ser específico para cada linhagem celular a fim de atingir uma mais efetiva engenharia de tecido (HONG & MADIHALLY, 2011; SHANMUGASUNDARAM et al., 2011).

É possível também observar pelas microscopias que as fibras FD apresentam um emaranhamento das fibras, enquanto as fibras FS

proporcionam uma topografia orientada. Esta diferença de aspecto se deve majoritariamente às diferenças nas técnicas de obtenção das fibras. Enquanto no método de gotejamento as fibras são geradas em meio líquido em turbulência, as fibras de *electrospinning* são geradas sobre um coletor com rotação axial, o que ajuda a produzir fibras com a mesma orientação longitudinal. Tal orientação de fibras pode ser vantajosa no cultivo de tecidos com organização direcional, como tecidos musculares (VASITA & KATTI, 2006). Células respondem aos parâmetros de topografia superficial com alterações na sua orientação, taxa de mobilidade, crescimento e diferenciação, ativação e modulação de expressão genética (BEN-NISSAN et al., 2004). Mas por apresentarem um diâmetro reduzido e conseqüente menor área de ancoragem, fibras de *electrospinning* podem representar uma redução na viabilidade, proliferação e densidade celular em cultivo, especialmente nos primeiros dias de cultura (BASHUR et al., 2006).

4.2.2. Porosidade e Densidade

As análises da porosidade e da densidade dos *scaffolds* produzidos a partir de fibras FD e FS foram procedidas por imersão dos corpos de prova em etanol como previamente descrito. Os resultados para porosidade e densidade são apresentados nas fig. 15 e fig. 16, respectivamente.

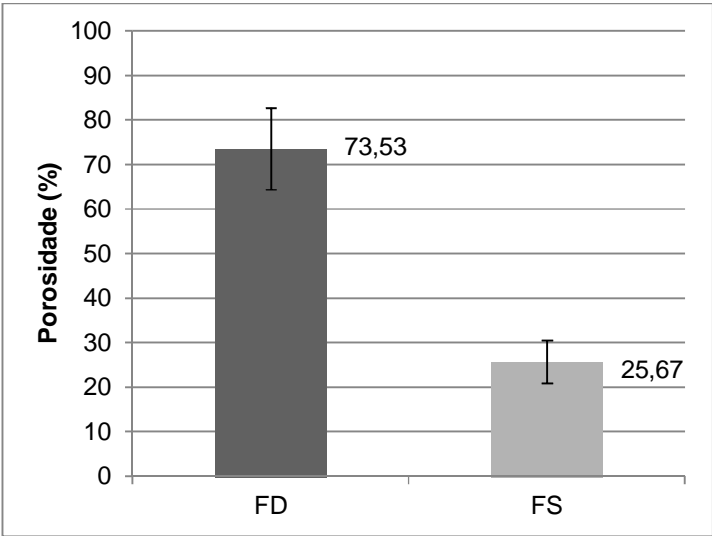


Figura 15: Porosidade de scaffolds FD e FS.

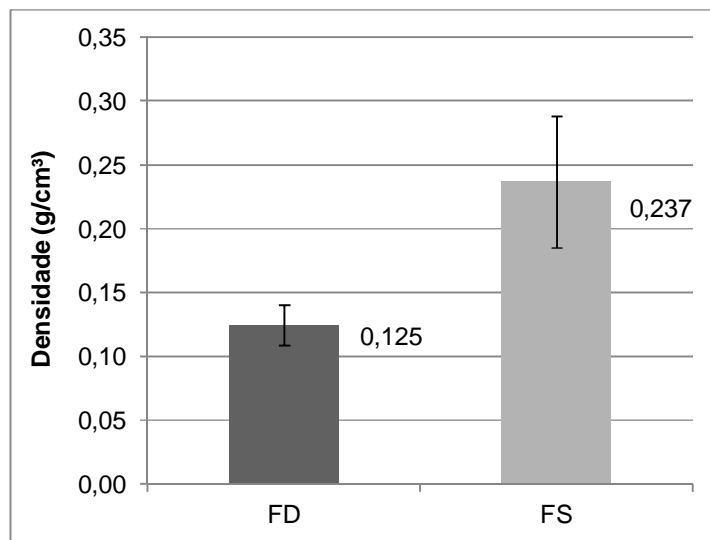


Figura 16: Densidade de scaffolds FD e FS.

Como esperado, por apresentarem um maior diâmetro e um maior tamanho de poros, as fibras FD apresentam também maior porosidade. A estrutura emaranhada de tais fibras provém uma estrutura de poros interconectados, o que favorece a liberdade de migração das células para o interior o *scaffold*. Por apresentar uma estrutura organizada e compacta, os *scaffolds* FS apresentaram baixa porosidade e alta densidade. Cabe também observar que o aumento da porosidade reduz a densidade dos arcabouços, uma vez que um maior espaçamento interno representa uma menor quantidade de material nos *scaffolds*, o que obviamente interfere na relação massa/volume apresentada no parâmetro densidade.

Usando uma técnica de incorporação de sais no PLLA diluído, com posterior volatilização do solvente e lavagem dos sais, Shi e colaboradores (2002) obtiveram *scaffolds* com até 90% de porosidade, sendo que tal parâmetro variou em relação direta com a proporção de sal adicionado ao polímero. Preparação de *scaffolds* do mesmo polímero por separação de fases por indução térmica proporcionaram porosidade de até 93% nos arcabouços (HELEN & GOUGH, 2008). Porém, ambas técnicas de fabricação podem limitar a interconectividade dos poros pela existência de "paredes" de material dentro do *scaffold*. Fibras de PLGA com porosidade de aproximadamente 80% mostraram-se efetivas na regeneração de tecido ósseo *in vivo* (PENK et al., 2013). *Scaffolds* baseados em polímeros naturais como colágeno, obtidos por

electrospinning, apresentaram resultados significativos na regeneração de fibroblastos dérmicos, apesar de apresentarem porosidade inferior a 50% (RNJAK-KOVACINA et al., 2012). Com uma porosidade em FD e FS condizente com o previamente encontrado na literatura, pode-se indicar a viabilidade das fibras PLGA/PI de gotejamento e *electrospinning* para engenharia de tecidos.

4.2.3. Molhabilidade - *Scaffolds*

A fim de determinar a molhabilidade dos materiais após o processamento e prever um possível comportamento dos *scaffolds* em meio de cultura, ensaio de ângulo de contato foi aplicado a superfícies de fibras FD e FS. Os valores encontrados estão expostos na fig. 17.

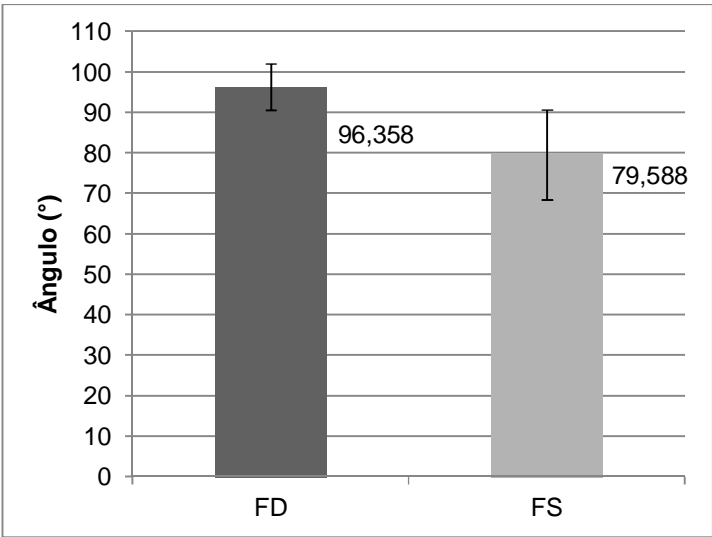


Figura 17: Ângulo de contato para scaffolds FD e FS.

Quando analisados os resultados de molhabilidade das fibras, superfícies FD mostraram um comportamento levemente hidrofóbico, enquanto superfícies FS mostraram um comportamento levemente hidrofílico. Visto que ambas as fibras foram obtidas a partir da mesma blenda, observa-se uma influência do método de conformação e da estrutura fibrosa resultante sobre a molhabilidade do material. Rugosidade da superfície também é conhecida por alterar o ângulo de contato medido. Fibras gotejadas apresentam uma superfície rugosa e aleatoriamente organizada, o que pode influenciar o fluxo

do meio de cultura durante testes *in vivo*, bem como a interação das células com estas fibras. Por outro lado, fibras de *electrospinning* tem uma estrutura superficial organizada em alinhamento paralelo, o que pode induzir uma melhor molhabilidade do *scaffold*. No entanto, Ambos *scaffolds* FD e FS apresentaram ângulo de contato maior sobre as fibras do que o previamente reportado sobre o filme da blenda (77,9°). Tal comportamento condiz com o previamente reportado na literatura, onde se crê que a barreira física exibida pelas fibras tem um maior efeito hidrofóbico sobre o material do que a mesma propriedade analisada sobre o filme polimérico (JÄRSTRÖM et al., 2010; RAVICHANDRAN et al., 2012; WIMPENNY et al, 2012). Cabe ressaltar que, por ser um ensaio aplicado sobre superfícies não uniformes ou planas, a propriedade reportada é empírica e não diretamente relacionada com a molhabilidade apresentada pelo material em filme.

4.2.4. Propriedades Mecânicas - *Scaffolds*

A fim de avaliar as propriedades mecânicas dos *scaffolds* foram realizados ensaios de compressão axial e tração. Embora tais propriedades não tenham uma relação direta com as propriedades intrínsecas da blenda, a análise destes resultados permite uma avaliação do possível comportamento do arcabouço *in situ*, visto que a aplicação destes em diferentes tecidos implica na sua submissão a diferentes exigências mecânicas. Na Tabela 4 estão os resultados encontrados no ensaio de compressão enquanto as curvas tensão-deformação de FD e FS são apresentadas na Fig. 18.

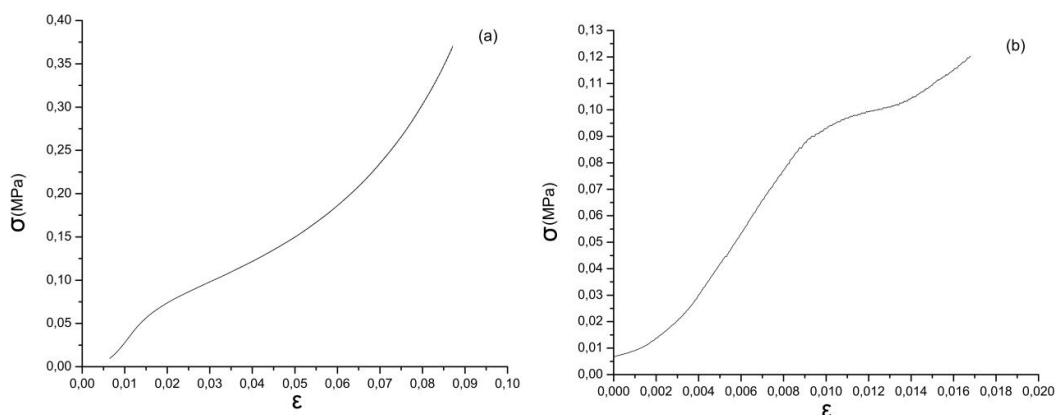


Figura 18: Curva tensão-deformação em compressão de fibras (a) FD e (b) FS.

Tabela 4: Propriedades mecânicas de compressão de *scaffolds* FD e FS.

PROPRIEDADE	FD	FS
Tensão no escoamento (MPa)	0,057	0,085
Deformação no escoamento (mm/mm)	0,0152	0,0087
Deformação no escoamento (%)	1,5190	0,8742
Módulo de Young (MPa)	3,752	9,723

No ensaio de compressão foi analisado o ponto de escoamento das curvas, com exposição dos valores de tensão e deformação, bem como a relação entre eles. Embora as fibras gotejadas apresentem uma maior deformação e tensão neste ponto, o módulo de Young apresentou-se maior para as fibras obtidas por *electrospinning*. O valor de módulo mais alto representa a maior capacidade de o material tolerar tensão sem deformar permanentemente. Devido à orientação/organização das fibras FS, existe a demanda por maiores tensões num menor deslocamento para iniciar a deformação permanente do arcabouço. Por outro lado, fibras FD podem deformar aproximadamente três vezes mais que fibras FS antes do início da deformação plástica. Essa deformação maior no ponto de escoamento caracteriza a estabilidade mecânica do *scaffold* com estrutura emaranhada até o ponto em que a deformação torna-se permanente.

Diferentes tipos de materiais são constantemente submetidos a diferentes tipos de processamento a fim de gerar *scaffolds* ideais para engenharia de tecidos. *Scaffolds* de PLGA obtidos por separação de fase por

indução térmica apresentaram um módulo de aproximadamente 3MPa a uma tensão de 0,1MPa. Observou-se que o módulo do *scaffold* aumenta com o aumento da proporção de polímero dissolvido previamente à separação de fase, com um respectivo aumento na espessura das paredes dos poros (MA & ZHANG, 2001; YANG et al., 2006). Tais valores de módulo condizem com as propriedades apresentadas pelas fibras FD. Quando a porosidade dos *scaffolds* foi obtida por inserção de microesferas de gelatina no PLGA, usando o mesmo processamento, o módulo dos arcabouços reduz para 0,4MPa. Apesar dos baixos valores, a criação de porosidade por este método pode auxiliar na uniformidade dos poros, minimizando defeitos estruturais e eventuais falhas mecânicas (LIU et al., 2006). A estrutura emaranhada das fibras FD proveem esta estabilidade estrutural, prevenindo a existência de microfalhas.

Scaffolds de Policaprolactona também mostraram resultados um tanto distintos pela variação do método de processamento e, conseqüentemente, de sua estrutura interna. Enquanto *scaffolds* obtidos por manufatura aditiva apresentaram um módulo de 1,8MPa, os arcabouço fibrosos de *electropinning* elevaram o módulo a 900MPa e tensão de escoamento de 14MPa (BASSI et al., 2011; EOSOLY et al., 2012). Embora estas fibras tenham uma estrutura emaranhada, suas propriedades mecânicas são elevadas o suficiente para aplicações com alta exigência mecânica, como engenharia de tecidos ósseos. Na porção trabecular dos ossos, onde a porosidade é elevada, o módulo de Young alcança valores de até 500MPa, com tensão máxima entre 7-10MPa (BASSI et al., 2011). Uma vez que na reposição óssea as propriedades mecânicas do arcabouço representam um papel majoritário, ambas fibras FG e FS apresentam propriedades insuficientes para este tipo de aplicação. No entanto, as propriedades mecânicas do *scaffold* tendem a serem aumentadas pelo crescimento dos tecidos, o que não inviabiliza totalmente os *scaffolds* obtidos para aplicação em reposição óssea.

Para avaliar a resposta mecânica dos *scaffolds* ao movimento de tração, corpos de prova com a mesma estrutura do arcabouço forma avaliados. As curvas tensão-deformação obtidas estão apresentadas na Fig. 19, enquanto os valores estão expostos na Tabela 5.

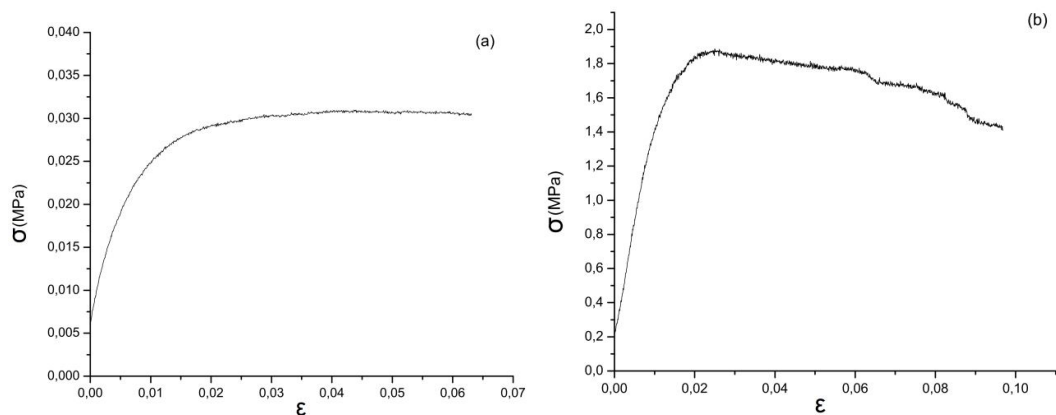


Figura 19: Curvas tensão-deformação em tração de fibras (a) FD e (b) FS.

Tabela 5: Propriedades mecânicas de tração de *scaffolds* FD e FS.

PROPRIEDADE	FD	FS
Tensão máxima (MPa)	0,03063	1,87571
Tensão de ruptura (MPa)	0,03046	1,40899
Deformação na tensão máxima (mm/mm)	0,03459	0,02265
Deformação na tensão máxima (%)	3,4590	2,2650
Deformação na ruptura (mm/mm)	0,06307	0,09684
Deformação na ruptura (%)	6,3070	9,6840
Módulo de Young (MPa)	2,169	103,4705

Os *scaffolds* FS apresentaram tensão máxima e deformação na ruptura mais elevadas, além de um módulo que chega a ser aproximadamente 50 vezes mais elevado que o módulo dos *scaffolds* de fibras gotejadas. As fibras FD, apresentando uma maior deformação no ponto de tensão máxima, reforçam o resultado apresentado no ensaio de compressão, onde se crê que estes *scaffolds* suportam uma maior deformação antes de alcançarem seu limite de tensão e/ou iniciarem sua deformação permanente.

A diferença de comportamento entre fibras enoveladas e orientadas condiz com o previamente reportado na literatura. Fibras de PLGA foram obtidas por *electrospinning* num coletor em rotação axial. Com uma velocidade de rotação do coletor de 300rpm, foram obtidas fibras emaranhadas, enquanto com rotação a 1500rpm, as fibras apresentaram orientação. Tais fibras orientadas apresentaram um módulo de 750MPa, contra um módulo de 100MPa das fibras emaranhadas (AVISS et al., 2010). O mesmo

comportamento foi observado em fibras de Polihidroxibutirado, onde as fibras enoveladas alcançaram módulo de 185MPa enquanto fibras orientadas obtiveram módulo de 277MPa (RICOTTI et al., 2012).

Apesar das curvas não serem passíveis de comparação direta, devido à diferença de escala, o perfil apresentado nas curvas tensão-deformação nos proporcionam entender o comportamento do material quando submetido a tração. As fibras de *electrospinning*, por apresentarem uma estrutura orientada com todas as fibras no mesmo sentido, perdem sua resistência a tração paulatinamente, com a quebra parcial das fibras quando da continuidade do deslocamento. Por outro lado, as fibras gotejadas, com sua estrutura emaranhada de fibras mais espessas, alcança seu limite de tensão e mantém esta plataforma até a ruptura do *scaffold*, com o colapso da estrutura em um único ponto.

Para tecidos moles, a resistência mecânica não se apresenta como uma propriedade vital do *scaffold*. A substituição de músculos, pele e cartilagem se valem mais da elasticidade do material, uma vez que a estrutura elástica é um forte determinante da resiliência, textura e qualidade do tecido gerado. Arcabouços combinando uma estrutura fibrosa de elastina humana sintética e colágeno alcançaram valores de módulo menores que 1MPa e foram considerados apropriados para regeneração de tecidos dérmicos (RNJAK-KOVACINA et al., 2012). Por sua vez, a artéria femoral humana, conhecida por ser uma das artérias de maior dimensão no corpo, quando submetida a ensaio de tração apresentou um módulo de 9MPa e tensão máxima de 1MPa (WANG et al., 2012). O músculo esquelético, um tecido tanto macio quanto contrátil, apresenta seu valor de módulo entre 12-15kPa (0,012-0,015MPa), e os fibroblastos apresentam módulos ainda menores, entre 2-5kPa (0,002-0,005MPa) (ENGLER et al., 2004). Tais valores de módulo levam a crer que ambas fibras FD e FS são mais passíveis de sucesso quando aplicadas à regeneração de tecidos moles, em virtude das propriedades mecânicas simularem mais fielmente o ambiente fisiológico.

4.3. Caracterização *in vitro* - Observação Preliminar

4.3.1. Mioblastos Murinos

Uma vez definido, pela análise das propriedades mecânicas, que as fibras apresentam potencial principalmente para regeneração de tecidos moles, amostras laminares de ambas as fibras foram submetidas a cultura *in vitro* de células musculares - linhagem C2C12. Nos períodos de 1, 3, 7 e 14 dias após o início do cultivo, as células foram fixadas nas amostras e coloridas com azul de toluidina, a fim de facilitar a observação microscópica das células presentes na superfície das fibras. As imagens obtidas para ambas fibras, bem como para grupo controle, estão apresentadas na Fig. 20.

Visto que os pontos azuis tratam-se dos mioblastos C2C12, observa-se no grupo controle um crescimento gradual entre 1 e 14 dias de cultura. Tal crescimento também é observado nas fibras FD. Uma vez que a coloração azul também afeta a opacidade desta fibra, existem nas micrografias áreas escuras e áreas claras correspondentes às fibras e aos espaços internos respectivamente. Embora não na mesma densidade aparente do grupo controle, a 14 dias observa-se um crescimento significativo da população celular sobre as fibras.

Uma vez que os músculos esqueléticos são tecidos altamente organizados e alinhados, prover uma topografia organizada como as fibras de *electrospinning* pode representar uma vantagem na engenharia deste tecido, induzindo a diferenciação dos mioblastos em miotubos e eventual neo-formação tecidual (AVISS et al., 2010). No entanto, em todos os períodos de observação houve a ausência de células desenvolvidas sobre as fibras FS. Visto que todos os grupos receberam o mesmo tratamento no mesmo período, descarta-se a hipótese de contaminação das células. Entre as hipóteses plausíveis para justificar a falha das fibras FS estão possíveis efeitos contaminantes do polímero sobre o meio de cultura ou possível presença de solvente residual no polímero. Uma vez que as fibras FD e FS tratam-se do mesmo material submetido a diferentes tipos de processamento para obtenção de estrutura fibrosa, é plausível acreditar que falhas nas etapas de processamento também possam ter efeito sobre o resultado distinto apresentado por estas fibras em cultura celular. A partir deste ponto o trabalho segue duas vertentes: os

eventos que ocasionaram a falha das fibras FS; e a caracterização das fibras FD em diferente linhagens celulares vislumbrando diferentes áreas de aplicação na engenharia de tecidos.

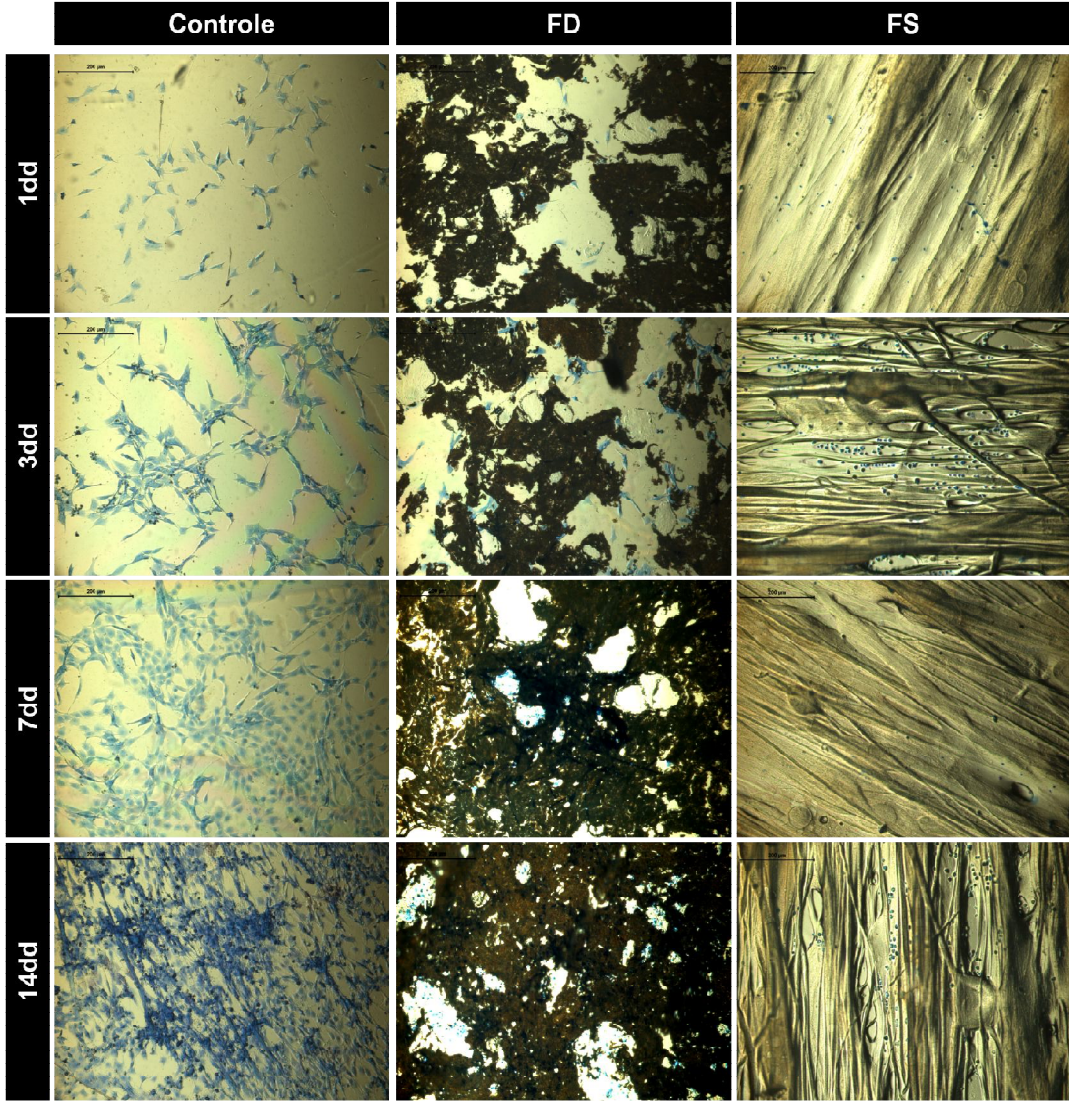


Figura 20: Microscopia óptica de cultura celular linhagem C2C12 em grupo controle, fibras FD e fibras FS. Barra de escala: 200μm.

4.4. Caracterização *in vitro* - Fibras de *Electrospinning*

4.4.1. Efeito das Fibras Sobre Meio de Cultura

Para averiguar possíveis efeitos contaminantes da fibra obtida por *electrospinning* sobre o meio de cultura, foi realizada a quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) com resultados apresentados na Fig. 21, bem como ensaio *Live/Dead*, com microscopias de fluorescência apresentadas na Fig. 22.

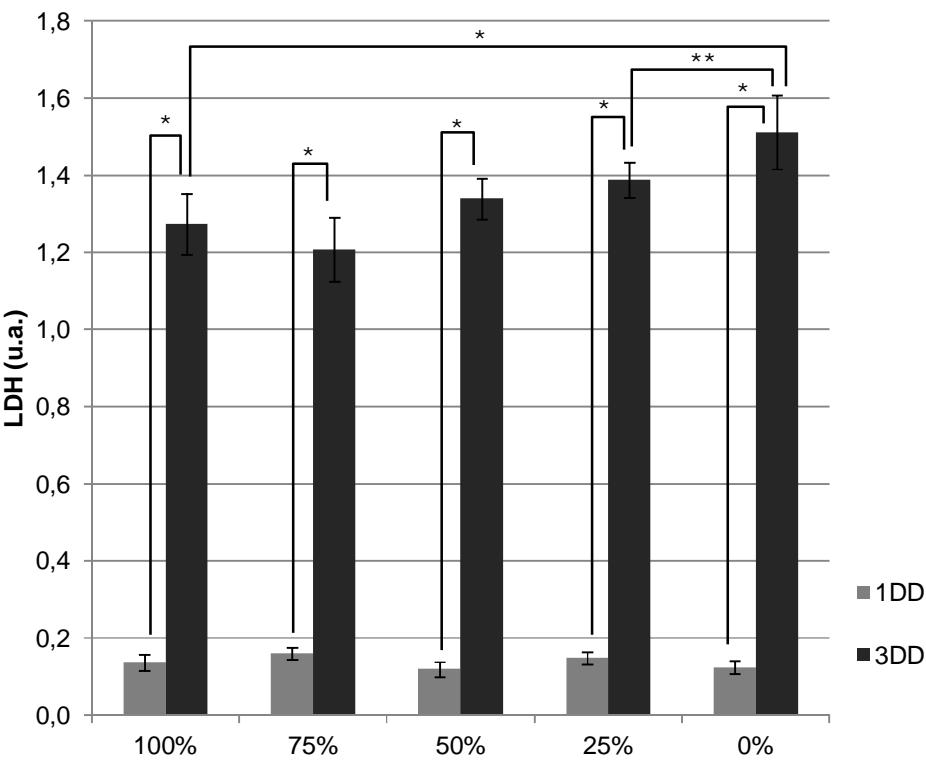


Figura 21: Determinação de quantidade de lactato desidrogenase para C2C12 em diferentes meios de cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).

A determinação de quantidade de LDH no meio de cultura é constantemente utilizada em ensaios de viabilidade celular a fim de quantificar a atividade metabólica de células em engenharia de tecidos (JAYAWARNA et al., 2009; LORDAN et al., 2011). Relacionando tal quantificação com as imagens obtidas em ensaio *Live/dead*, pode-se ter uma ideia do crescimento celular e do possível efeito dos diferentes meios de cultura utilizados. Nas

microscopias, os pontos azuis representam células vivas e os pontos vermelhos representam células mortas.

Considerando-se o grupo ZERO como controle, uma vez da sua total ausência de contato com as fibras FS, é possível observar um crescimento expressivo no período entre um e três dias. Nos entanto, a análise de variância revela que não há uma diferença significativa entre os grupos após um dia de cultura, quaisquer que seja a concentração de MC-FS utilizada.

Após três dias do início do cultivo é possível observar também um crescimento significativo nos grupos tratados com diferentes alíquotas de MC-FS. Neste período também notam-se os efeitos da fibra sobre o meio de cultura. Comparando estatisticamente cada grupo tratado com o grupo controle, apresenta-se um crescimento significativamente menor nos grupo 100, 75/25 e 50/50. O grupo com 25% de MC-FS em sua composição não apresentou diferença estatística com o grupo controle. Tais resultados levam a crer que, quando acima de 25% de meio de cultura submetido ao contato com fibras FS, existe um efeito negativo no crescimento das células. É possível que a presença de contaminantes ou solventes residuais no polímero ocasionem a redução do crescimento celular, mesmo quando da ausência de contato direto entre células e fibras.

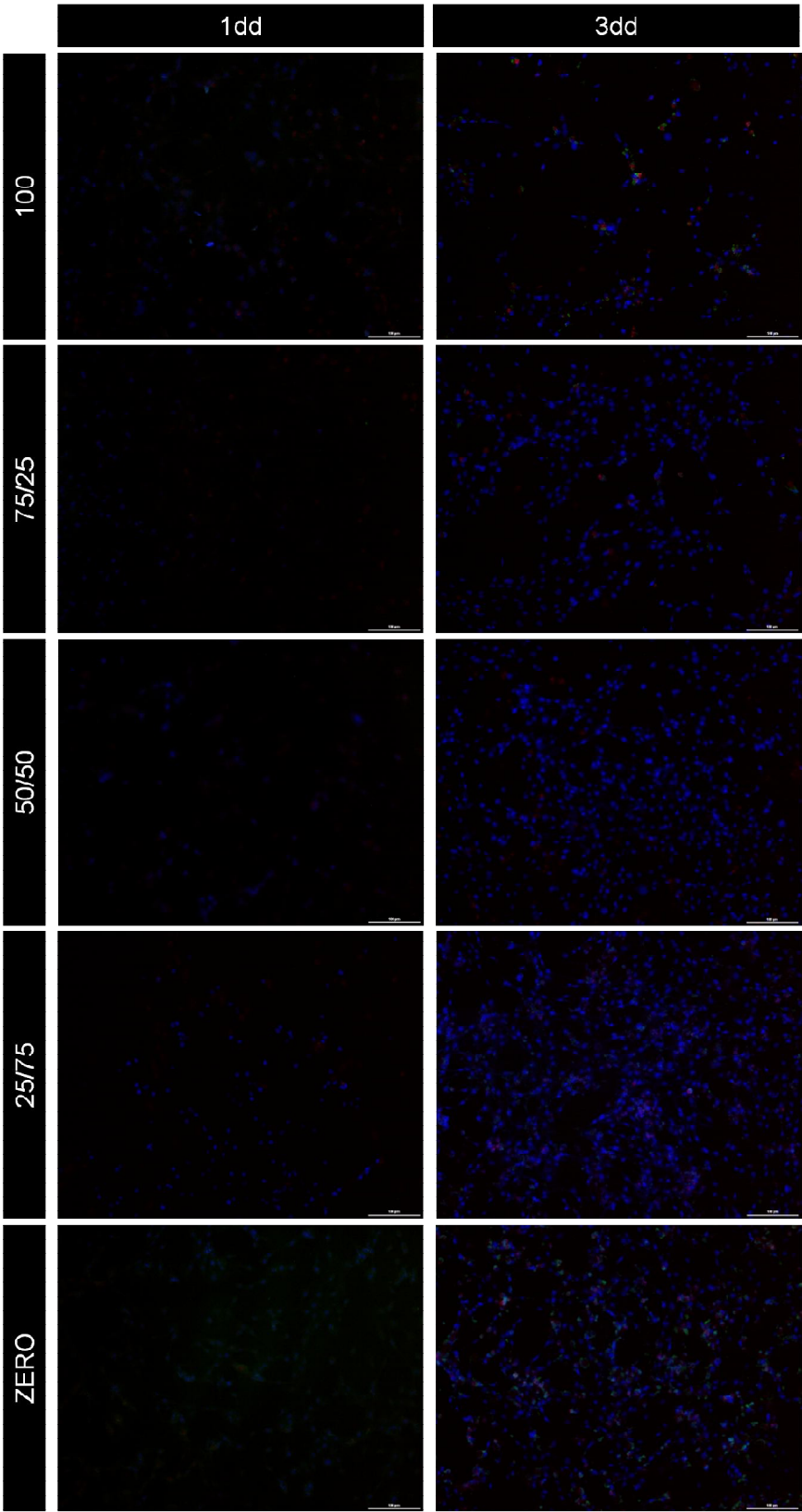


Figura 22: Microscopias de fluorescência de culturas celulares em diferentes meios de cultura após um e três dias. Barra de escala: 100µm.

4.4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

Para averiguar a presença de resíduos ou componentes estranhos ao polímero nas fibras FS, foi realizada análise química da estrutura de ambas as fibras. Apesar de tratarem-se do mesmo material, fibras FD e FS sofreram diferentes processamentos até sua obtenção, podendo assim apresentar diferentes resíduos após o processamento. Os espectros de infravermelho para ambas as fibras são apresentados na Fig 23.

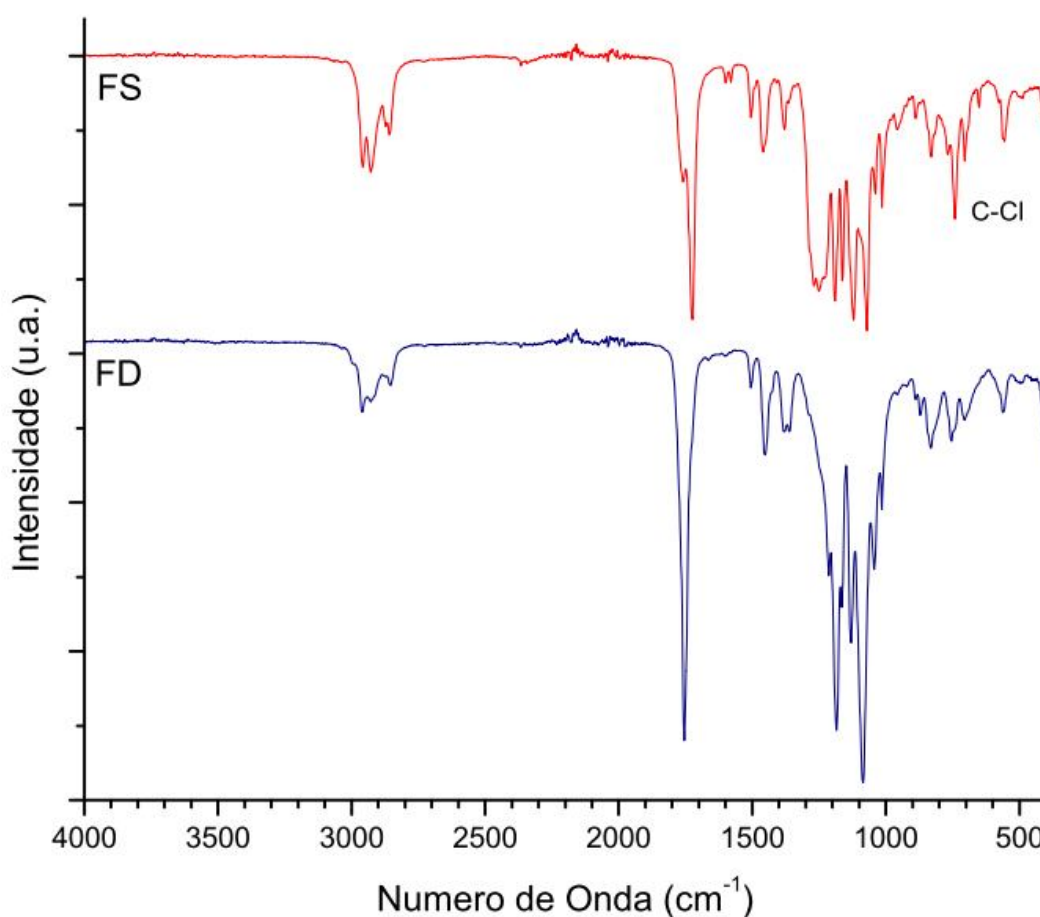


Figura 23: Espectro de infravermelho de fibras FD e FS.

Os dois espectros apresentaram um perfil similar ao previamente apresentado do FTIR da blenda. Pequenas variações de intensidade de bandas a aproximadamente 3000cm^{-1} e 1200cm^{-1} podem representar pequenas diferenças de estrutura da blenda após processamento, porém a

presença das mesmas bandas apresentadas pela blenda não levam a crer em alterações químicas majoritárias na estrutura polimérica.

Pandey e colaboradores reportaram que o uso de clorofórmio e radiação microondas para síntese de blendas de PLLA (Poli Ácido-L-Láctico) e PGA (Poli Ácido Glicólico) mostrou significativa variação na estrutura dos polímeros, com relação aos materiais iniciais (PANDEY et al., 2008). A absorção de C-Cl alifático do clorofórmio é observada em bandas fracas/moderadas entre $850\text{-}550\text{cm}^{-1}$, no entanto, quando vários átomos de cloro estão ligados a um mesmo átomo de carbono, como no caso do clorofórmio (triclorometano) as bandas são mais intensas e localizam-se no extremo de maior frequência dessa faixa (SILVERSTEIN et al., 2005). Para as fibras, foram observadas bandas a 700cm^{-1} , 756cm^{-1} e 840cm^{-1} . A banda a 700cm^{-1} não mostra variação de intensidade entre as fibras e a banda a 840cm^{-1} é sabidamente relativa a vibrações -C-H, uma vez que este grupamento se encontra na cadeia de ambos os polímeros da blenda. (JAHNO, 2005; SILVERSTEIN et al., 2005). Cabe então creditar a variação da intensidade do pico a 756cm^{-1} à presença de grupamentos C-Cl no material.

4.4.3. Calorimetria Exploratória Diferencial

As fibras FS e FD foram também submetidas a calorimetria exploratória diferencial (primeiro ciclo de aquecimento) para analisar possíveis diferenças nas transições vítreas dos polímeros, conforme termogramas apresentados na Fig. 24.

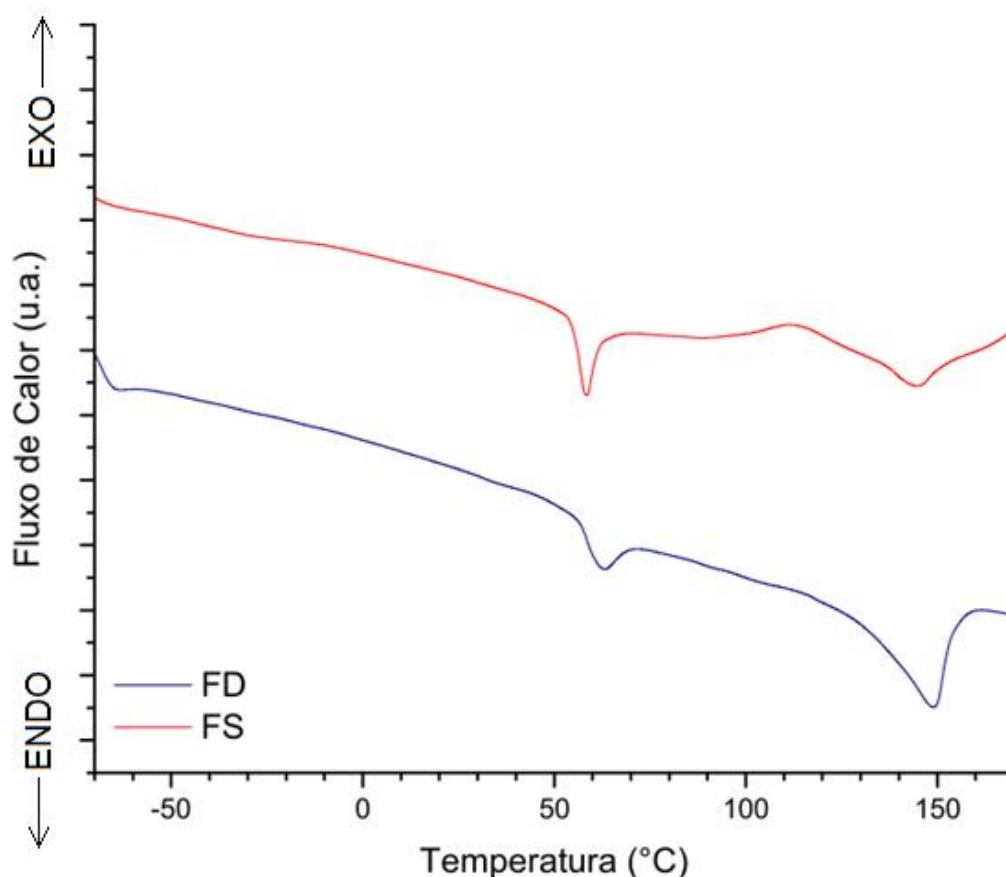


Figura 24: Termogramas de DSC de fibras FS e FD.

Apesar da presença de Poliisopreno nas fibras, estas mostraram um comportamento térmico muito próximo ao apresentado pelo PLGA puro. Tanto FS quanto FD apresentaram temperatura de transição vítrea perto dos 60°C e pico endotérmico relativo à temperatura de fusão cristalina a aproximadamente 150°C. A fibra FS também apresentou uma variação da linha base com formação de um pico exotérmico a aproximadamente 110°C, o que pode ser relacionado com a temperatura de cristalização do Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) (MARQUES, 2011). Estas diferenças no termograma das fibras quando comparado ao termograma da blenda levam a crer num aumento da cristalinidade do material após os processamentos de *electrospinning* ou gotejamento. Uma vez que ambos os processos usam a orientação do material dissolvido pela passagem do mesmo por um capilar, a reorganização do material prior à volatilização do solvente parece uma resposta plausível para o

aumento da organização das cadeias poliméricas por estiramento (ERO-PHILLIPS etl., 2012).

4.4.4. Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica das fibras foi realizada a fim de averiguar a presença de solventes ou umidade residual no material. Este método é usado com o mesmo intuito na indústria farmacêutica (GRODOWSKA & PARCZEWSKI, 2010). Os termogramas e suas respectivas derivadas estão apresentados na Fig. 25.

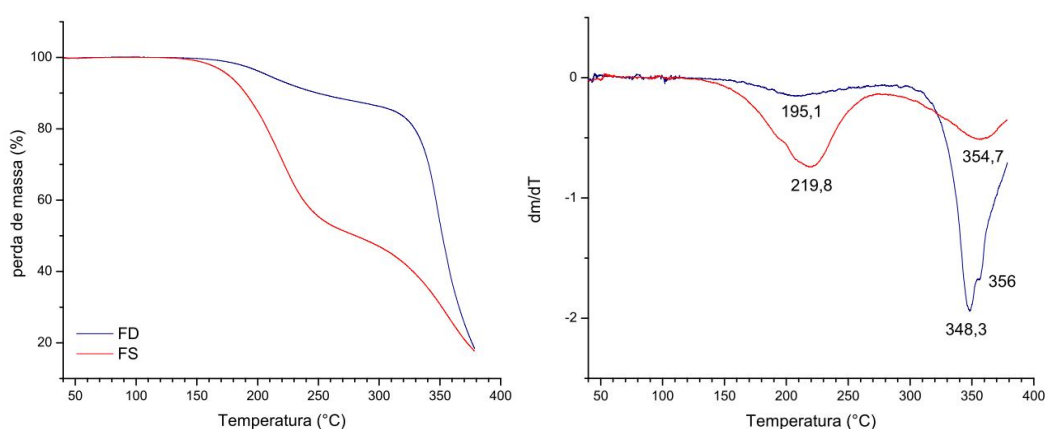


Figura 25: Curvas (a) TGA das fibras FS e FD e (b) derivadas das curvas TGA.

Embora apresentem temperaturas de degradação aproximadas, observa-se uma drástica diferença entre as curvas de fibras FD e FS. O termograma das fibras obtidas por gotejamento tem o exato perfil discutido para o termograma de TGA da blenda PLGA/PI, com perda pouco maior que 10% da massa total a 195,1°C e degradação total dos polímeros por volta de 350°C. Por outro lado, as fibras obtidas por *electrospinning* apresentam uma perda de quase 50% da massa total a 219,8°C, com gradativa degradação térmica até perda completa da massa em 354,7°C.

Alguns estudos reportam a perda alcoóis residuais, como etanol ou metanol, a 195°C. Alcoóis são utilizados em alguma etapa do processo para ambas as fibras analisadas. Porém, a presença destes em tamanha relevância seria facilmente percebida em espectro de infravermelho, uma vez que o grupamento hidroxila (-OH) gera uma banda larga entre 3200-3400cm⁻¹,

comportamento este ausente nos espectros apresentados anteriormente. Distorções deste gênero também estariam presentes caso a perda de massa a 219°C fosse relativa a umidade retida na fibra FS. Mesmo a temperatura de degradação estaria demasiado elevada para referir-se a perda de água encapsulada no polímero (DONG et al., 2010; GABBOTT, 2008; PETERSSON et al., 2007).

O único solvente com possível resíduo nas fibras é o clorofórmio. No entanto, o clorofórmio tem temperatura de ebulição de 61,2°C, o que não condiz com a temperatura de degradação apresentada no termograma de FS (JACOBS, 2006). No entanto, um estudo apresentando a produção de filmes de PLA com o uso de clorofórmio como solvente reporta o aprisionamento do triclorometano nos filmes, ocasionado por falhas no processo de volatilização. Nestas análise, o clorofórmio residual representava até 13% da massa total do material, como uma degradação térmica que se apresentou entre 90°C e 170°C (RASAL, 2009). As baixas temperaturas de processamento - não superiores a 40°C, a alta concentração de solvente e baixa concentração de polímero (3%) no material processado, a distância relativamente pequena entre saída do capilar e coletor em rotação, e a ausência de um tratamento de volatilização a vácuo ou por liofilização após *electrospinning* levam a crer que há clorofórmio encapsulado no interior das fibras. A presença de tal solvente é vista então como responsável pela morte das células musculares *in vitro*, bem como sobre a redução do crescimento celular nas culturas tratadas com meio MC-FS.

4.5. Caracterização *in vitro* - Fibras de Gotejamento

A engenharia de tecidos trata-se de um processo dinâmico no qual células do tipo certo precisam estar no local certo no momento certo, a fim de estabelecer um novo e funcional tecido. No entanto, a comunicação entre as células desempenha um papel crucial na proliferação, diferenciação e funcionalidade das mesmas (BOER et al., 2009). Para observar o comportamento de quatro linhagens celulares distintas semeadas sobre as fibra FD, a proliferação celular, a produção de DNA de cadeia dupla e o aspecto das células em função do tempo de cultura foram levados em

consideração. A determinação de quantidade de células usando coloração por Alamar Blue e a quantificação de dsDNA por método PicoGreen, bem como análise de formato e população celular por microscopia das células coloridas por azul de toluidina foram realizadas para células musculares-esqueléticas de rato (linhagem C2C12), fibroblastos dérmicos humanos (HDF), condrócitos primários bovinos, e carcinomas hepatocelulares humano (linhagem HepG2).

4.5.1. Mioblastos Murinos

Os resultados de determinação de quantidade celular, quantificação de DNA e imagens microscópicas da cultura de mioblastos de rato estão apresentados respectivamente nas figuras 26, 27 e 28. As observações foram realizadas a 1, 3, 7 e 14 dias após o início da cultura.

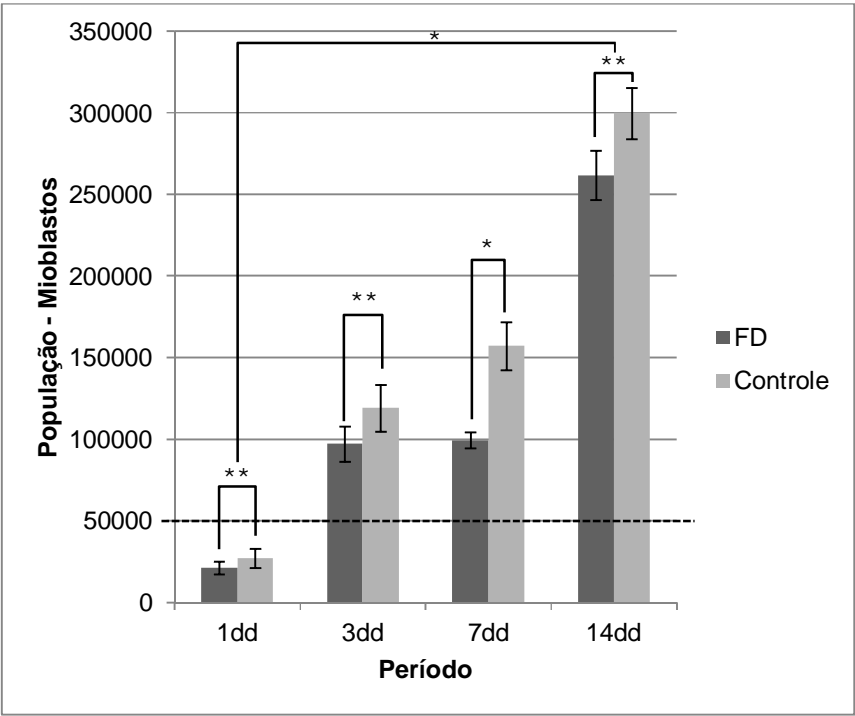


Figura 26: Determinação de quantidade celular de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).

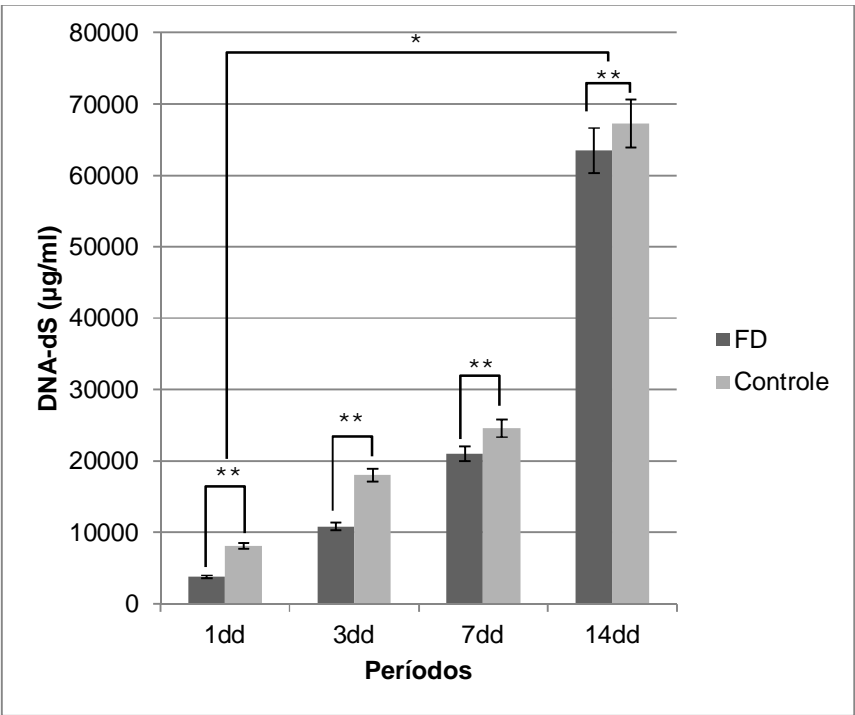


Figura 27: Determinação de quantidade de dsDNA de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).

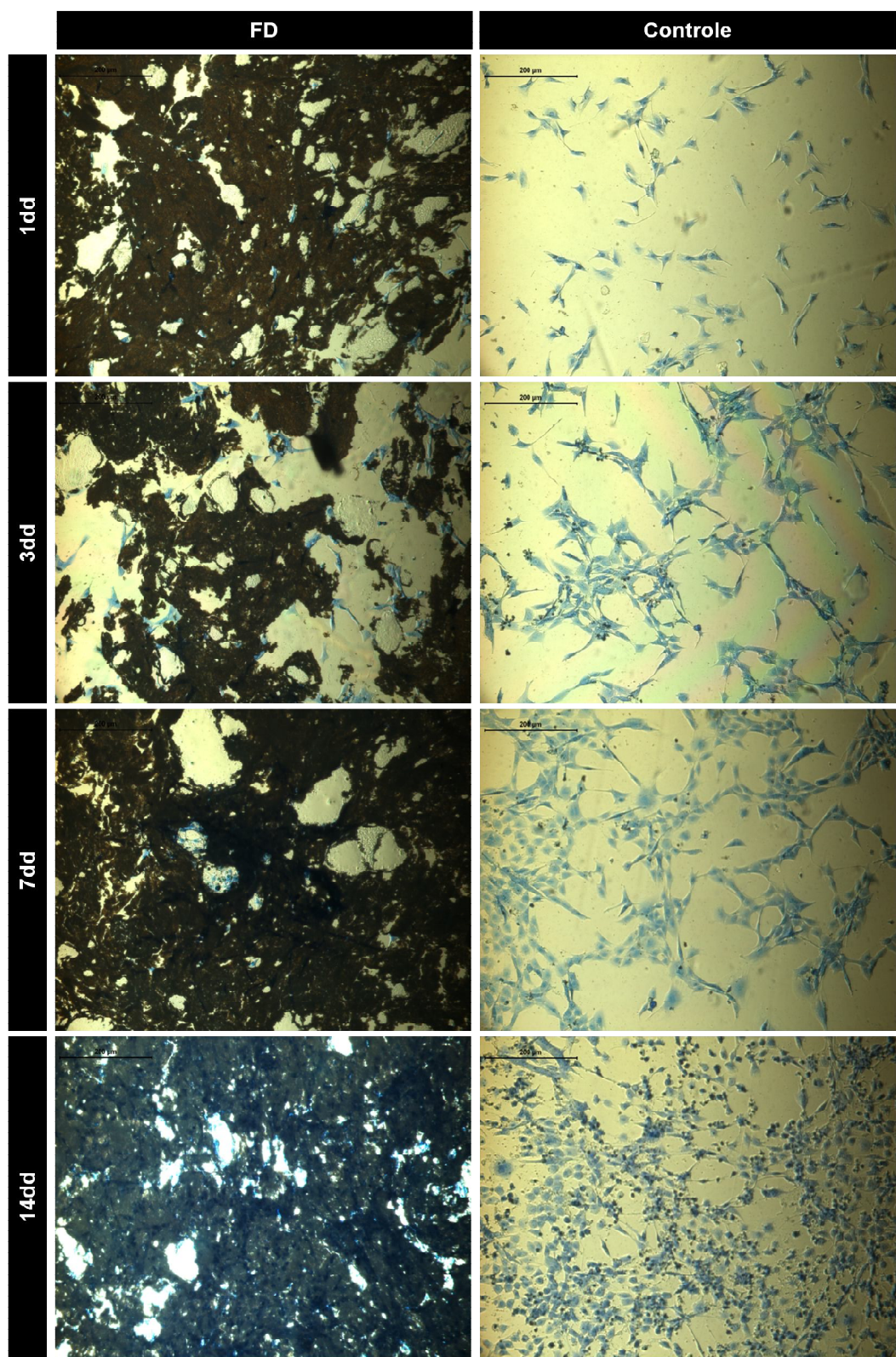


Figura 28: Microscopia óptica de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. Barra de escala: 200µm.

Em todos os períodos o grupo controle apresentou contagens ligeiramente mais elevadas que o grupo FD, tanto em determinação de quantidade populacional quanto em determinação de quantidade de DNA. No entanto, não existe diferença significativa entre os grupos na população e produção de DNA após 14 dias. Ambos grupos apresentam similar perfil de crescimento e a quantidade de células semeadas no dia zero é reestabelecida após três dias de cultura para ambos os grupos. A população celular aumenta significativamente a aproximadamente seis vezes nos grupos tratado e controle, quando observado o intervalo entre os dias 1 e 14. Tal proliferação pode ser observada nas microscopias ópticas das células em cultura.

A engenharia de tecido muscular esquelético tem sido extensivamente estudada como uma alternativa aos tratamentos de transferência de enxertos autógenos, alógenos ou mesmo xenógenos. No entanto, se aponta que *scaffolds* para crescimento muscular necessitam prioritariamente uma topografia alinhada paralelamente a fim de incentivar o desenvolvimento de fibras musculares imaturas, também conhecidas como miotubos. Além disso, a recriação de um tecido muscular depende de estímulo mecânico e elétrico *in vitro*, exposição de cultura a específicos fatores de crescimento, bem como uma eficiente vascularização e subsequente desenvolvimento de estrutura neural *in vivo* (BACH et al., 2004). A fusão dos mioblastos em miotubos se mostra efetiva em micro e nanofibras alinhadas devido a esta configuração topográfica e espacial, uma vez que a boa mobilidade das fibras sobre tal superfície tem efeito direto na morfologia, orientação e produção de matriz extracelular dos mioblastos (DUGAN et al., 2010).

No entanto, mesmo culturas em materiais sem estrutura organizada podem demonstrar o potencial de aplicação de uma matéria-prima na engenharia de tecidos musculares. Aviss e colaboradores (2010) compararam os níveis de crescimento de mioblastos em fibras de PLGA obtidas por *electrospinning* em diferentes velocidades de coleta rotacional. Foi observada uma diferença na morfologia das células em diferentes topografias fibrosas, uma vez que em fibras alinhadas as células apresentam um formato mais alongado, enquanto em fibras emaranhadas as células apresentam um formato mais poligonal, mesmo formato apresentado nas células do grupo controle

(discos de vidro). Apesar disso, a quantificação de células apresenta resultados semelhantes para ambas fibras, o que leva a crer que, no caso das fibras FD, uma alteração na topografia das fibras pode acarretar uma alteração significativa na morfologia celular e seu subsequente desenvolvimento em novo tecido (AVISS et al., 2010). *Scaffolds* a base agarose-gelatina-quitosana, mesmo não apresentando uma estrutura organizada para a diferenciação de miotubos, foram ditos como efetivos na engenharia de tecidos musculares. O crescimento dos mioblastos aos mesmos níveis do grupo controle indicaram este material como adequado para o desenvolvimento de músculos voltados a regeneração de tecidos cardíacos, uma vez que a porosidade adequada garante uma mobilidade celular efetiva e uma consequente produção de ECM (BHAT & KUMAR, 2012). Tais condições, similares às apresentadas pelas fibras FD, podem representar a adequação deste material a engenharia de tecidos cardíacos. O desenvolvimento de novos músculos também pode ser alcançado pela co-cultura de mioblastos e fibroblastos, atingindo sistemas mais complexos pela viabilidade de ambas linhagens no mesmo material (BACH et al., 2004).

A produção de matriz extracelular *in vitro* também pode ser um bom indicativo da aplicabilidade deste material no cultivo de mioblastos. Após o crescimento e proliferação inicial das células C2C12, a produção da ECM pode ser visualizada pela formação de filamentos ao redor da célula (BACH et al., 2004; BHAT & KUMAR, 2012). Tais filamentos podem ser observados nas setas indicativas da Fig. 29. A produção da matriz extracelular por esta linhagem está diretamente ligada à liberdade de locomoção das células na superfície da amostra. Apesar da sobreposição das células após 14 dias, é possível observar a formação destes filamentos, mesmo em áreas de alta confluência celular, indicando que as fibras FD, mesmo não fazendo uso das ideais condições topográficas, incentivam um crescimento e diferenciação efetivos dos mioblastos.

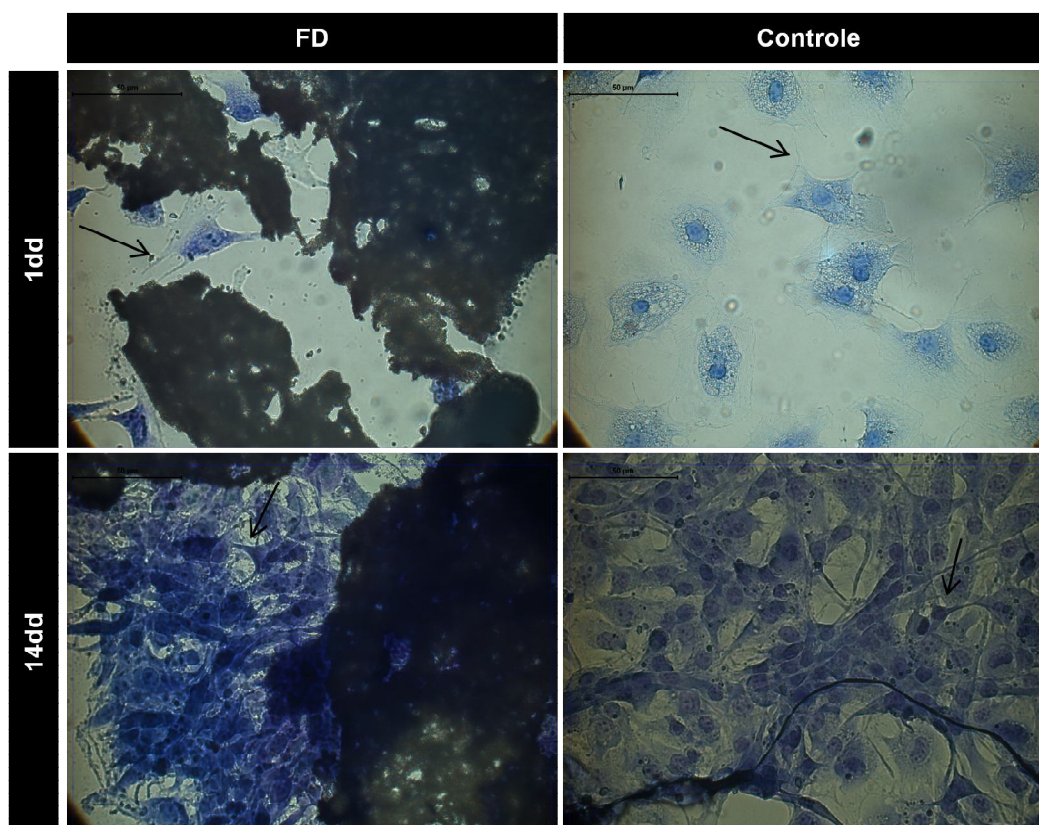


Figura 29: Microscopia óptica de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. Setas indicam formação de matriz extracelular. Barra de escala: 50 μ m.

4.5.2. Fibroblastos Dérmicos Humanos

Os resultados de determinação de quantidade celular, quantificação de DNA e imagens microscópicas da cultura de fibroblastos dérmicos humanos estão apresentados respectivamente nas figuras 30, 31 e 32. As observações foram realizadas a 1, 3, 7 e 14 dias após o início da cultura.

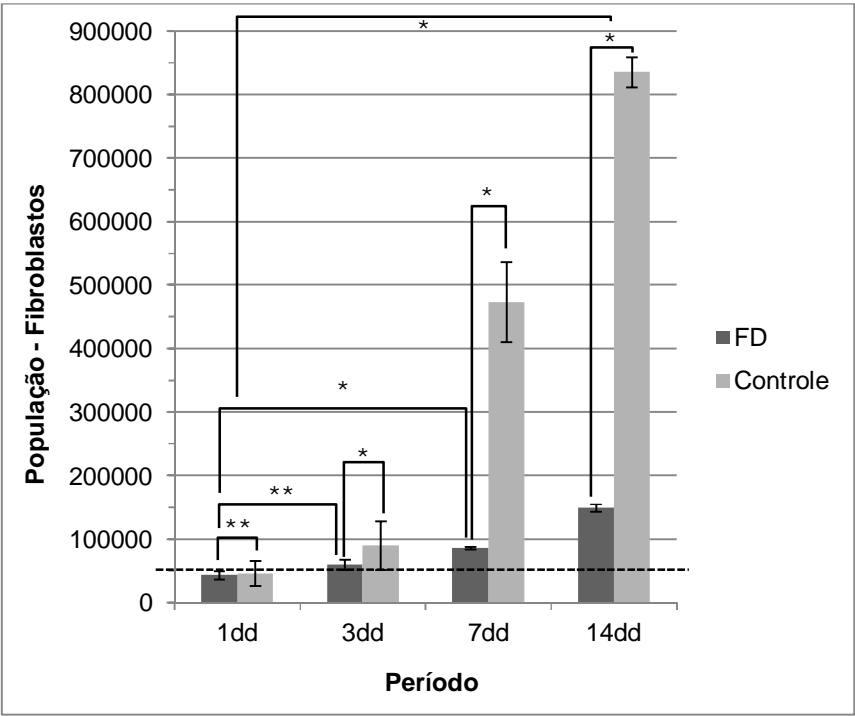


Figura 30: Determinação de quantidade celular de fibroblastos sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).

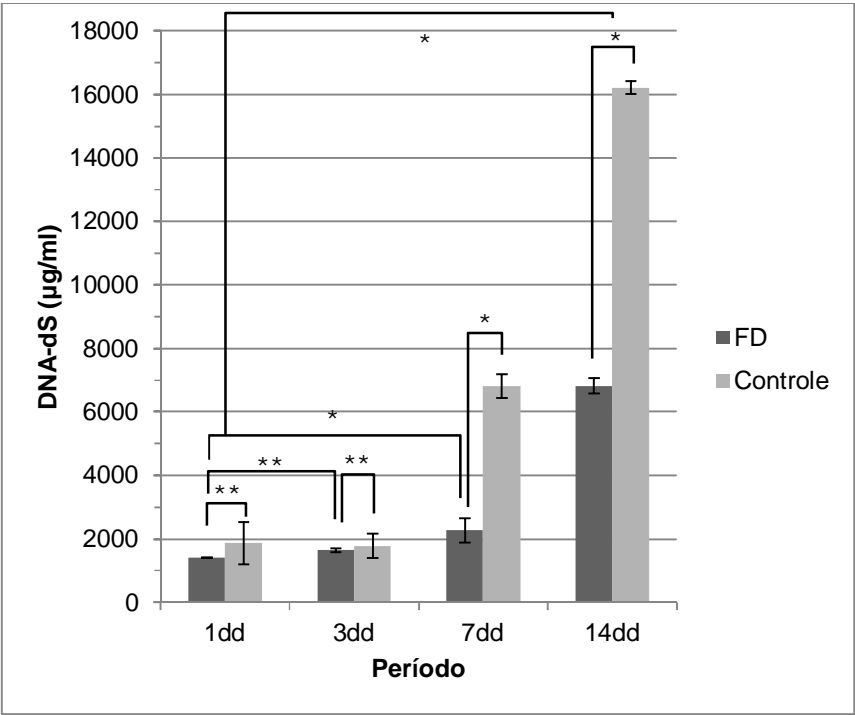


Figura 31: Determinação de quantidade de dsDNA de fibroblastos sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).

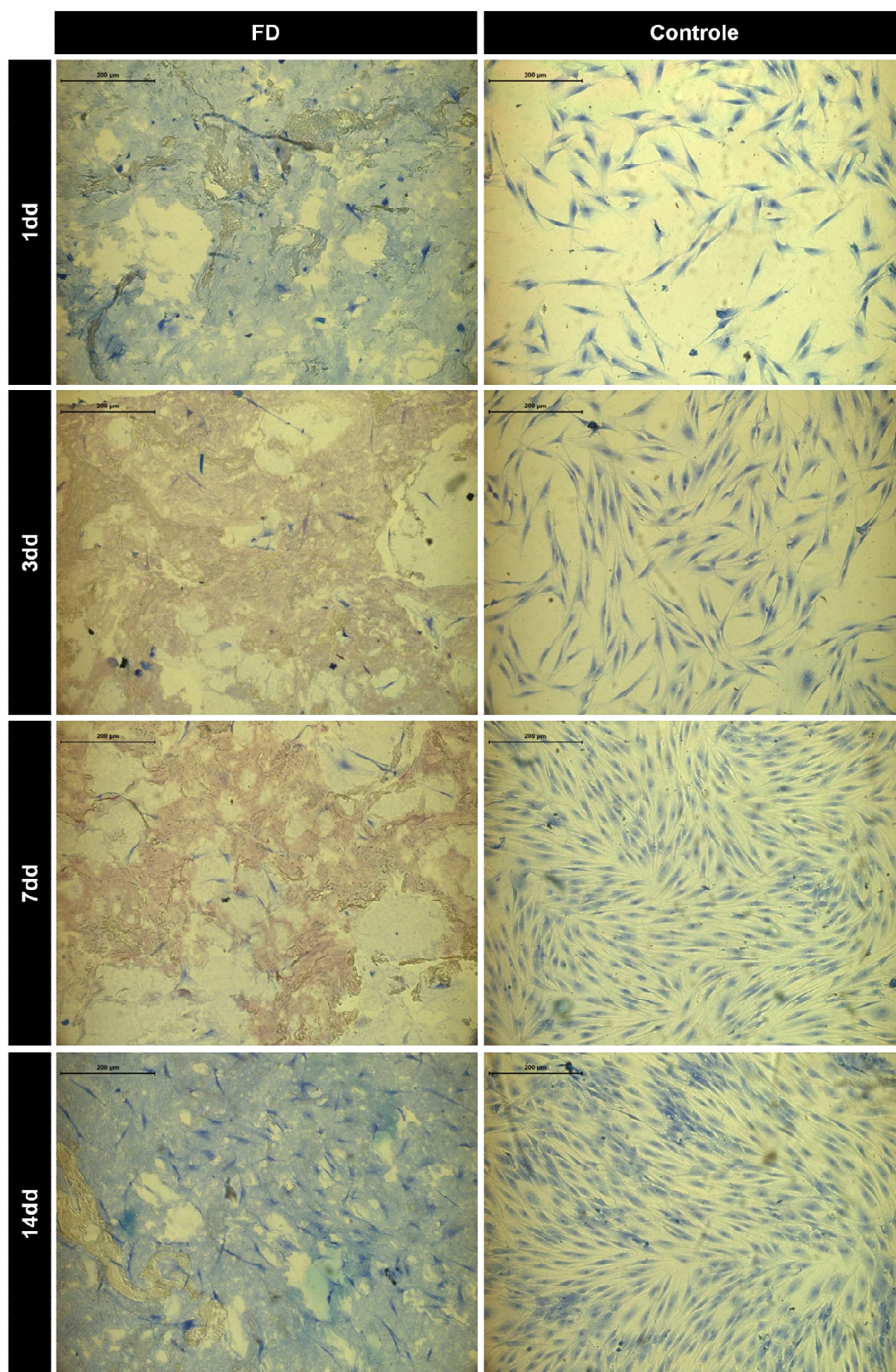


Figura 32: Microscopia óptica de fibroblastos sobre fibras FD e grupo controle. Barra de escala: 200µm.

Assim como observado na linhagem C2C12, as leituras de população e produção de DNA dos fibroblastos se mostram mais elevadas no grupo controle do que nas culturas sobre fibra FD, com reestabelecimento da população inicial após três dias. Porém, os perfis de crescimento dos grupos não se equiparam. Embora um crescimento significativo dos fibroblastos sobre as fibras seja observado após sete dias de cultura, no mesmo período a diferença entre grupo tratado e grupo controle já é significativa, comportamento este que se estende até os 14 dias. O último período de observação comparado ao dia 1 aponta um crescimento significativo da linhagem em ambos os grupos, no entanto a população celular no grupo controle ao fim de duas semanas é aproximadamente seis vezes maior do que a população observada no grupo tratado. Tal expressiva diferença na proliferação e diferenciação celular é observada claramente nas microscopias, onde é possível observar uma alta confluência dos fibroblastos no grupo controle após 7 dias, comportamento não observado nas culturas sobre fibras FD. No entanto, o formato alongado dos fibroblastos observado após três dias de cultura no grupo controle pode também ser observado após 14 dias de cultura sobre fibras FD, o que leva a crer que a cultura sobre as fibras retarde potencialmente o crescimento e diferenciação dos fibroblastos, embora não impeça tal conformação e consequente proliferação celular.

Estudos conduzidos com fibras de PLGA obtidas por *electrospinning* avaliaram a viabilidade deste material para substituição de ligamentos por engenharia de tecidos. O cultivo de fibroblastos foi submetido a topografias variadas, com fibras orientadas ou randômicas. Foi constatado que fibroblastos não apresentam sensibilidade à orientação das fibras, sendo que para um efetivo crescimento celular, os melhores resultados foram obtidos com fibras de maior diâmetro, principalmente por facilitar a ancoragem e permitir a proliferação celular. Pode ser ponderado que o desenvolvimento dos fibroblastos *in vitro* a um formato mais alongado caracteriza uma efetiva diferenciação celular, como observado nas microscopias apresentadas anteriormente (BASHUR et al., 2006).

A análise da cultura de fibroblastos também é conduzida pelo uso de hidrogéis como substrato. Isto se deve ao fato dos fibroblastos apresentarem

uma diferenciação facilitada em superfícies menos rígidas. Mesmo em ocasiões onde o crescimento celular não atinge o mesmo patamar dos grupos controle, os *scaffolds* são condicionados a estudos mais profundos. Isto se deve ao fato da proliferação celular apresentar um perfil de crescimento significativo ao fim de duas semanas, bem como a conformação da célula num formato mais alongado. Tal comportamento, apresentado nas culturas sobre fibras FD, embasa a viabilidade destas fibras em engenharia de tecidos, mesmo apresentando um crescimento retardado quando comparado ao grupo controle (JAYAWARNA et al., 2009; SANKAR et al., 2012; ZHOU et al., 2009).

Por ser naturalmente um tecido conectivo, o estudo com fibroblastos varia o foco de potencial aplicação entre tecidos epitelial, cartilagem, tendões e mesmo muscular (BASHUR et al., 2006; RNJAK-KOVACINA et al., 2012). A reconstrução da pele através da engenharia de tecidos, por exemplo, depende da presença de queratinócitos auto-renováveis e um funcional substituto dérmico consistido de componentes celulares e acelulares apropriados. Em outras palavras, um *scaffold* eficiente que minimize cicatrizes. Para tanto, o uso de fatores angiogênicos é essencial para garantir uma acelerada vascularização da área tratada (SUNDARAMURTHI et al., 2012). Como previamente dito, em aplicações *in vivo*, a blenda PLGA/PI foi relacionada com a formação de áreas apresentando intensa vascularização, uma vez implantada junto a tecidos ósseos (FALLER, 2012; KIM, 2012). É possível que este efeito seja proporcionado pela presença de PI natural no material, como previamente observado em outras aplicações (BALABANIAN et al., 2006; FRIOLANI, 2008; OLIVEIRA et al., 2003). Este fato pode indicar uma característica interessante para o uso da blenda enquanto substituto dérmico, apesar do retardamento no crescimento de fibroblastos observado.

4.5.3. Condrócitos Bovinos

Os resultados de determinação de quantidade celular, quantificação de DNA e imagens microscópicas da cultura de condrócitos bovinos estão apresentados respectivamente nas figuras 33, 34 e 35. As observações foram realizadas a 1, 3, 7 e 14 dias após o início da cultura.

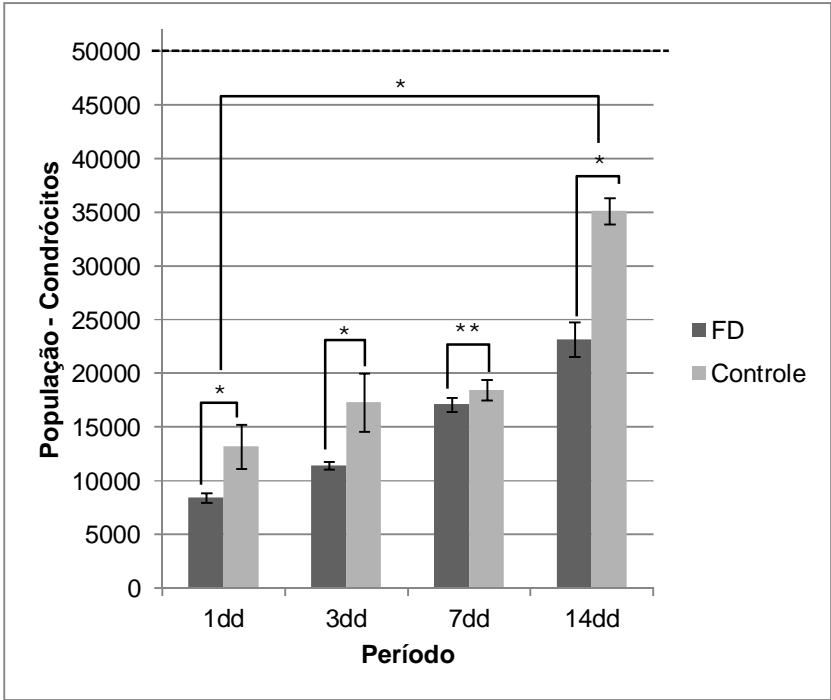


Figura 33: Determinação de quantidade celular de condrócitos sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).

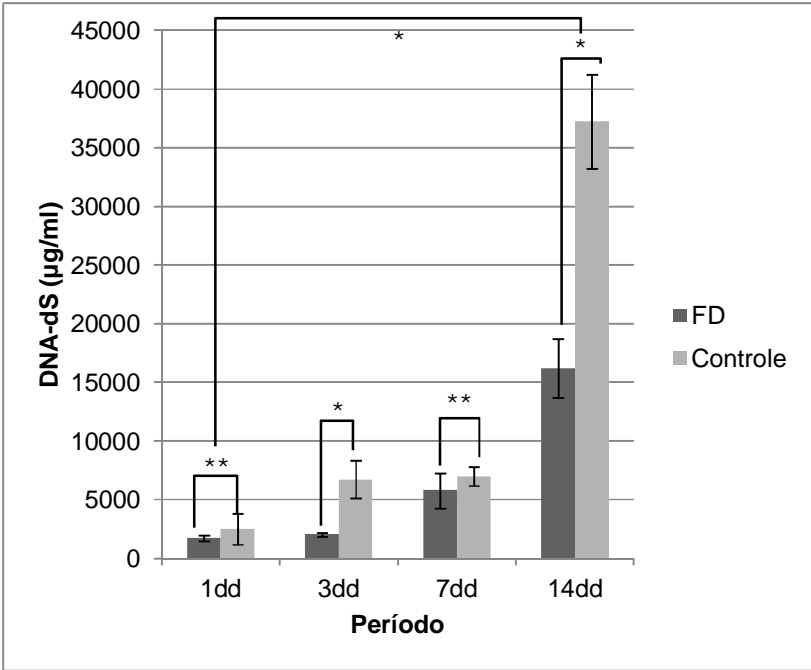


Figura 34: Determinação de quantidade de dsDNA de condrócitos sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).

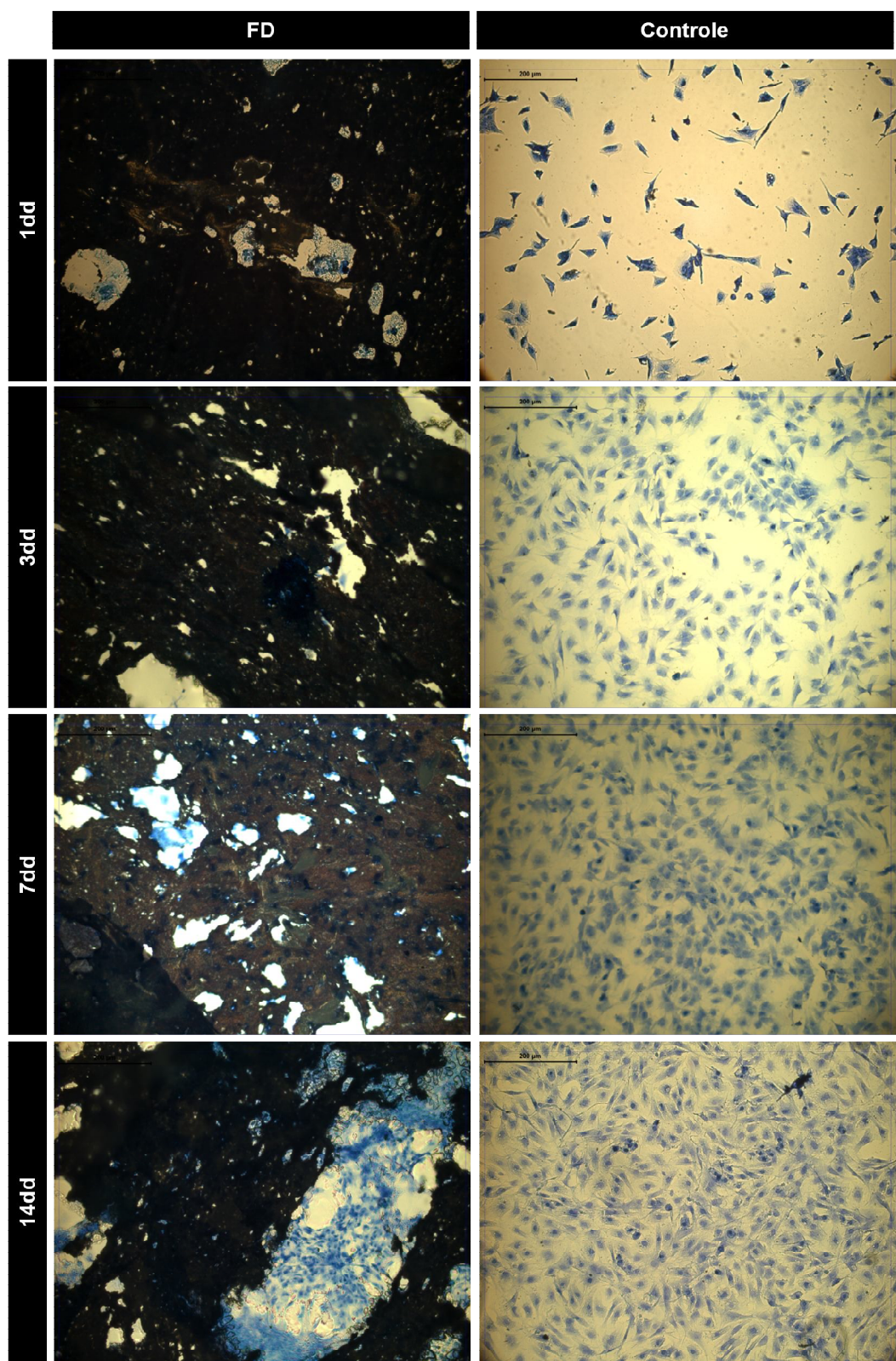


Figura 35: Microscopia óptica de condrócitos sobre fibras FD e grupo controle. Barra

Mesmo após 14 dias de cultura, nenhum dos grupos reestabeleceu a população celular de 5×10^4 células/poço, semeada no dia zero. As leituras de crescimento celular e produção de dsDNA é mais elevada no grupo controle em todos os períodos observados, sendo que apenas após sete dias a diferença entre controle e tratado não é significativa. No entanto, mesmo em menor escala, o perfil de proliferação de condrócitos sobre as fibras é similar ao apresentado por esta linhagem no grupo controle, tendo um crescimento significativo após sete e 14 dias de cultura. A presença abundante de células nestes períodos é observado nas microscopias ópticas de ambos grupos controle e tratado, sendo que neste último a camada celular se prolifera tanto sobre a fibra FD quando nos espaços internos deste material.

A cultura, adesão e proliferação *in vitro* de condrócitos apresenta duas características específicas: esta linhagem celular apresenta melhor proliferação em substratos menos rígidos, e tal proliferação não se dá em curtos períodos de observação. O uso de substratos a base de hidrogéis de alginato, de compostos de micro e nanofibras de Poli (Ácido D-L-Láctico), ou mesmo de matriz extracelular cartilaginosa natural desidratada conduzem a tal conclusão (JAYAWARNA et al., 2009; LAU et al., 2012; WIMPENNY et al., 2012). Isso se deve ao fato dos condrócitos, quando removidos de sua matriz extracelular natural e cultivados *in vitro*, pararem de expressar significativamente o colágeno tipo II. Uma vez que esta linhagem celular receba fatores de crescimento específicos pelo meio de cultura, condrócitos retomam seu processo de diferenciação e reiniciam a expressão de colágeno II (JUKES et al., 2009). Tal fenômeno explica o fato de nenhum dos grupos retomarem a determinação de quantidade inicial, mesmo após 14 dias de cultura. No entanto, este crescimento reduzido não representa necessariamente um problema na cultura de condrócitos. A proliferação rápida tende a ser associada a este fenômeno de de-diferenciação e consequente perda do potencial condrogênico do tecido em formação. É pois importante que, para culturas em substrato fibroso, as células apresentem uma adesão e proliferação contínua, mesmo que em velocidade reduzida, uma vez que a topografia dos *scaffolds* para cultivo de condrócitos não necessita de uma orientação (WIMPENNY et al., 2012).

Outro efeito da cultura *in vitro* sobre o condrócito esta no formato da célula. Enquanto esta linhagem apresenta um formato arredondado em sua conformação natural, o cultivo destes induz, na ausência dos devidos fatores de crescimento, a diferenciação destas células a um formato alongado, parecido com fibroblastos (JAYAWARNA et al., 2009). Como observado nas microscopias, este comportamento está presente nos condrócitos bovinos em todos os períodos. No entanto, a ausência de fatores de crescimento no meio utilizado induzem tal comportamento em ambos grupos tratado e controle. O perfil crescente na população celular e na determinação de quantidade de dsDNA induzem, por sua vez, que os condrócitos apresentam potencial de proliferação nestes *scaffolds*, tomando seu tempo para diferenciar, indicando a viabilidade deste material para engenharia de tecidos cartilagosos (TALLHEDEN, 2009).

4.5.4. Hepatocarcinomas Humanos

Os resultados de determinação de quantidade celular, quantificação de DNA e imagens microscópicas da cultura de hepatocarcinomas humanos estão apresentados respectivamente nas figuras 36, 37 e 38. As observações foram realizadas a 1, 3, 7 e 14 dias após o início da cultura.

Devido à baixa disponibilidade de fígado para transplantes, as terapias de reposição hepática surgem como alternativa. Porém, as dificuldades de gerar tecido hepático a partir de hepatócitos humanos ou murinos primários impede os avanços da engenharia de tecidos nesta área, principalmente devido à baixa capacidade de proliferação deste hepatócitos. O cultivo de carcinomas hepáticos das linhagens HepG2 ou Sv40 surge como uma alternativa positiva para remodelagem destes tecidos, uma vez que podem ser cultivados e proliferados em grandes quantidades, mesmo não apresentando as funções comumente observadas em hepatócitos maduros. Há de se observar previamente as análises *in vivo* que tratam-se de células de natureza cancerígena, usadas atualmente com o exclusivo intuito de simular as respostas hepáticas (BETTINGER et al., 2006; HODGES et al., 2009).

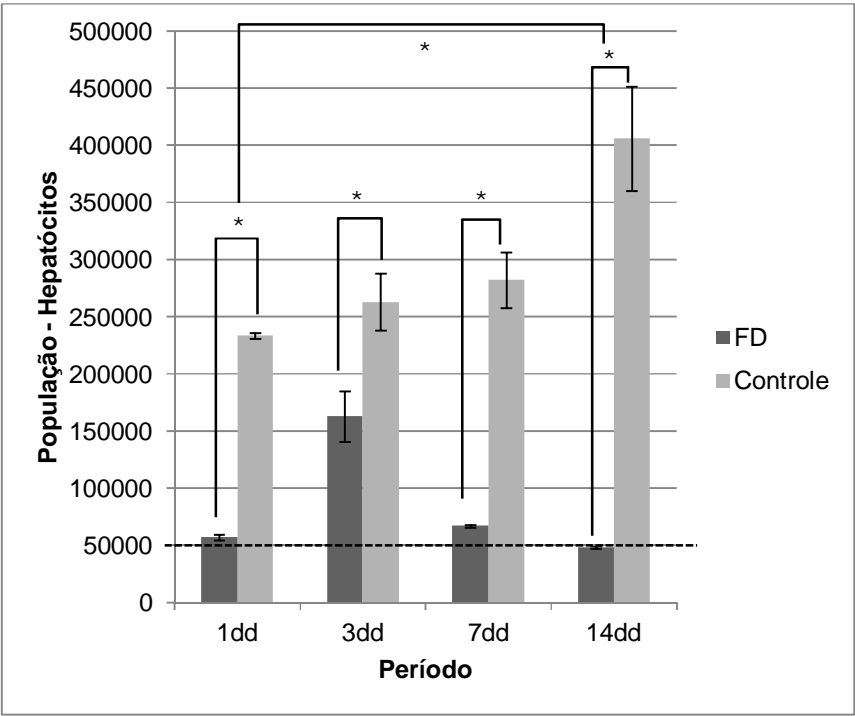


Figura 36: Determinação de quantidade celular de hepatocarcinomas sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).

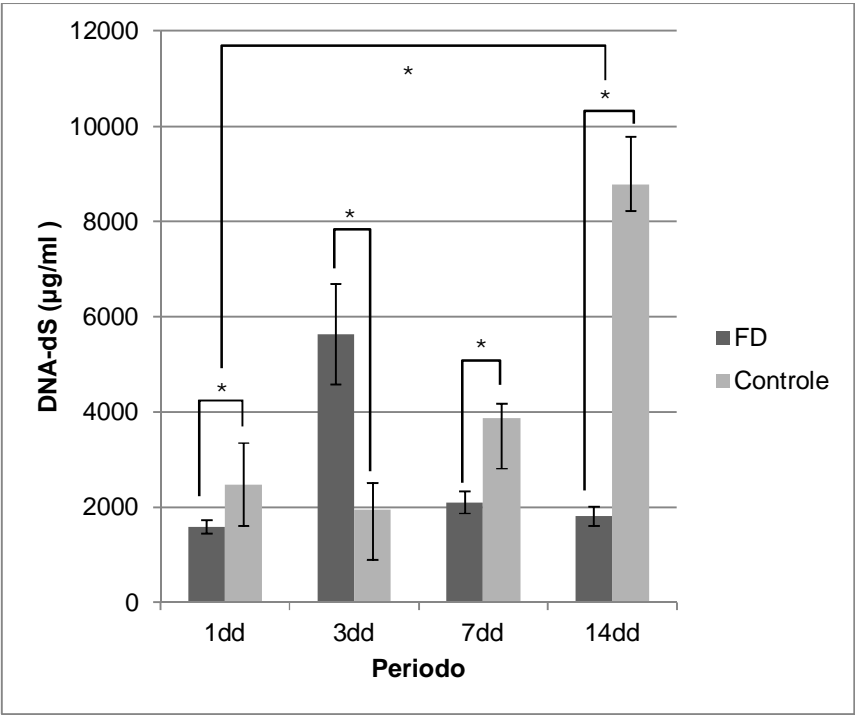


Figura 37: Determinação de quantidade de dsDNA de hepatocarcinomas sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).

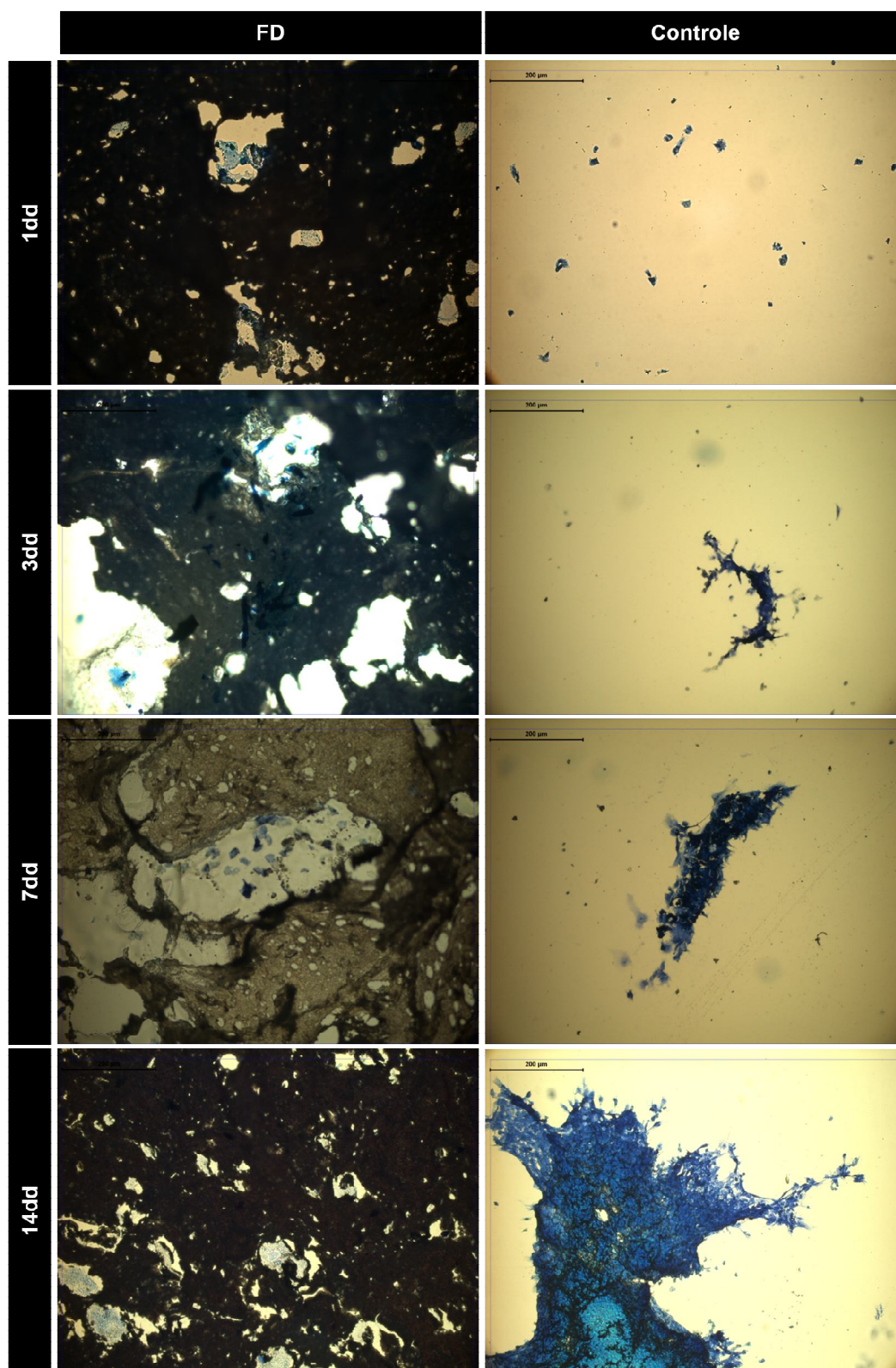


Figura 38: Microscopia óptica de hepatocarcinomas sobre fibras FD e grupo controle. Barra de escala: 200µm.

Carcinomas da linhagem HepG2 se adaptam *in vitro* em formato de colônias, permitindo uma ótima comunicação e adesão entre as células, além do fechamento de espaços entre células, sinalização química e produção de matriz extracelular. Fatores com efeito sobre o ambiente celular tem poder de controle sobre o tamanho, formato e população dessas colônias (KULIG & VACANTI, 2004). Estudos bem sucedidos envolvendo fibras emaranhadas de seda recobertas com quitosana e lactide, obtidas por *electrospinning*, revelaram a formação de colônias hepáticas circulares, características de hepatócitos funcionais. Apesar da topografia fibrosa dos *scaffolds*, os diâmetros de fibras se apresentaram em torno de 150nm, o que permitiu a movimentação dos hepatocarcinomas e sua subsequente formação de colônias hepaticamente ativas e funcionais (KASOJU & BORA, 2012). Outra abordagem ao cultivo de HepG2 trata da obtenção de fibras de quitosana-alginato com esta linhagem celular encapsulada na estrutura, num processamento chamado *spinning* de microfluidos. Pelo cultivo de um número expressivo de células nas fibras, foi mantida a viabilidade destas por período de sete dias. Pelo controle da densidade celular foi possível um controle sobre a localização espacial das HepG2 nas fibras. Apesar de não apresentar as células em colônia, este método foi reportado como uma resposta inovadora à aplicação de culturas celulares guiadas, transferência de células para terapias celulares e/ou *scaffolds* para engenharia de tecidos (LEE et al., 2011).

Na análise dos hepatocarcinomas sobre fibras FD, houve o reestabelecimento da população semeada após um dia de cultura em ambos grupos. No entanto, as leituras de população e DNA foram significativamente inferiores no grupo tratado em todos os períodos. A diferença mais drástica de comportamento das células HepG2 quando comparadas às outras linhagens foi o perfil de crescimento apresentado nas culturas sobre fibras FD. Enquanto o grupo controle apresenta expressivo crescimento já no primeiro dia e mantém um significativo crescimento após duas semanas, a cultura sobre fibras apresenta um crescimento expressivo após três dias e inicia uma redução populacional. Tal perfil de mortalidade das células se mantém após sete e 14 dias, sendo que no último período a determinação de quantidade celular atinge população menor que a observada no primeiro dia. Nas microscopias ópticas

do grupo controle é possível deduzir uma mobilidade das células, formando conglomerados em pontos distintos. Uma das amostras do grupo controle caracterizadas por coloração em Toluidina Azul apresentou todas as células no mesmo ponto da amostra. O grupo tratado, por sua vez, apresenta as células distribuídas esparsamente sobre as fibras, sem formação de colônias, sendo que após 14 dias de cultura é possível observar a presença de poucas células. Sendo a formação de colônias essencial para a diferenciação e proliferação das células HepG2, é possível que a topografia das fibras dificultem a mobilidade celular a curto prazo e conseqüentemente reduza a população celular, o que leva a crer que as fibras FD não são uma alternativa atrativa para a engenharia de tecidos hepáticos.

Conclusões

A blenda polimérica a base de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno (Cellprene®) foi obtida por solubilização dos polímeros em solventes orgânicos com posterior volatilização do solvente. A caracterização química por FTIR e RMN ¹H indicam que o processo de solubilização não ocasiona alteração na estrutura química dos polímeros. A caracterização por DSC sugere a imiscibilidade parcial dos polímeros constituintes da blenda, ainda que as temperaturas de degradação térmica se mostram na mesma região de acordo com análise termogravimétrica. Caracterização das propriedades mecânicas da blenda apontam um comportamento mais dúctil com deformação majoritariamente plástica, efeito este provocado pela presença de PI no material. Apesar da alteração nas propriedades mecânicas, o ensaio de molhabilidade mostrou uma característica levemente hidrofílica para ambos materiais puros e blenda.

Fibras de PLGA/PI com morfologias distintas foram obtidas por processo de gotejamento e *electrospinning*. Enquanto fibras de *electrospinning* apresentaram uma orientação paralela entre elas, as fibras de gotejamento apresentaram uma topografia randomicamente orientada. O processo de *electrospinning* gerou fibras FS de menor diâmetro, menor espaço entre fibras e consequentemente menor porosidade nos *scaffolds* conformados. Por sua vez, o processo de gotejamento gerou fibras FD mais espessas, mas com maior tamanho de poros e, efetivamente, maior porosidade nos *scaffolds* conformados. Ensaio mecânicos dos *scaffolds* apontam que para fibras FS existe a demanda por maiores tensões num menor deslocamento para iniciar a deformação permanente do arcaço, enquanto fibras FD podem deformar aproximadamente três vezes mais que fibras FS antes do início da deformação plástica. Apesar das distintas propriedades mecânicas apresentadas, os valores de módulo observados levam a crer que ambas fibras FD e FS são passíveis de sucesso quando aplicadas à regeneração de tecidos moles.

A caracterização preliminar das fibras em cultura de mioblastos murinos apontou um bom crescimento nas fibras FD, enquanto as fibras FS apresentaram total ausência de células nos períodos observados. Uma investigação do efeito dessas fibras sobre o meio de cultura mostram que a exposição do meio às fibras FS tem influência na lise celular observada. Caracterização físico química apontou a presença de clorofórmio residual no interior das fibras, o que acarretou a morte celular e inviabilidade dos *scaffolds* FS na engenharia de tecidos, quando obtidos por esta metodologia.

Por sua vez, as fibras obtidas por gotejamento apresentaram um perfil de crescimento adequado nas culturas de mioblastos, fibroblastos e condrócitos. Porém, sua inviabilidade foi observada quando cultivados hepatocarcinomas da linhagem HepG2. Para mioblastos murinos, a adesão, proliferação e diferenciação apresentou-se diretamente comparável ao observado no grupo controle. Alteração da topografia fibrosa para uma estrutura alinhada pode caracterizar a viabilidade deste material para engenharia de tecidos musculares esqueléticos. Em cultura de fibroblastos não foi observada uma inviabilidade, mas sim o retardamento na proliferação celular. Por fim, a cultura de condrócitos apresentou perfil de crescimento significativamente similar ao grupo controle até o sétimo dia. Sugere-se que a presença de fatores de crescimento nas fibras podem indicar uma diferenciação efetiva do condrócitos para formação de tecido cartilaginoso.

Sugestões de Trabalhos Futuros

Buscando complementar os estudos sobre a blenda desenvolvida neste trabalho, visando sua aplicação como arcabouço na engenharia de tecidos, sugerem-se os seguintes temas a serem estudados:

- Obtenção de fibras de Cellprene® orientadas por método de gotejamento;
- Estudo de arcabouços fibrosos de Cellprene® obtidos por *electrospinning* e submetidos a secagem;
- Estudo de arcabouços fibrosos tridimensionais de Cellprene®;
- Estudo de arcabouços de Cellprene® em co-cultura de fibroblastos e mioblastos para geração de sistemas muscular complexos;
- Estudo de arcabouços de Cellprene® em co-cultura de fibroblastos e condrócitos para geração de sistemas cartilaginosos complexos;
- Adição de fatores de crescimento ao Cellprene® e avaliação de seu efeito *in vitro*;
- Análise da degradação *in vitro* do Cellprene® em fluido corporal simulado (SBF);
- Estudo de arcabouços de Cellprene® em cultura de células-tronco mesenquimais sob ação de fatores de diferenciação;
- Estudo de arcabouços de Cellprene® *in vivo*.

Referências Bibliográficas

ALMANY; L. & SELIKTAR, D. (2005) Biosynthetic Hydrogel *Scaffolds* Made From Fibrinogen and Polyethylene Glycol for 3D Cell Cultures. *Biomaterials*. 26. p. 2467-2477.

AKCELRUD, L. (2007) *Fundamentos da Ciências dos Polímeros*. Barueri: Editora Manole.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *ASTM D2702-05*: Standard Practice for Rubber Chemicals - Determination of Infrared Absorption Characteristics. 4 p. 2011.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *ASTM D3418-03*: Standard Test Method for Transition Temperatures and Enthalpies of Fusion and Crystallization of Polymers by Differential Scanning Calorimetry. 7 p. 2003.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *ASTM D3850-12*: Standard Test Method for Rapid Thermal Degradation of Solid Electrical Insulating Materials By Thermogravimetric Method (TGA). 4 p. 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *ASTM D5296-97*: Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. 14 p. 1997.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. *ASTM F2259-10*: Standard Test Standard Test Method for Determining the Chemical Composition and Sequence in Alginate by Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) Spectroscopy. 5 p. 2012.

AMNUAYPORNTRI, S.; SAKDAIPANICH, J.; TAKANA, Y. (2010) Highly Purified Natural Rubber by Saponification of Latex: Analysis of Green and Cured Properties. *Journal of Applied Polymer Science*. 118. p. 3524-3531.

ANNUNZIATA, L.; DUC, M.; CAPENTIER, J. F. (2011) Chain Growth Polymerization of Isoprene and Stereoselective Isoprene - Styrene Copolymerization Promoted by an *ansa*-Bis(indenyl)allyl - Yttrium Complex. *Macromolecules*. 44. p. 7158-7166.

APABOR. (2010) *Histórico da Borracha*. [Online] Disponível em: <http://www.apabor.org.br/sitio/historia/historico.htm>. [Acesso em: 23 abr. 2010].

ARAÚJO, M. A. P. N. F. (2005) *Avaliação do Processo de Degradação de Misturas Termoplásticas à Base de Amido de Milho*. 288 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia, Universidade de Minho, Braga.

ASHJARI, M.; KHOEE, S.; MAHDAVIAN, A. R.; RAHMATOLAHZADEH, R. (2012) Self-Assembled Nanomicelles Using PLGA–PEG Amphiphilic Block Copolymer for Insulin Delivery: a Physicochemical Investigation and Determination of CMC Values. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 23. p. 943-953.

AVISS, K. J.; GOUGH, J. E.; DOWNES, S. (2010) Aligned Electrospun Polymer Fibres for Skeletal Muscle Regeneration. *European Cells and Materials*. 19. p. 193-204.

BACH, A. D.; BEIER, J. P.; STERN-STAETER, J.; HORCH, R. E. (2004) Skeletal Muscle Tissue Engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 8 (4). p. 413-422.

BALABANIAN, C. A., COUTINHO-NETTO, J.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; LACERDA, S. A.; BRENTAGANI, L. G. (2006) Biocompatibility of Natural Latex Implanted Into Dental Alveolus of Rats. *Journal of Oral Science*. 48. p. 201-205.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. (2004) Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 15 (1). p. 13-21.

BARSAM, M. F.; BITAR, R. C.; MAZZER, N.; BARBIERI, C. H.; NETO, J. B. (2003) Reação Tecidual Induzida pelos Implantes de Silicone e de Polímero da Mamona Usados como Espaçadores de Tendão: Estudo Experimental Comparativo. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 38 (5). p. 291-300.

BASHUR, C. A.; DAHLGREN, L. A.; GOLDSTEIN, A. S. (2006) Effect of Fiber Diameter and Orientation on Fibroblast Morphology and Proliferation on Electrospun Poly(D , L -Lactic-co-Glycolic Acid) Meshes. *Biomaterials*. 27. 5681-5688.

BASSI, A. K.; GOUGH, J. E.; ZAKIKHANI, M.; DOWNES, S. (2011) The Chemical and Physical Properties of Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds Functionalised with Poly(vinyl phosphonic acid-co-acrylic acid). *Journal of Tissue Engineering*. 2. p. 1-9.

BASTIEN, R. (2009) *Fabrication of 3D-porous scaffolds by Rapid Prototyping Method*. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona.

BEN-NISSAN, B.; MILEV, A.; VAGO, R. (2004) Morphology of Sol–Gel Derived Nano-Coated Coralline Hydroxyapatite. *Biomaterials*. 25. p. 4971-4975.

BERTOL, L. S. (2008) Contribuição ao Estudo da Prototipagem Rápida, Digitalização Tridimensional e Seleção de Materiais no Design de Implantes Personalizados. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BETTINGER, C. J.; WEINBERG, E. J.; KULIG, K. M.; VACANTI, J. P.; WANG, Y.; BORENSTEIN, J. T.; LANGER, R. (2006) Three-Dimensional Microfluidic Tissue-Engineering Scaffolds Using a Flexible Biodegradable Polymer. *Advanced Materials*. 18. p. 165-169.

BHAT, S. & KUMAR, A. (2012) Cell Proliferation on Three-Dimensional Chitosan - Agarose - Gelatin Cryogel Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 114 (6). p. 663-670.

BHAT, S.; TRIPATHI, A.; KUMAR, A. (2011) Supermacroporous Chitosan-Agarose-Gelatin Cryogels: *In vitro* Characterization and *In vivo* Assessment for Cartilage Tissue Engineering. *Journal of the Royal Society Interface*. 8. p. 540-544.

BOER, J.; GHALBZOURI, A.; D'AMORE, P.; HIRSCHI, K.; ROUWKEMA, J.; BEZOOIJEN, R.; KAPERIEN, M. (2009) Cellular Signaling. In BLITTERSWIJK, C. (ed.) *Tissue Engineering*. Amsterdam: Elsevier Inc.

BONINO, C. A.; KREBS, M. D.; SAQUING, C. D.; JEONG, S. I.; SHEARER, K. L.; ALSBERG, E.; KHAN, S. A. (2011) *Electrospinning* Alginate-Based Nanofibers: From Blends To Crosslinked Low Molecular Weight Alginate-Only Systems. *Carbohydrate Polymers*. 85. p. 111-119.

BRANDÃO, M. L.; COUTINHO-NETTO, J.; THOMAZINI, J. A.; LACHAT, J. J.; MUGLIA, V. F.; PICCINATO, C. E. (2007) Prótese Vascular Derivada do Látex. *Jornal Vascular Brasileiro*. 6 (2). p. 130-141.

BRYDSON, J. A. (1988) *Rubbery Materials and Their Compounds*. New York: Elsevier Science Publisher.

CANEVAROLO JR, S. V. (2002) *Ciência dos Polímeros*. São Paulo: Artliber Editora.

CANEVAROLO JR, S. V. (2003) *Técnicas de Caracterização de Polímeros*. São Paulo: Artliber Edirtora.

CARTMELL, S. (2009) Controlled Release *Scaffolds* for Bone Tissue Engineering. *Journal of Pharmaceutical Science*. 98. p. 430-441.

CHAN, P. K. (2006) Effect of Concentration Gradient on the Thermal-Induced Phase Separation Phenomenon in Polymer Solutions. *Modelling and Simulation in Materials Science Engineering*. 14. p. 41-51.

CHÁVEZ, F. V. & SAALWÄTCHER, K. (2011) Time-Domain NMR Observation of Entangled Polymer Dynamics: Universal Behavior of Flexible Homopolymers and Applicability of the Tube Model. *Macromolecules*. 44. p. 1549-1559.

CHEN, F & QIAN, J. (2002) Studies on the Thermal Degradation of cis-1,4-polyisoprene. *Fuel*. 81 (16). p. 2071-2077.

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. (2013) Elastomeric Biomaterials for Tissue Engineering. *Progress in Polymer Science*. 38. p. 584-671.

CHOU, P. M.; MARIATTI, M.; ZULKIFLI, A.; TODO, M. (2011) Changes in the Crystallinity and Mechanical Properties of Poly(L-Lactic Acid)/Poly(Butylene Succinate-co-L Lactate) Blend With Annealing process. *Polymer Bulletin*. 67. p. 815-830.

CIBULKOVÁ, Z.; POLOVKOVÁ, J.; LUKES, V.; KLEIN, E. (2006) DSC and FTIR Study of the Gamma Radiation Effect on cis-1,4-Polyisoprene. *Journal Of Thermal Analysis And Calorimetry*. 84 (3). p. 709-713.

CIESIELSKI, A. (1999) *An Introduction to Rubber Technology*. Shawbury: Rapra Technology Limited.

DEHGHANI F. & ANNABI, N. (2011) Engineering Porous *Scaffolds* Using Gas-Based Techniques. *Current Opinion in Biotechnology*. 22. 661-666.

DI ROCCO, F.; ARNAUD, E.; MEYER, P.; SAINTE-ROSE, C.; RENIER, D. (2009) Focus Session on the Changing "Epidemiology" of Craniosynostosis (Comparing Two Quinquennia: 1985-1989 and 2003-2007) and its Impact on the Daily Clinical Practice: a Review from Necker Enfants Malades. *Childs Nervous System*. 25(7). p. 807-811.

DONG, X. C.; ZHANG, Q. L.; FENG, Y.; XING, Z.; ZHAO, J. R. (2010) Preparation and Properties of Isobutylene-Isoprene Rubber Containing Multifunctional Groups. *Iranian Polymer Journal*. 19 (10). p. 771-779.

DORNELLES, R. F. V.; CARDIM, V. L.; MARTINS, M. T.; PINTO, A. C. C. F.; ALONSO, N. (2010) Spring-Mediated Skull Expansion: Overall Effects in Sutural and Parasutural Areas: An Experimental Study in Rabbits. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 25 (2). p. 169-175.

DUGAN, J. M.; GOUGH, J. E.; EICHHORN, S. J. (2010) Directing the Morphology and Differentiation of Skeletal Muscle Cells Using Oriented Cellulose Nanowhiskers. *Biomacromolecules*. 11. p. 2498-2504.

DUGAN, J. M. (2011) *Cellulose Nanowhiskers for Tissue Engineering Skeletal Muscle*. 159 f. Tese (Doutorado) – School of Materials, University of Manchester, Manchester.

DUMON, J. F. (1990) A Dedicated Tracheobronchial *Stent*. *Chest*. 97 (2). p. 328-332.

ENGLER, J. A.; GRIFFIN, M. A.; SEN, S.; BÖNNEMANN, C. G.; SWEENEY, H. L.; DISCHER, D. E. (2004) Myotubes Differentiate Optimally on Substrates With Tissue-Like Stiffness: Pathological Implications for Soft or Stiff Microenvironments. *Journal of Cell Biology*. 166 (6). p. 877-887.

EOSOLY, S.; VRANA, N. E.; LOHFELD, S.; HINDIE, M.; LOONEY, L. (2012) Interaction of Cell Culture With Composition Effects on the Mechanical Properties of Polycaprolactone-Hydroxyapatite *Scaffolds* Fabricated Via Selective Laser Sintering (SLS). *Materials Science and Engineering C*. 32. p. 2250-2257.

ERO-PHILLIPS, O.; JENKINS, M.; STAMBOULIS, A. (2012) Tailoring Crystallinity of Electrospun PLLA Fibres by Control of *Electrospinning* Parameters. *Polymers*. 4. p. 1331-1348.

FALLER, G. J. (2012) *Desenvolvimento e Uso de Mola Absorvível para Expansão Craniana em Coelhos*. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FOUAD, H.; ELSARNAGAWY, T.; ALMAJHDI, F. H.; KHALIL, K. A. (2013) Preparation and *In vitro* Thermo-Mechanical Characterization of Electrospun PLGA Nanofibers of Soft and Hard Tissue Replacement. *International Journal of Electrochemical Science*. 8. p. 2293-2304.

FRIOLANI, M. (2008) *Utilização de Membrana de Látex de Seringueira (Hevea brasiliensis) em Lesões Diafragmáticas de Coelhos: Estudo Experimental*. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FU, S. Z.; NI, P. Y.; WANG, B. Y.; CHU, B. Y.; PENG, J. R.; ZHENG, L.; ZHAO, X.; LUO, F.; WEI, Y. Q.; QIAN, Z. Y. (2012) *In vivo* Biocompatibility and Osteogenesis of Electrospun Poly(ϵ -Caprolactone) - Poly(Ethylene Glycol) - Poly(ϵ -Caprolactone) / Nano-Hydroxyapatite Composite Scaffold. *Biomaterials*. 33. p. 8363-8371.

GABBOTT, P. (2008) *Principles and Applications of Thermal Analysis*. New Dheli: Blackwell Publishing Ltd.

GENTILE, P.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; CHIONO, V.; FERRETTI, C.; BAINO, F.; TONDA-TURO, C.; VITALE-BROVARONE, C.; PASHKULEVA, I.; REIS, R. L.; CIARDELLI, G. (2012) Bioactive Glass/Polymer Composite Scaffolds Mimicking Bone Tissue. *Journal of Biomedical Materials Research*. 100A(10). p. 2654-2667.

GRODOWSKA, K. & PARCZEWSKI, A. (2010) Analytical Methods for Residual Solvents Determination in Pharmaceutical Products. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 67 (1). p. 13-26.

GU, B.; CAO, Y.; DU, Q.; YANG, Y. (1999) Morphology of Fibers Formed Via Thermally Induced Phase Separation of Polypropylene and Liquid Paraffin Blend in Stress-Field. *Polymer Bulletin*. 43. p. 291-296.

GU, W. Y.; HUANG, C. Y.; YAO, H.; CHEUNG, H. S. (2003) New Insight Into Deformation Dependent Hydraulic Permeability of Gels and Cartilage, and Dynamic Behaviour of Agarose Gels in Confined Compression. *Journal of Biomechanics*. 36. p. 593–598.

GUIMARÃES-FERREIRA, J.P.S.; GEWALLI, F.; DAVID, L.; MALTESE, G.; HEINO H.; LAURITZEN, C. (2002) Calvarial Bone Distraction With a Contractile Bioresorbable Polymer. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 109 (4). P. 1325-1331.

GUPTA, B.; PATRA, S.; RAY, A. R. (2012) Preparation of Porous Polycaprolactone Tubular Matrix by Salt Leaching Process. *Journal fo Applied Polymer Science*. 126. p. 1505-1510.

HALL, W. J.; ZAKARIA, N.; WILLIAMS, P. T. (2008) Pyrolysis of Latex Gloves in the Presence of Y-zeolite. *Waste Management*. p.797-803.

HAN, Y.; JIN, X.; YANG, J.; FAN, Z.; LU, Z.; ZHANG, Y.; LI, S. (2012) Totally Bioresorbable Composites Prepared From Poly(L-Lactide)-co-(Trimethylene Carbonate) Copolymers and Poly(L-Lactide)-co-(Glycolide) Fibers as Cardiovascular *Stent* Material. *Polymer Engineering and Science*. p. 741-750.

HE, L.; LIAO, S.; QUAN, D.; MA, K.; CHAN, C.; RAMAKRISHNA, S.; LU, J. (2010) Synergistic Effects of Electrospun PLLA Fiber Dimension and Pattern on Neonatal Mouse Cerebellum C17.2 Stem Cells. *Acta Biomaterialia*. 6. p. 2960-2969.

HELEN, W. & GOUGH, J. E. (2008) Cell Viability, Proliferation and Extracellular Matrix Production of Human Annulus Fibrosus Cells Cultured Within PDLLA/Bioglass Composite Foam *Scaffolds in vitro. Acta Biomaterialia*. 4. p.230-243.

HIDALGO-BASTIDA, L. A. & CARTMELL, S. (2010) Mesenchymal Stem Cells, Osteoblasts and Extracellular Matrix Proteins: Enhancing Cell Adhesion and Differentiation for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering: Part B*. 16 (4). p. 405-412.

HODGES, S.; FREY, P.; ATALA, A. (2009) Tissue Engineering of Organ Systems. In BLITTERSWIJK, C. (ed.) *Tissue Engineering*. Amsterdam: Elsevier Inc.

HONG, J. K. & MADIHALLY, S. V. (2011) Next Generation of Electrosprayed Fibers for Tissue Regeneration. *Tissue Engineering: Part B*. 17 (2). p. 125-142.

HOQUE, M. E.; CHUAN, Y. L.; PASHBY, I. (2011) Extrusion Based Rapid Prototyping Techniques: an Advanced Platform for Tissue Engineering *Scaffold Fabrication. Biopolymers*. 97. p. 83-93.

IAFISCO, M.; PALAZZO, B.; ITO, T.; OTZUKA, M.; SENNA, M.; DELGADO-LÓPEZ, J. G.; GOMEZ-MORALES, J.; TAMPIERI, A.; PRAT, M.; RIMONDINI, L. (2012) Preparation of Core–Shell Poly(L-Lactic) Acid-Nanocrystalline Apatite Hollow Microspheres for Bone Repairing Applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 23 (11). p. 2659-2669.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *ISO 527-1: Plastics – Determination of Tensile Properties*. 16 p. 1995.

IONESCU, A.; ALAMINOS, M.; CARDONA, J. C.; DURÁN, J.D.; GONZÁLEZ-ANDRADES, M.; HINEA, R.; CAMPOS, A.; HITTA, E.; PÉREZ, M. M. (2011) Investigating a Novel Nanostructured Fibrin–Agarose Biomaterial for Human Cornea Tissue Engineering: Rheological Properties. *Journal Mechanical Behavior in Biomedical Materials*. 4. p. 1963-1973.

ISOTALO, T. M.; NUUTINE, J. P.; VAAJANEN, A.; MARTIKAINEN, P. M.; LAURILA, M.; TÖRMÄLÄ, P.; TALJA, M.; TAMMELA, T. L. (2005) Biocompatibility Properties of a New Braided Biodegradable Urethral *Stent*: a Comparison With a Biodegradable Spiral and a Braile *Metallis Stent* in THE Rabbit Urethra. *British Journal of Urology Internacional*. 97. p. 856-859.

JACOBS, A. N. (2012) *Monitoring the Molecular Weight of Poly(Lactic Acid) During Fiber Spinning and Coloration*. 51 f. Dissertação (Mestrado) – Kansas State University, Manhattan.

JAHNO, V. D. (2005) *Síntese e Caracterização de Poli (L-Ácido Láctico) para Uso como Biomaterial*. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

JÄRSTRÖM, J.; VÄISÄNEN, M.; LEHTO, R.; JÄSBERG, A.; TIMONEN, J.; PELTONEN, J. (2010) Effect of Latex on Surface Structure and Wetting of Pigment Coatings. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 353. P. 104-116.

JAYAWARNA, V.; RICHARDSON, S. M.; HIRST, A. R.; HODSON, N. W.; SAIANI, A.; GOUGH, J. E.; ULIJN, R. V. (2009) Introducing Chemical Functionality in Fmoc-Peptide Gels for Cell Culture. *Acta Biomaterialia*. 5. p. 934-943.

JEONG, Y.; KIM, D. H.; CHUNG, C. W.; YOO, J. J.; CHOI, K. H.; KIM, C. H.; HA, S. H.; KANG, D. H. (2012) Self-Assembled Nanoparticles of Hyaluronic Acid/Poly(DL -Lactide-co-Glycolide) Block Copolymer. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 90. p. 28-35.

JIAN, B. T. & CHAN, P. K. (2007) Effect of Concentration Gradient on the Morphology Development in Polymer Solutions Undergoing Thermally Induced Phase Separation. *Macromolecular Theory and Simulation*. 16. p. 690-702.

JIN, H. J.; CHIN, I. J.; KIM, M. N.; KIM, S. H.; YOON, J. S. (2000) Blending of Poly (L-Lactic Acid) with Poly (cis-1,4-Isoprene). *European Polymer Journal*. 36. p. 165-169.

JOHN, J.; SURIYAKALA, R.; THOMAS, S.; MENDEZ, J. M.; PIUS, A.; THOMAS, S. (2010) Morphology, Mechanical and Thermal Properties of Nano-Structured Full IPNs Based on Polyisoprene and PMMA. *Journal of Materials Science*. 45. p. 2892-2901.

JUKES, J.; BOTH, S.; POST, J.; BLITTERSVIJK, C.; KARPERIEN, M.; BOER, J. (2009) Stem Cells. In BLITTERSWIJK, C. (ed.) *Tissue Engineering*. Amsterdam: Elsevier Inc.

KADLA, J. & KUBO, S. (2003) Lignin-Based Polymer Blends: Analysis Of Intermolecular Interactions In Lignin-Synthetic Polymer Blends. *Composites: Part A*. 35 p. 395-400.

KALASKAR, D. M.; GOUGH, J. E.; ULIJN, R. V.; SAMPSON, W. W.; SCURR, D. J.; RUTTEN, F. J.; ALEXANDER, M. R.; MERRY, C. L. R.; EICHHORN, S. J. (2008) Controlling Cell Morphology on Amino Acid-Modified Cellulose. *Soft Matter*. 4. p. 1059-1065.

KANE, J. B.; TOMPKINS, M.; YARMUSH, M. L.; BURKEE, J. F. (1996) Burn Dressings. In RATNER, D. B. (ed.) *Biomaterials Science*. San Diego: Academic Press.

KASOJU, N. & BORA, U. (2012) Silk Fibroin Based Biomimetic Artificial Extracellular Matrix for Hepatic Tissue Engineering Applications. *Biomedical Materials*. 7. 045004 (12 p.).

KIM, B. S. & MOONEY, D. J. (1998) Development of Biocompatible Synthetic Extracellular Matrices for Tissue Engineering. *TIBTECH*. 16. p. 224-230.

KIM K.; YU, M.; ZONG, X.; CHIU, J.; FANG, D.; SEO, Y. S.; HSIAO, B. S.; CHU, B.; HAGJIARGYROU, M. (2003) Control of Degradation Rate and Hydrophilicity in Electrospun Non-Woven Poly(D,L -lactide) Nanofiber *Scaffolds* for Biomedical Applications. *Biomaterials*. 24. p. 4977-4985.

KIM, J. H. (2012) *Estudo Experimental Comparativo da Histotoxicidade Entre o Copolímero de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) e a Blenda Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) / Poliisopreno*. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. (2005) Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie-International*. 44. p. 3358-3393.

KLÖPPFER, W. (1984) *Introduction to Polymer Spectroscopy*. Frankfurt: Springer-Verlag.

KOLAR, J. (2011) An epidemiological study of nonsyndromal craniosynostoses. *Journal of Craniofacial Surgery*. 22. p. 47-49.

KRUGER, E. A.; IM, D. D.; BISCHOFF, D. S.; PEREIRA, C. T.; HUANG, W.; RUDKIN, G. H.; YAMAGUCHI, D. T.; MILLER, T. A. (2011) *In vitro* Mineralization of Human Mesenchymal Stem Cells on Three-Dimensional Type I Collagen Versus PLGA Scaffolds: A Comparative Analysis. *Plastic and Reconstructive Surgery Journal*. 127 (6). p. 2301-2311.

KULIG, K. M. & VACANTI, J. P. (2004) Hepatic Tissue Engineering. *Transplant and Immunology*. 12. p. 303-310.

LACKMAN, M. (2011) *Latex or Lycra? Facts behind the fibers*. [Online] Disponível em: http://organicclothing.blogs.com/my_weblog/2006/08/latex_or_lycra_.html [Acesso em: 17 mai. 2011].

LAU, T. T.; LEE, L. Q. P.; VO, B. N.; SU, K.; WANG, D. A. (2012) Inducing Ossification in an Engineered 3D *Scaffold*-Free Living Cartilage Template. *Biomaterials*. 33. p. 8406-8417.

LEE, B. R.; LEE, K. H.; KANG, E.; KIM, D. S.; LEE, S. H. (2011) Microfluidic Wet Spinning of Chitosan-Alginate Microfibers and Encapsulation of HepG2 Cells in Fibers. *Biomicrofluidics*. 5. 022208 (9p.).

LEVY-MISHALI, M.; ZOLDAN, J.; LEVENBERG, S. (2009) Effect of *Scaffold* Stiffness on Myoblast Differentiation. *Tissue Engineering: Part A*. 15 (4). p. 935-944.

LEWIS, M., MUDERA, V., CHEEMA, U.; SHAH, R. (2009) Muscle Tissue Engineering. In MEYER, U. (ed) *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin: Springer.

LIPS, P. A. M.; VELTHOEN, I. W.; DIJKSTRA, P. J.; WESSLING, M.; FEIJEN, J. (2005) Gas Foaming of Segmented Poly(Ester Amide) Films. *Polymer*. 46. p. 9396-9403.

LIU, X.; WON, Y.; MA, P. X. (2006) Porogen-Induced Surface Modification of Nano-Fibrous Poly(L-Lactic Acid) *Scaffolds* For Tissue Engineering. *Biomaterials*. 26. p. 3980-3987.

LOPES, R. A. M. (2002) *Exposição Ocupacional E Hipersensibilidade Ao Látex Nos Trabalhadores Das Equipes De Enfermagem E Médica Da Uti Neonatal De Um Hospital Universitário*. 93 f. Dissertação (Mestrado) –Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LORDAN, S.; KENNEDY, J. E.; HIGGINBOTHAM, C. L. (2011) Cytotoxic Effects Induced by Unmodified and Organically Modified Nanoclays in the Human Hepatic HepG2 Cell Line. *Journal of Applied Toxicology*. 31. p. 27-35.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. (2001) *Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*. Rio de Janeiro: e-Papers Serviços Editoriais.

LUNT, J. (1998) Large Scale Production, Properties and Commercial Applicationbs of Polylactic Acid Polymers. *Polymer Degradation and Stability*. 59. p.145-152.

MA, P. X. & ZHANG. R. (2001) Microtubular Architecture of Biodegradable Polymer Scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*. 56. p. 469-477.

MALASKAR, D. M.; GOUGH, J. E.; ULIJN, R. V.; SAMPSON, W. W.; SCURR, D. J.; RUTTEN, F. J.; ALEXANDER, M. R.; MERRY, C. L. R.; EICHHORN, S. J. (2008) Controlling Cell Morphology on Amino Acid-Modified Cellulose. *Soft Matter*. 4. p. 1059-1065.

MANO, E. B. (1999) *Polímeros como Materiais de Engenharia*. São Paulo: Editora Edgard Blücher.

MARQUES, D. R. (2011) *Obtenção e Caracterização de Blendas Poliméricas de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno para Aplicação como Biomaterial*. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MARQUES, D. R.; DOS SANTOS, L. A.; SOUSA, V. C.; SANCHES, P. R. S.; MACEDO NETO, A. V. (2011) Blendas Poliméricas de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno. *Número de Registro de Patente: 0000221010682444*.

MARQUES, D. R.; DOS SANTOS, L. A.; SCHOPF, L. F.; FRAGA, J. C. S. (2013) Analysis of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) / Poly (Isoprene) Polymeric Blend for Application as Biomaterial. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 23 (5). p. 579-584.

MARTEL-ESTRADA, S. A.; OLIVAS-ARMENDÁRIZ, I.; MARTÍNEZ-PÉREZ, C. A.; HERNÁNDEZ, T.; ACOSTA-GÓMEZ, E. I.; CHACÓN-NAVA, J. G.; JIMÉNEZ-VEGA, F.; GARCÍA-CASILLAS, P. E. (2012) Chitosan/Poly(DL Lactide-co-Glycolide) *Scaffolds For Tissue Engineering*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 23 (12). p. 2893-2901.

MARTINS, M. A.; MORENO, R. M. B.; MATTOSO, L. H. C.; GONÇALVES, P. S. (2006) Estudo Térmico da Borracha Natural de Diferentes Clones da Série IAC. *8º Congresso Brasileiro de Polímeros*. p. 868-869.

MCCULLEN, S. D.; CHOW, A. G. Y.; STEVENS, M. M. *In vivo tissue engineering of musculoskeletal tissues*. (2011) *Current Opinion in Biotechnology*. 22. p. 715-720.

MIDDLETON, J. C. & TIPTON, A. J. (2000) Synthetic Biodegradable Polymers as Orthopedic Devices. *Biomaterials*. 21. p. 2335-2346.

MIKOS, A.G.; THORSEN, A. J.; CZERWONKA, L. A.; BAO, Y.; LANGER, R.; WINSLOW, D. N.; VACANTI, J. P. (1993) Preparation And Characterization of Poly(L-Lactic Acid) Foams. *Polymer*. 35 (5). p. 1068-1077.

MISEREZ, A.; WEAVER, J. C.; CHAUDHURI, O. (2015) Biological Materials and Molecular Biomimetics – Filling up the Empty Soft Materials Space for Tissue Engineering Applications. *Journal of Materials Chemistry B*. 3. p. 13-24.

MOTTA, A. C. & DUEK, E. A. R. (2006) Síntese, Caracterização e Degradação "in vitro" do Poli(L-Ácido Láctico). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 16 (1) p. 340-350.

MRUE, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CENEVIVA, R.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H. (2004) Evaluation of the Biocompatibility of a New Biomembrane. *Materials Research*. 7 (2). p. 277-283.

NAM, Y. S. & PARK, T. G. (1999) Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of Biomedical Materials Research*. 47. p. 8-17.

OLABISI, O.; ROBERSON, L. M.; SHAW, M. T. (1979) *Polymer-Polymer Miscibility*. Bound Brook: Academic Press Inc.

OLIVEIRA, J. A. A.; HYPPOLITO, M. A.; COUTINHO-NETTO, J.; MRUÉ, F. (2003) Miringoplastia com a Utilização de um Novo Material Biosintético. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 69 (5). p. 649-655.

PANDEY, A.; PANDEY, G. C.; ASWATH, P. B. (2008) Synthesis Of Polylactic Acid–Polyglycolic Acid Blends Using Microwave Radiation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials I*. p. 227-233.

PARASHAR, P.; RAMAKRISHNA, K.; RAMAPRASAD, A. T. (2010) A Study on Compatibility of Polymer Blends of Polystyrene/Poly(4-vinylpyridine). *Journal of Applied Polymer Science*. 120. p. 1729-1735.

PEARSON, G. D.; HAVLIK, R. J.; EPPLEY, B.; NYKIEL, M.; SADOVE, A. M. (2008) Craniosynostosis: a single institution's outcome assessment from surgical reconstruction. *Journal of Craniofacial Surgery*. 19 (1). p. 65-71.

PENK, A.; FÖSTER, Y.; SCHEIDT, H. A.; NIMPTSCH, A.; HACKER, M. C.; SCHULZ-SIEGMUND, M.; AHNERT, P.; SCHILLER, J.; RAMMELT, S.; HUSTER, D. (2013) The Pore Size of PLGA Bone Implants Determines the De Novo Formation of Bone Tissue in Tibial Head Defects in Rats. *Magnetic Resonance in Medicine*. 70. p. 925-935.

PETERSSON, L.; KVIEN, I.; OKSMAN, K. (2007) Structure and Thermal Properties of Poly (Lactic Acid) / Cellulose Whiskers Nanocomposite Materials. *Composites Science and Technology*. 67. p. 2535-2544.

PILICHOWSKI, J. F.; MOREL, M.; TAMBOURA, F.; CHMELA, S.; BABA, M.; LACOSTE, J. (2010) Crosslinking and Ageing of ^{13}C Labelled Polyisoprene Part 1: Synthesis and Polymerisation of 4- ^{13}C -isoprene. *Polymer Degradation and Stability*. 95. p. 1575-1580.

PISKIN, E.; ISOGLU, A.; BÖLGEN, N.; VARGEL, I.; GRIFFITHS, S.; ÇAVUSOGLU, T.; KORKUSUZ, P.; GÜZEL, E.; CARTMELL, S. (2008) *In vivo* Performance of Simvastatin-Loaded Electrospun Spiral-Wound Polycaprolactone Scaffolds in Reconstruction of Cranial Bone Defects in the Rat Model. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*. 90A (4) p. 1137-1151.

QUEIROZ, D. P. (2000) *Diagrama de Fases, Propriedades Térmicas e Morfológicas de Blendas de Poli (Ácido Láctico) e Poli (Metacrilato de Metila)*. 127 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RASAL, R. (2009) *Surface and Bulk Modification of Poly(Lactic Acid)*. 176 f. Tese (Doutorado) - Clemson University, Clemon.

RATHBONE, S.; FURRER, P.; LÜBBEN, J.; ZINN, M.; CARTMELL, S. (2009) Biocompatibility of Polyhydroxyalkanoate as a Potential Material for Ligament and Tendon Scaffold Material. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*. 93A (4) p. 1391-1403.

RAVICHANDRAN, R.; VENUGOPAL, J. R.; SUNDARRAJAN, S.; MUKHERJEE, S.; SRIDHAR, R.; RAMAKRISHNA, S. (2012) Composite Poly-L-Lactic Acid / Poly-(α,β)-DL-Aspartic Acid / Collagen Nanofibrous Scaffolds for Dermal Tissue Regeneration. *Materials Science and Engineering C*. 32. p. 1443-1451.

REZENDE, C. A. & DUEK, E. A. R. (2003) Blendas de Poli (Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico) / Poli (Ácido Láctico): Degradação *in vitro*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 13. p. 36-44.

REZENDE, C. M. F.; SILVA, M. C.; LARANJEIRA, M. G.; BORGES, A. P. B. (2001) Estudo Experimental do Poliuretano de Óleo de Mamona (*Ricinus communis*) como Substituto Parcial do Tendão Calcâneo Comum em Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53 (6). p. 695-700.

RIBEIRO NETO, W. A.; PEREIRA, I. H. L.; AYRES, E.; PAULA, A. C. C.; AVEROUS, L.; GÓES, A. M.; ORÉFICE, R. L.; BRETAS, R. E. S. (2012) Influence of the Microstructure and Mechanical Strength of Nanofibers of Biodegradable Polymers with Hydroxyapatite in Stem Cells Growth: *Electrospinning*, Characterization and Cell Viability. *Polymer Degradation and Stability*. 97. p. 2037-2051.

RICCI, G.; LEONE, G.; BOGLIA, A.; BOCCIA, A. C.; ZETTA, L. (2009) cis-1,4-alt-3,4 Polyisoprene: Synthesis and Characterization. *Macromolecules*. 42. p. 9263-9267.

RICOTTI, L.; POLINI, A.; GENCHI, G. G.; CIOFANI, G.; IANDOLO, D.; VAZÃO, H.; MATTOLI, V.; FERREIRA, L. MENCASSI, A.; PISIGNANO, D. (2012) Proliferation and Skeletal Myotube Formation Capability of C2C12 and H9C2 Cells on Isotropic and Anisotropic Electrospun Nanofibrous PHB *Scaffolds*. *Biomedical Materials*. 7. 035010 (11p.).

RNJAK-KOVACINA, J.; WISE, S. G.; LI, Z.; MAITZ, P. K. M.; YOUNG, C. J.; WANG, Y.; WEISS, A. S. (2012) Electrospun Synthetic Human Elastin:Collagen Composite *Scaffolds* for Dermal Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia*. 8. p. 3714-3722.

SACHOLS, E. & CZERNUSZKA, J. T. (2003) Making Tissue Engineering *Scaffolds* Work: Review on the Application of Solid Freeform Fabrication Technology to the Production of Tissue Engineering *Scaffolds*. *European Cells and Materials*. 5. p. 29-40.

SAKAI, S.; HASHIMOTO, I.; KAWAKAMI, K. (2007) Synthesis of an Agarose-Gelatin Conjugate for Use as a Tissue Engineering *Scaffold*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 103(1). p. 22–26.

SAMPAIO, R. B. (2007) *Neovascularização Retiniana Induzida por Fração Angiogênica Derivada do Látex: Modelo Experimental em Coelhos*. 100 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; NIETO, A.; VALLET-REGÍ, M. (2008) Hydroxyapatite/ β -Tricalcium Phosphate/Agarose Macroporous *Scaffolds* For Bone Tissue Engineering. *Chemical Engineering Journal*. 137. p. 62–71.

SANKAR, D.; CHENNAZHI, K. P.; NAIR, S. V.; JAYAKUMAR, R. (2012) Fabrication of Chitin / Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Hydrogel *Scaffold*. *Carbohydrate Polymers*. 90. p. 725-729.

SANTOS JR, A. R.; FERREIRA, B. M. P.; DUEK, E. A. R.; DOLDER, H.; WADA, M. L. F. (2005) Use of Blends of Bioabsorbable Poly(L-Lactic Acid)/Poly(Hydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate) as Surfaces for Vero Cell Culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38. p. 1623-1632.

DOS SANTOS, L. A.; SOUSA, V. C.; BERGMANN, C. P.; VASCONCELLOS, L. A. (2011) Processo de Produção de Polímeros em Fibras. *Número de Registro de Patente: 0000221109247952*.

SEVERINO, P.; SANTANA, M. A. H.; MALMONGE, S. M.; SOUTO, E. B. (2011) Polímeros Usados como Sistemas de Transporte de Princípios Ativos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 21 (5). p. 361-368.

SHANMUGASUNDARAM, S.; CHAUDHRY, H.; ARINZEH, T. L. (2011) Microscale Versus Nanoscale *Scaffold* Architecture for Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *Tissue Engineering: Part A*. 17 (5). p. 831-840.

SHI, G.; CAI, Q.; WANG, C.; LU, N.; WANG, S.; BEI, J. (2002) Fabrication and Biocompatibility of Cell *Scaffolds* of Poly (L-Lactic Acid) and Poly (L-Lactic-co-Glycolic Acid). *Polymers for Advanced Technologies*. 13. p. 227-232.

SHIN, K. C.; KIM, B. S.; KIM, J. H.; PARK, T. G.; NAM, J. D.; LEE, D. S. A (2005) Facile Preparation of Highly Interconnected Macroporous PLGA *Scaffolds* By Liquid–Liquid Phase Separation II. *Polymer*. 46. p. 3801-3808.

DA SILVA, J. S. P. (2008) *Estudo das Características Físico-Químicas e Biológicas pela Adesão de Osteoblastos em Superfície de Titânio Modificadas pela Nitretação em Plasma*. 119 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. (2005) *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. Rio de Janeiro: LTC.

SINGH, U. V. & UDUPA N. (1997) *In vitro* Characterization of Methotrexate Loaded Poly (Lactic-co-Glycolic) Acid Microspheres and Antitumor Efficacy in Sarcoma-180 Mice Bearing Tumor. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 72. p. 165-173.

SMITH, L. A. & MA, P. X. (2004) Nano-Fibrous *Scaffolds* for Tissue Engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 39. p. 125-131.

SMITH, I. O.; LIU, X. H.; SMITH, L. A.; MA, P. X. (2009) Nanostructured Polymer *Scaffolds* for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *WIREs: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 1. p. 226-236.

STEVENS, M. P. (1999) *Polymer Chemistry: An Introduction*. New York: Oxford University Press.

SUNDARAMURTHI, D.; VASANTHAN, K. S.; KUPPAN, P.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Electrospun Nanostructured Chitosan–Poly(Vinyl Alcohol) *Scaffolds*: a Biomimetic Extracellular Matrix as Dermal Substitute. *Biomedical Materials*. 7. 045005 (12p.)

TALIERI, I. C.; LAUS, J. L.; COUTINHO-NETTO, J.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PAULA, M. C. (2009) Natural Latex Graft in Lamellar and Penetrating Sclerectomies in Rabbits. *Ciência Rural*. 39 (6). p. 1815-1822.

TALLHEDEN, T. (2009) Cell Culture: Harvest, Selection, Expansion, and Differentiation . In BLITTERSWIJK, C. (ed.) *Tissue Engineering*. Amsterdam: Elsevier Inc.

TARACHIWIN, L.; SAKDAPIPANICH, J.; UTE, K.; KITAYAMA, T.; TANAKA, Y. (2005) Structural Characterization of α -Terminal Group of Natural Rubber. 2. Decomposition of Branch-Points by Phospholipase and Chemical Treatments. *Biomacromolecules*. 6. p. 1858-1863.

THISTLETHWAITE, P. A.; YUNG, G.; KEMP, A.; OSBOURNE, S.; JAMIESON, S. W.; CHANNICK, C.; HARRELL, J. (2008) Airway Stenoses After Lung Transplantation: Incidence, Management, and Outcome. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 136 (6). p. 1569-1575.

TSUNEIZUMI, Y.; KUWAHARA, M.; OKAMOTO, K.; MATSUMURA, S. (2010) Chemical Recycling of Poly (Lactic Acid) - Based Polymer Blends Using Environmentally Benign Catalysts. *Polymer Degradation and Stability*. 95. p. 1387-1393.

TSUTSUI, H.; KUBOTA, M. YAMADA, M.; SUZUKI, A.; USUDA, J.; SHIBUYA, H.; MIYAJIMA, K.; SUGINO, K.; ITO, K.; FURUKAWA, K.; KATO, H. (2008) Airway Stenosing for the Treatment of Laryngotracheal Stenosis Secondary to Thyroid Cancer. *Asian Pacific Society Of Respiriology*. 13. p. 632-638.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (2013) Pedido de Registro de Marca de Produto (Nominativa). *Número de Processo de Registro de Marca: 906982910*.

UPADHYAY, D.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K.; PARVAIZ, M. R.; PANDA, B. P. (2010) Impact Modification of Poly (Trimethylene Terephthalate)/Polypropylene Blend Nanocomposites: Fabrication and Characterization. *Journal of Applied Polymer Science*. 120. p. 932-943.

VALENTE, J. F. A.; VALENTE, T. M. A.; ALVES, P.; FERREIRA, P.; SILVA, A.; CORREIA, I. J. (2012) Alginate Based *Scaffolds* For Bone Tissue Engineering. *Materials Science Engineering C*. 32. p. 2596-2603.

VASCONCELLOS, L. A. & DOS SANTOS, L. A. (2012a) Calcium Phosphate Cement *Scaffolds* Constructed with PLGA Fibers. *VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAOB*.

VASCONCELLOS, L. A. & DOS SANTOS, L. A. (2012b) Study and Evaluation of Sodium Alginate Fibers *Scaffolds* and *Scaffolds* with α -TCP Plus Sodium Alginate Fibers. *VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAOB*.

VASCONCELLOS, L. A. & DOS SANTOS, L. A. (2013) Calcium Phosphate Cement *Scaffolds* with PLGA Fibers. *Materials Science and Engineering C*. 33. p. 1032-1040.

VASITA, R. & KATTI, D. S. (2006) Nanofibers and Their Applications in Tissue Engineering. *International Journal of Nanomedicine*. 1 (1). p. 15-30.

VENKATESAN, J.; PALLELA, R.; BHATNAGAR, I.; KIM, S. K. (2012) Chitosan – Amylopectin / Hydroxyapatite And Chitosan – Chondroitin Sulphate / Hydroxyapatite Composite *Scaffolds* For Bone Tissue Engineering. *International Journal Biological Macromolecules*. 51. p. 1033-1042.

VISSER, S. A.; HERGENROTHER, R. W.; COOPER, S. L. (1996) Polymers. In: Ratner, D. B. (ed.) *Biomaterials Science*. San Diego: Academic Press.

WAN, Y.; CHEN, W.; YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. (2003) Biodegradable Poly (L-Lactide) - Poly (Ethylene Glycol) Multiblock Copolymer: Synthesis and Evaluation of Cell Affinity. *Biomaterials*. 24. p. 2195-2203.

WANG, H.; FENG, Y.; FANG, Z.; YUAN, W.; KHAN, M. (2012) Co-Electrospun Blends of PU and PEG as Potential Biocompatible *Scaffolds* for Small-Diameter Vascular Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering C*. 32. p. 2306-2315.

WARD, I. M. & HADLEY, D. W. (1995) *Mechanical Properties of Solid Polymers*. West Sussex: John Wiley & Sons.

WIMPENNY, I.; ASHAMMAKHI, N.; YANG, Y. (2012) Chondrogenic Potential of Electrospun Nanofibres for Cartilage Tissue Engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 6. p. 536-549.

WOOD, D. E.; LIU, Y. H.; VALLIÈRES, E.; JONES, R. K.; MULLIGAN, M. S. (2003) Airway Stenting for Malignant and Benign Tracheobronchial Stenosis. *Annals Of Thoracic Surgery*. 76. p. 167-174.

XAVIER, R. G.; SANCHES, P. R. S.; MACEDO NETO, A. V.; KUHL, G.; VEARICK, S. B.; MICHELON, M. D. O. (2008) Desenvolvimento de uma órtese de Dumon modificada para aplicações traqueais: um estudo em cães. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 34 (1). p. 21-26.

YANG, F.; QU, X.; CUI, W.; BEI, J.; YU, F.; LU, S.; WANG, S. (2006) Manufacturing and Morphology Structure of Polylactide-Type Microtubules Orientation-Structured *Scaffolds*. *Biomaterials*. 27. p. 4923-4933.

YANNAS, I. V. (1996) Natural Materials In: Ratner, D. B. (ed.) *Biomaterials Science*. San Diego: Academic Press.

YU, L. & DING, J. (2008) Injectable Hydrogels as Unique Biomedical Materials. *Chemical Society Reviews*. 37. p. 1473-1481.

ZHANG, R. & MA, P. X. (1998) Poly (α -Hydroxyl Acids) / Hydroxyapatite Porous Composites for Bone-Tissue. I. Preparation and Morphology. *Journal of Biomedical Materials Research*. 44 (4). p. 446-455.

ZHANG, Y.; CAI, X.; CHOI, S. W.; KIM, C.; WANG, L. V.; XIA, Y. (2010) Chronic Label-Free Volumetric Photoacoustic Microscopy of Melanoma Cells In Three-Dimensional Porous *Scaffolds*. *Biomaterials*. 31. p. 8651-8658.

ZHOU, M.; SMITH, A. M.; DAS, A. K.; HODSON, N W.; COLLINS, R. F.; ULIJN, R. V.; HOUGH, J. E. (2009) Self-Assembled Peptide-Based Hydrogels as *Scaffolds* for Anchorage-Dependent Cells. *Biomaterials*. 30. p. 2523-2530.

ZOPPI, R. A.; DUEK, E. A. R.; CORAÇA, D. C.; BARROS, P. P. (2001) Preparation and Characterization of Poly (L-Lactic Acid) and Poly (Ethylene Oxide) Blends. *Materials Research*. 4(2). p. 117-125.

Publicações Originadas da Tese

- **MARQUES, D. R.;** DOS SANTOS, L. A.; SOUSA, V. C.; SANCHES, P. R. S.; MACEDO NETO, A. V. (2011) Blendas Poliméricas de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno. *Número de Registro de Patente: 0000221010682444.*
- **MARQUES, D. R. & DOS SANTOS, L. A.** (2011) Caracterização de Blenda Polimérica de Poli Ácido Láctico-co-Glicólico e Poliisopreno. *11º Congresso Brasileiro de Polímeros – CBPol.*
- **MARQUES, D. R. & DOS SANTOS, L. A.** (2011) Caracterização de Blenda de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) Poliisopreno para Aplicação como Biomaterial. *2º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos – OBI.*
- **MARQUES, D. R. & DOS SANTOS, L. A.** (2012) Caracterização Química e Biológica de Blenda Polimérica e Poli (Ácido Láctico-Co-Glicólico)/Poliisopreno. *XXIII Congresso Brasileiro em Engenharia Biomédica - CBEB.*
- **MARQUES, D. R.;** URIBE, C.; MATTE, U.; SANCHES, P. R. S.; XAVIER, R. G.; SCHOPF, L. F.; FRAGA, J. C. S.; DOS SANTOS, L. A. (2012) Mechanical and Biological Characterization of Poly(lactic-co-glycolic acid)/Polyisoprene Polymeric Blend. *VII Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais - COLAOB.*
- **MARQUES, D. R.;** THURMER, M. B.; DOS SANTOS, L. A. (2013) Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)/Polyisoprene Fibers for Tissue Engineering. *3º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos – OBI.*

- **MARQUES, D. R.**; FALLER, G. J.; COLLARES, M. V. M.; DOS SANTOS, L. A. (2013) Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)/Polyisoprene Springs for Craniosynostosis Treatment. *3º Taller de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos – OBI*.
- **MARQUES, D. R.** & DOS SANTOS, L. A. (2014) Fibers of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)/Poly (Isoprene) Blend for Application in Tissue Engineering. *XXIV Congresso Brasileiro em Engenharia Biomédica - CBEB*.
- **MARQUES, D. R.**; DOS SANTOS, L. A.; CARTMELL, S. H.; GOUGH, J. E. (2014) Characterization of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) / Poly (Isoprene) Blend for Application in Tissue Engineering. *XXVI European Congress on Biomaterials - ESB*.
- **MARQUES, D. R.**; SCHOPF, L. F.; FRAGA, J. C. S.; DOS SANTOS, L. A. (2013) Analysis of Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)/Poly(Isoprene) Polymeric Blend for Application as Biomaterial. *Polímeros.*, 23 (5). p. 579-584.
- **MARQUES, D. R.**; VOLKMER, T. M.; DOS SANTOS, L. A. (2015) Natural Polymers: Tissue Engineering Scaffolds. *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*.
- VECHIETTI, F.A.; **MARQUES, D. R.**; MUNIZ, N. O.; DOS SANTOS, L. A. (2015) Fibers Obtaining and Characterization Using Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) and Poly (Isoprene) Containing Hydroxyapatite and α TCP Calcium Phosphate by *Electrospinning* Method. *Key Engineering Materials*. 631. p. 173-178.