

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MINAS

Dissertação de mestrado

**“Síntese e avaliação preliminar de
citotoxicidade de polímeros injetáveis
fotopolimerizáveis e biodegradáveis”**

Aluno: Ildeu Helênio Lazarini Pereira
Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice
Fevereiro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MINAS
Curso de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Ildeu Helênio Lazarini Pereira

**“Síntese e avaliação preliminar de citotoxicidade de polímeros injetáveis
fotopolimerizáveis e biodegradáveis”**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG

Fevereiro de 2009

AGRADECIMENTOS

Todos os sonhos demandam dedicação e colaboração. Neste sonho que está só começando é louvável agradecer a todos que estiveram presente neste projeto que é mais de vida que de dissertação. Pessoas muito especiais passaram, não ao acaso, mas enviadas para que tudo fosse feito da melhor maneira possível.

À minha mãe, te agradeço por me mostrar o caminho real do amor, sinto sua presença e todos os seus cuidados. Te agradeço por tudo, e este tudo cheio de amor.

Aos meus irmãos, por serem meus, obrigado pelo apoio.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Lambert Oréfice, meu muito obrigado pela humildade e respeito frente às minhas idéias certas e devaneios.

À Eliane Ayres, Patrícia S. Patrício e Eduardo Paulino Jr., vocês são literalmente insubstituíveis e extremamente queridos por mim. Sempre me ouviram e prontamente ajudaram. Espero um dia poder retribuir um pouco deste carinho. Muito obrigado.

Um agradecimento muito especial a algumas pessoas que sem elas digo que este projeto não sairia: Prof. Alfredo de Miranda Góes, Agda Aline, Isabela Salgado, Regina Coeli, Hermes Costa e em especial à Viviane Gomide, que me provou, ou me iludiu, dizendo que eu era capaz! Agradeço aos meus colegas e amigos que sempre estão de pronto atendimento para qualquer desespero.

À Cida e Nelson, vocês me ajudaram em absolutamente tudo que precisei, muito obrigado.

Agradeço a Deus pela oportunidade de me dedicar neste momento a um projeto de vida que sempre sonhei. E agradeço a todos, que indiretamente estiveram presentes na elaboração desta etapa.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2	
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
CAPÍTULO 3	
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
3.1 Biomateriais	5
3.2 Materiais Poliméricos	10
3.3 Poliuretanos	13
3.3.1 Policaprolactona (PCL)	16
3.3.2 Catalisadores	18
3.4 Injetabilidade	18
3.5 Esterilização	20
3.6 Métodos de caracterização e avaliação das propriedades	21
3.6.1 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	21
3.6.2 Ensaio mecânico de tração	23
3.7 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	27
3.7.1 Células Tronco Mesenquimais	28
3.7.2 Características da estrutura X Proliferação celular	30
3.7.3 Atividade de fosfatase alcalina	30
3.7.4 Viabilidade celular (MTT)	31
3.7.5 Dosagem de colágeno	32
3.8 Fotopolimerização	32
CAPÍTULO 4	
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Materiais	35
4.2 Síntese de poliuretano acrilato (PUA)	35
4.3 Preparação dos filmes de PUA	36
4.4 Caracterização	36
4.5 Caracterizações <i>in vitro</i>	37
4.5.1 Cultura de células tronco mesenquimais não diferenciadas	37
4.5.2 Viabilidade celular (MTT)	38
4.5.3 Atividade de fosfatase alcalina	39
4.5.4 Dosagem de colágeno	39
4.6 Caracterizações <i>in vivo</i>	39
4.6.1 Coleta de material para estudo histopatológico	40
4.6.2 Estudo histológico	41

CAPÍTULO 5

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Propriedades mecânicas	42
5.2	Estudos <i>in vitro</i>	51
5.2.1	Obtenção de células tronco mesenquimais	51
5.2.2	Viabilidade celular	52
5.2.3	Produção de fosfatase alcalina	53
5.2.4	Síntese de colágeno	55
5.3	Estudos <i>in vivo</i>	56
5.3.1	Biomaterias implantados na forma injetável	56
5.3.2	Biomateriais implantados na forma cirúrgica	57
5.4	Estudo histopatológico	59
5.4.1	Poli(metacrilato de metila) (PMMA)	59
5.4.2	PUA-PPG	61
5.4.2.1	Material injetado	61
5.4.2.2	Material cirúrgico	61
5.4.3	PUA-PCL	61
5.4.3.1	Material injetado	61
5.4.3.2	Material cirúrgico	62
5.4.4	Estudo comparativo	62

CAPÍTULO 6

6	CONCLUSÕES	67
---	------------	----

CAPÍTULO 7

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
---	----------------------------	----

CAPÍTULO 8

8	CETEA	75
8.1	Condições ambientais do local	75
8.2	Manejo dos animais	75
8.3	Alimentação	76
8.4	Procedimentos cirúrgicos e de anestesia	76
8.5	Outras informações	76
8.6	Número de animais	76
8.7	Anestesia, preparo do animal e técnica operatória	76
8.7.1	Tranquilização e indução anestésica	76
8.7.2	Manutenção anestésica	77
8.8	Técnica operatória	77

RESUMO

Foram sintetizados poliuretanos (PU) com potencial para serem aplicados na área de biomateriais. Nestes elastômeros foram utilizados poli(propileno glicol) (PPG) e/ou poli(ϵ -caprolactona) (PCL) como segmento macio. O segmento rígido foi baseado no reagente isoforona diisocianato (IPDI). Os PUs foram modificados com hidróxi-etil metacrilato (HEMA) para formar poliuretanos com grupos acrilatos (PUA) com potencial para serem fotopolimerizáveis (PUA-PPG e PUA-PCL). O PCL é um poliéster alifático biodegradável. O grau de ligações de hidrogênio, avaliado por espectroscopia no infravermelho (FTIR), foi usado para investigar o processo de separação de microfases nos PU. Testes mecânicos de tração avaliaram as propriedades mecânicas destes materiais, assim como testes de inchamento e injetabilidade. Estes testes preliminares mostraram a capacidade desses novos materiais sintetizados de se classificarem como poliuretanos com grupos acrilatos (PUAs) injetáveis, biodegradáveis no PUA-PCL e fotopolimerizáveis. Como grupo controle foram usadas microesferas de poli(metacrilato de metila) (PMMA). Testes preliminares *in vitro* e *in vivo* foram realizados. No estudo *in vitro*, a citotoxicidade dos materiais foi analisada através de testes de viabilidade celular MTT, dosagem de colágeno e expressão de fosfatase alcalina, quantificando a proliferação de células tronco mesenquimais não diferenciadas quando em contato com os biomateriais sintetizados. Estudos *in vivo* foram relacionados com os estudos *in vitro*. Cortes histológicos dos biomateriais foram realizados e avaliados em microscopia óptica. As análises dos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o poliuretano derivado de PCL e do PPG são biocompatíveis quando em contato com células tronco mesenquimais não diferenciadas e estas células podem aderir e proliferar no material. Tais materiais são extremamente atrativos e demonstraram ter potencial para serem utilizados como poliuretanos biomédicos.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Muito e pouco se sabe a respeito do funcionamento ou controle do corpo humano. Chega-se a tentar imitá-lo ou enganá-lo. Mas a natureza impõe seu papel claro em deter ou apoiar soberanamente as decisões e descobertas humanas. A tentativa constante em refutar ou postergar um fim certo permite que o homem tenha uma melhora na qualidade de vida através das suas pesquisas e descobertas.

Junto dessas pesquisas surge necessidade da criação de materiais que possam permanecer em equilíbrio com o organismo vivo, os biomateriais. Os questionamentos são infinitos e os materiais têm que estar adequados à circunstância específica.

O projeto destes biomateriais depende do ambiente residual do tecido e também do próprio tecido a ser preenchido ou substituído (DRURY & MOONEY, 2003). Os polímeros usados para este fim são sempre estudados e modificados para responderem bem a este ofício. Várias das suas características os tornam importantes coadjuvantes na tentativa de favorecer a reconstrução da arquitetura esquelética perdida em doenças, traumas ou más formações. Usados como veículos para moléculas bioativas, sua estrutura tridimensional permite uma organização celular, assim como podem atuar no estímulo necessário para o crescimento e formação do tecido desejado (DRURY & MOONEY, 2003).

Biomateriais, como hidrogéis têm sido de muito interesse na engenharia de tecidos devido à sua capacidade de auxiliar no reparo e regeneração de tecidos e órgãos (HOFFMAN, 2002). Devido a sua estrutura poder ser similar à matriz extracelular de muitos tecidos, estes materiais têm sido usados para transplantar células e atuar perto dos tecidos do corpo, incluindo cartilagens, ossos e músculos (DRURY & MOONEY, 2003).

Conforme a necessidade, faz-se necessário a execução de testes para a confiabilidade do uso do biomaterial, como a análise de retenção de água pelo material, inchamento,

viscosidade, comportamento mecânico (HO *et al*, 2006), biodegradabilidade e biocompatibilidade na mudança de pH e temperatura, (SHIM *et al*, 2006) mas a chave do sucesso está na confecção de biomateriais que sejam, além de mecânica e estruturalmente compatíveis com o tecido em questão, sejam citocompatíveis (BONZANI *et al*, 2007).

A procura por procedimentos menos invasivos (SHIM *et al*, 2005; COHN *et al*, 2005; BONZANI *et al*, 2007), e que possam melhorar a resposta orgânica fez crescer as pesquisas sobre biomateriais que pudessem ser injetados via catéter e usados como carreadores de drogas. Estes estudos refletiram no aparecimento de biomateriais onde ocorrem mudanças no estado físico dos mesmos de sol para gel, dependendo da variação do pH e temperatura (SHIM *et al*, 2005); materiais onde existe a formação de micelas com núcleo hidrófobo estabilizado por uma casca hidrofílica, capaz de funcionar como um veículo para drogas (WEI *et al*, 2007), assim como imobilização de heparina na superfície do biomaterial para evitar a ativação da cascata de coagulação do plasma e ativação de plaquetas (DUNCAN *et al*, 2001).

Com o crescimento da engenharia de tecidos, torna-se necessário a criação de materiais que possam interagir com o organismo de forma a produzir reações desejáveis. Neste sentido, muito se tem pesquisado sobre os poliuretanos, pois suas propriedades mecânicas os tornam bem tolerados por tecidos duros e moles (BONZANI *et al*, 2007), além de serem biocompatíveis, terem habilidade de atuar na melhora do crescimento e proliferação celular, e também poder promover uma cinética de degradação controlada.

Devido a vários aspectos positivos dos poliuretanos, muito se tem feito para melhorar suas propriedades e diminuir a quantidade de agentes orgânicos durante sua síntese a fim de colaborar com uma resposta orgânica favorável. Com a adição de polímeros como a policaprolactona, formam-se poliuretanos com capacidade de biodegradação; importante fator para a integração do tecido ao biomaterial e vice versa (KANG & BEERS, 2006; JIANG *et al*, 2007; YEGANEH & TALEMI, 2007). Estudos modificando os poliuretanos, ou usando água como meio dispersante, também são relevantes, visto que uma variação da arquitetura molecular promove mudanças nas propriedades mecânicas destes (JANG *et al*, 2002).

Neste trabalho foram sintetizados e testados *in vitro* e *in vivo* poliuretanos passíveis de serem injetados e moldados no corpo previamente à sua fotopolimerização final. Tais materiais poderão ser empregados em aplicações biomédicas sem a necessidade de uso de procedimentos cirúrgicos que envolvam extensas incisões. Além disso, a introdução de componentes hidrolisáveis nos poliuretanos permite manipular a biodegradabilidade destes materiais.

CAPÍTULO 2

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento, avaliação *in vitro* e avaliação *in vivo* de poliuretanos injetáveis, fotopolimerizáveis e biodegradáveis.

2.2 Objetivos Específicos

1. Síntese de poliuretanos injetáveis, fotopolimerizáveis e biodegradáveis.
2. Determinação das propriedades mecânicas e características estruturais destes poliuretanos.
3. Análise *in vitro* da citotoxicidade desses materiais por células tronco mesenquimais não diferenciadas de tíbia e fêmur de rato através das técnicas de MTT, Fosfatase Alcalina, Colágeno.
4. Avaliação preliminar de resultados "in vivo" de citotoxicidade dos biomateriais fotopolimerizados por lâmpadas de halogênio.

CAPÍTULO 3

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biomateriais

O corpo humano é um sistema complexo e eficiente. No entanto, ele pode necessitar de algum reparo em virtude de acidentes ou enfermidades. Um dos primeiros estudos sobre a possibilidade de uso de materiais estranhos ao organismo humano como forma de reparação (implantes) remonta ao século XIX, quando foram testados os efeitos da introdução de fios metálicos em animais. As pesquisas referentes à obtenção de materiais para a fabricação de implantes foram fortemente estimuladas pela necessidade de minimizar-se danos físicos causados por conflitos militares.

A rejeição do organismo aos materiais implantados e as infecções decorrentes das cirurgias figuravam entre os principais problemas enfrentados no início dessas pesquisas. O primeiro problema foi atacado pelo estudo da biocompatibilidade dos materiais empregados, ou seja, da avaliação das respostas do organismo à presença de um corpo estranho no seu interior e da toxicidade do material empregado. O desenvolvimento de antibióticos eficazes no combate de infecções causadas por uma vasta gama de bactérias patogênicas, aliado à maior preocupação com a esterilização dos equipamentos e salas cirúrgicas, levaram a redução dos óbitos por infecções em pacientes implantados.

Biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação destas que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que podem ser usadas por tempo indeterminado, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com a finalidade de melhorar a qualidade de vida frente à adversidade (SANTOS, 2003).

Todos os materiais, seja de contato com estruturas de superfície externa do organismo, contato direto com tecidos ou órgãos, ou mesmo com fluidos corporais, são denominados

atualmente de biomateriais. Uma definição de consenso por especialistas da área cita: “Biomaterial é um material usado como dispositivo médico com o objetivo de interagir com sistemas biológicos”. Faz-se necessária a diferenciação entre biomaterial e biocompatibilidade (DIAS, 2006).

Os anos 50 podem ser caracterizados como o marco inicial do desenvolvimento dos biomateriais. A partir desta época, os “plásticos” começaram a ser desenvolvidos e adquiriram, em pouco tempo, importância crescente, apresentando um largo espectro de aplicações. Após a Primeira Guerra Mundial, a metalurgia teve um desenvolvimento significativo, resultando na concepção de novas ligas metálicas, como os aços inoxidáveis. Esses aços apresentam ótima resistência à corrosão resultante da presença de níquel e cromo e foram amplamente empregados em próteses ortopédicas. O emprego de placas e parafusos para fixar ossos fraturados foi iniciado em 1920. Alguns anos mais tarde, com o desenvolvimento das ligas à base de cobalto e cromo, os implantes metálicos tiveram novo impulso.

O termo biomaterial pode ser interpretado de duas maneiras distintas; primeiro como materiais biológicos, que podem ser: autólogo (quando originados do próprio indivíduo, como é o caso das pontes de safena), homólogos (quando originados de outras pessoas) ou heterólogos (quando originados de animais e aproveitados em implantes ou cirurgias); e segundo, como materiais sintéticos para implantes cirúrgicos, que se dividem em metálicos (ferrosos e não-ferrosos), cerâmicas, poliméricos e compósitos, que vem à substituir a função original ou uma parte, dos materiais biológicos (AYRES, 2006).

Em cada grupo genérico de materiais pode ser encontrado composições e fatores interrelacionados à compatibilidade do implante, tais como: a biocompatibilidade e a biofuncionalidade do material; a forma e o tamanho do implante; o tipo de superfície do implante; as condições de carregamento, as quais o implante será submetido no decorrer de sua utilização; a espécie de tecido, mole ou duro; que no resultado final vem a ser mais apropriados que outros, em determinadas aplicações cirúrgicas (HILL, 1998).

A biocompatibilidade é uma propriedade inerente a certos materiais inertes e inócuos (biomateriais), que expostos intermitentemente ou continuamente aos fluidos orgânicos do

corpo humano, como sangue, líquido sinovial, etc; apresentem aceitação e tolerância dos tecidos envoltórios, à sua presença. No entanto, estes materiais não devem causar disfunções no organismo ao longo do tempo. Como exemplo, pode-se citar que o FDA (Food and Drug Administration), exige uma segurança funcional para que este seja liberado para implantes, durante um período maior do que 20 anos (HILL, 1998).

Os biomateriais também podem ser bioinertes, bioativos e reabsorvíveis: Materiais bioinertes ou biotoleráveis são tolerados pelo organismo, porém não são capazes de ligar-se ao tecido ósseo, formando-se uma cápsula de tecido fibroso entre o biomaterial e o organismo; os bioativos interagem com o corpo humano ligando-se fortemente aos tecidos; os biomateriais reabsorvíveis são aqueles consumidos pelo organismo após determinado período, sendo substituídos pelo tecido original (HENCH *et al*, 2004).

Atualmente, o emprego de biomateriais encontra-se tal forma desenvolvido, que mais de 50 tipos diferentes de materiais são utilizados na produção de diferentes tipos de implantes protéticos complexos (HILL, 1998).

A importância econômica dos biomateriais é claramente evidenciada pelas altas cifras envolvidas nessa área conforme está evidenciado na Figura 3.1 que apresenta o crescimento no uso de biomateriais nos últimos 100 anos. Esta elevada importância econômica produz um desenvolvimento acelerado das tecnologias dos biomateriais, o que, em última análise, demonstra a necessidade de desenvolvimento desta no país o mais breve possível, enquanto as tecnologias ainda são viáveis de serem desenvolvidas, sem o qual correremos o risco de ficarmos dependentes em mais uma área tecnológica que está intimamente relacionada à demanda social por melhores condições de vida (SANTOS, 1998).

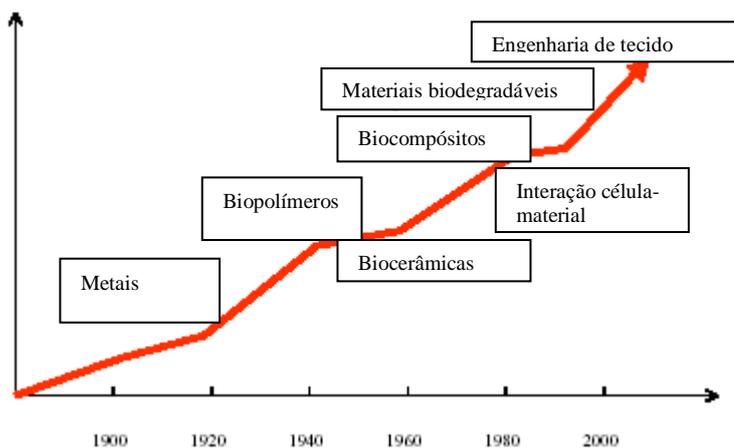


Figura 3.1: Demonstrativo do crescimento do uso de biomateriais nos últimos 100 anos (SANTOS, 1998)

A área de estudos dos biomateriais é o resultado da conjunção de esforços das pesquisas na medicina, ciência dos materiais e engenharia (SEAL *et al.*, 2001). Pode-se observar essa interação com o esquema da (Figura 3.2).

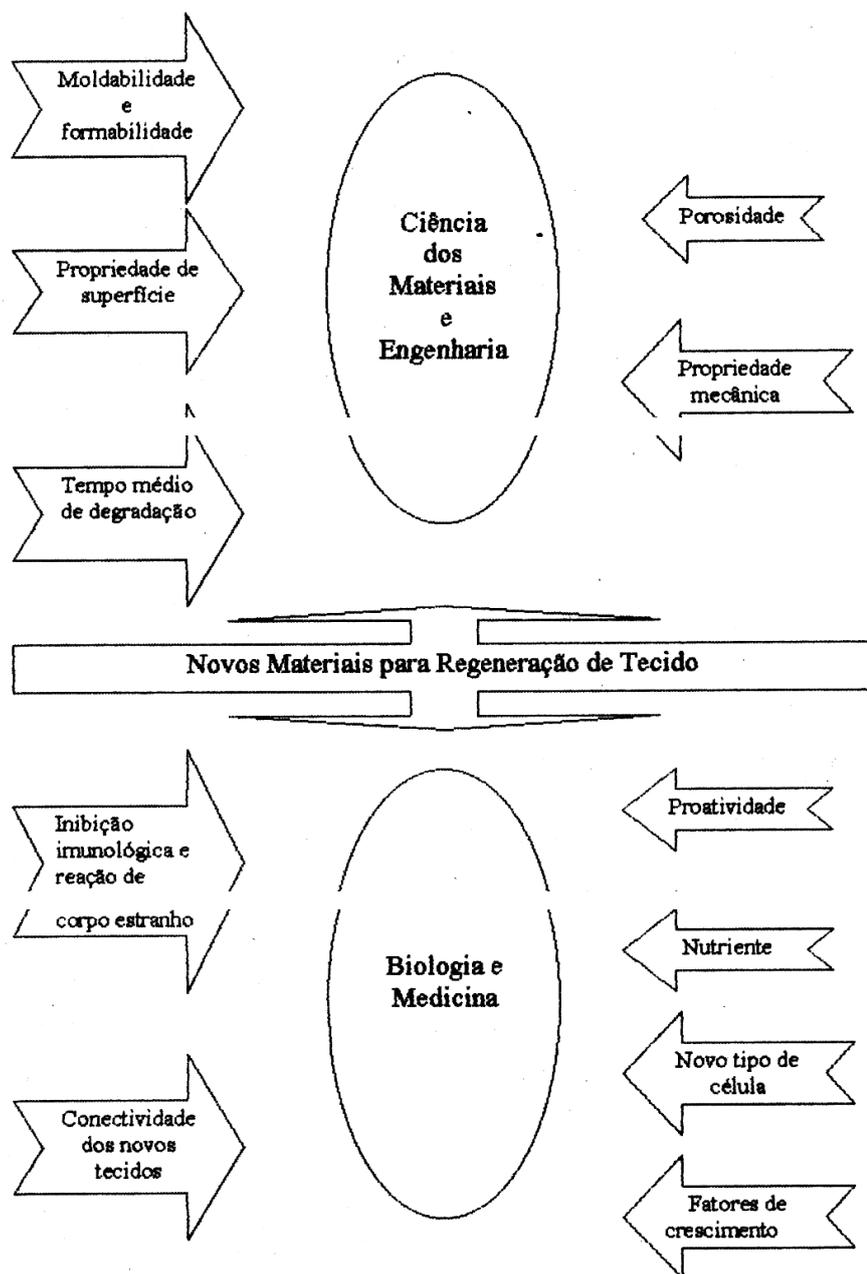


Figura 3.2: Fatores relevantes para formação de novos biomateriais (requisitos básicos) e interação das áreas biológica, engenharia e ciência dos materiais (SEAL *et al.*, 2001).

A caracterização do biomaterial não habilita o seu uso como biocomponente, mas pode e deve ser utilizada como uma pré-seleção de condições a serem testadas nas etapas seguintes. Os materiais “aprovados” nesta etapa terão que passar por testes laboratoriais em cultura de células (testes *in vitro*) e posteriormente por testes *in vivo* (em animais) e,

por último, por testes clínicos. Porém, à medida que se percorre este caminho, os testes se tornam mais caros e complexos, devendo ser restringidos ao menor número de condições possíveis.

Os requisitos fundamentais para o sucesso dos novos materiais devem incluir avaliação e resposta específica dos mediadores bioquímicos. São questionamentos frequentes: "-Estes materiais vão induzir respostas rápidas e encapsulamento? O material vai sofrer resposta de corpo estranho? Vai induzir resposta imune? As células vão ser capazes de aderir, proliferar e diferenciar em contato com o biomaterial?" Por outro lado, temos o desafio de trabalhar em ciência dos materiais modificando as propriedades dos materiais em relação às propriedades mecânicas, estrutura química, massa molar, origem dos monômeros, ligações cruzadas, morfologia de superfície, porosidade, capacidade de degradação e sua toxicidade. Devemos também levar em consideração a capacidade do material de tomar a forma, durante sua síntese, do desenho tridimensional do tecido a ser reconstruído (SEAL *et al.*, 2001).

3.2 Materiais Poliméricos

Materiais poliméricos são macromoléculas formadas pela repetição de unidades fundamentais chamadas meros, que dão origem a longas cadeias. O tamanho das cadeias, formadas principalmente de átomos de carbono, ou a massa molar, é o aspecto principal que confere a este grupo de materiais uma série de características à eles associadas. Apresentam usualmente baixa densidade, pequena resistência à temperatura e baixas condutividades térmica e elétrica (AYRES, 2006).

Os polímeros podem ser classificados como termoplásticos ou termorrígidos. Os termoplásticos podem ser amolecidos pelo aumento da temperatura e então deformados e moldados quando submetidos à pressão. Quando resfriados, retornam a rigidez inicial, podem ser reciclados, apresentam grande ductilidade e tenacidade à fratura. Os termorrígidos endurecem com o aumento da temperatura, devido à formação de ligações cruzadas, por isso uma vez produzidos, não podem ser remoldados ou reprocessados.

Os materiais poliméricos são largamente empregados como biomateriais devido à facilidade de fabricação, baixa densidade e boa biocompatibilidade (Tabela 3.1). Os biomateriais poliméricos são materiais muito estudados atualmente; constituem grande interesse para a pesquisa científica, mas há restrições no emprego destes, pois apresentam baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo, dificuldade para estabilização.

São utilizados biopolímeros naturais ou sintéticos, assim como biodegradáveis ou estáveis quando expostos ao ambiente corpóreo e interagem de formas diferentes com o organismo: (i) pequeno contato com sangue, usados como materiais suplementares, como lentes de contato, polímeros usados na odontologia, suturas e peles artificiais (PTFE); (ii) em contato com o sangue somente por um pequeno período, como membranas pulmonares artificiais (polietileno, poliéster); (iii) em contato com o sangue por um longo período de tempo ou permanentemente, como válvulas cardíacas, corações, mandíbulas e tendões artificiais e cimentos ósseos (poliuretano, PMMA, silicone) (TAKEMOTO, 1987).

Tabela 3.1: Alguns biopolímeros e aplicações

POLÍMERO	SIGLA(USA)	APLICAÇÃO
Polietileno	PE	Recipientes, tecidos, tubos, seringas, implantes ortopédicos
Polipropileno	PP	Seringas, suturas, tubos, membranas, vasos artificiais
Poliestireno	PS	Recipientes
Poli(cloreto de vinila) PVC Poli(metacrilato de metila) PMMA Poli(tetrafluoretileno) PTFE Teflon		Recipientes para sangue, tubos, conectores, membranas, lentes, cimento, tubos, vasos artificiais
Poli (tereftalato de etileno) PET (Dacron)		Suturas, tecidos, vasos artificiais, válvulas
Poliamidas(Nylon)	PA	Filmes, tubos, suturas
Poliuretanos	PU	Componentes de válvulas, tubos, filmes

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

Na primeira estratégia (Figura 3.3), o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, da inoculação até o replante no organismo hospedeiro. O implante do conjunto polímero e células ocorre com um tecido prematuro formado e o polímero é remodelado pela degradação *in vivo*, numa razão proporcional ao crescimento celular e à solicitação mecânica. Sua função é proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua bioreabsorção completa.

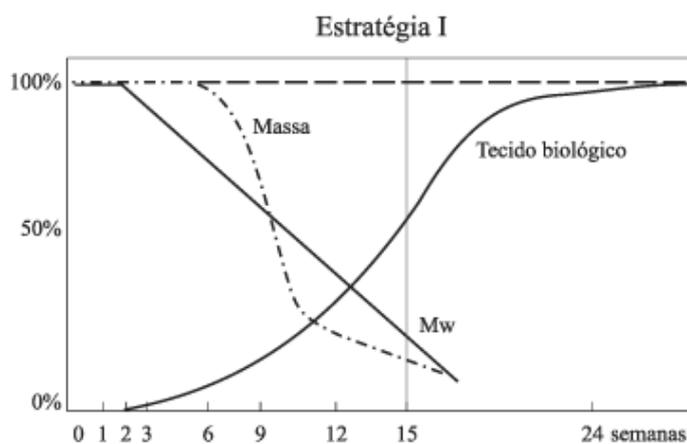


Figura 3.3: Estratègia I de seleção de polímeros bioreabsorvíveis aplicados à engenharia de tecidos (a linha vertical cinza indica o momento de implante *in vivo*).

Na segunda estratégia (Figura 3.4), o implante ocorre com tecido maduro formado. O suporte polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequados para a inoculação das células até a sua inserção num biorreator, onde ocorrerá a

formação do tecido maduro. Nesta etapa, as células semeadas proliferam e secretam matriz extracelular durante a cultura *in vitro*, enquanto o polímero é degradado e reabsorvido gradualmente, permitindo espaço para a proliferação celular e formação do tecido no reator biológico. Somente após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo.

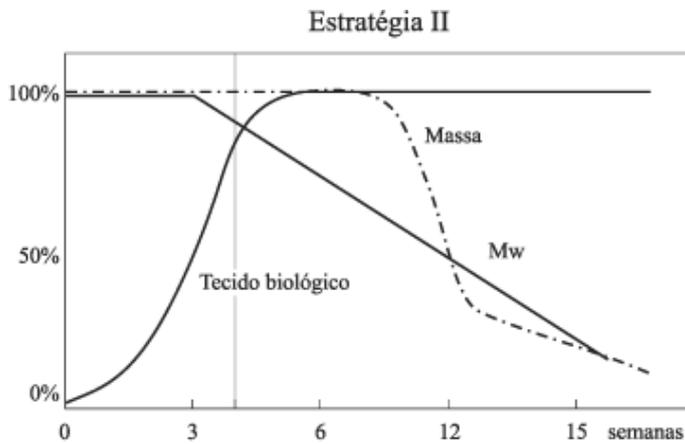


Figura 3.4: Estratègia II de seleção de polímeros bioreabsorvíveis aplicados à engenharia de tecidos (a linha vertical cinza indica o momento de implante *in vivo*).

Baseado nas estratègias anteriores, a primeira etapa na engenharia de tecidos inicia-se com o desenvolvimento, seleção e o processamento dos suportes. O uso de polímeros bioreabsorvíveis como suporte para a cultura de células vem tendo destaque na engenharia de tecidos.

3.3 Poliuretanos

Esses polímeros foram descobertos por Otto Bayer e colaboradores em 1937. O termo poliuretano (PU) é usualmente aplicado a polímeros que possuem grupos uretano formados tipicamente através da reação de um diisocianato com um diol, conforme é mostrado na Figura 3.5.

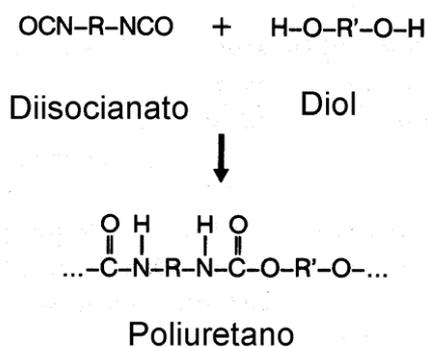


Figura 3.5: Síntese de poliuretanos.

As características básicas de estrutura que determinam as propriedades de um poliuretano são: composição da cadeia do polímero, grau de ramificação ou ligações cruzadas da cadeia do polímero e massa molar do polímero. Obviamente, essas características estão relacionadas com o tipo de matéria-prima selecionada para a obtenção do poliuretano, além das condições de reação. As principais matérias-primas empregadas na fabricação dos poliuretanos são os di ou poliisocianatos e os polímeros hidroxilados de baixa massa molar (polióis). Além dessas matérias-primas, são comumente usados os agentes de cura, agentes de expansão, catalisadores, aditivos, cargas, etc (AYRES, 2006).

Os poliuretanos podem ser considerados possuidores de ambas as estruturas: a de poliésteres e poliamidas. Sua susceptibilidade à biodegradação pode ser similar à dos poliésteres e poliamidas. Geralmente a biodegradabilidade dos poliuretanos é dependente do tipo de precursor, se são poliésteres ou poliéteres. Os poliuretanos baseados em poliéteres são resistentes à biodegradação, enquanto os poliuretanos poliésteres são mais prontamente atacados. A série de poliuretanos derivados do poli(caprolactona) com diisocianato alifático, com vários pesos moleculares, é mais rapidamente degradável do que os derivados do diisocianato aromático (MERKLI *et al.*, 1998).

Normalmente, na preparação de resinas de poliuretano a partir da reação entre um diol (ou polioliol) e um diisocianato, usa-se excesso de diisocianato para se obter um prépolímero com grupos isocianato terminais. Esses grupamentos NCO terminais ficam disponíveis para futuras reações (AYRES, 2006).

A decisão entre a escolha de um poliéster ou poliéter está intimamente relacionada com a finalidade a qual se destina o poliuretano. De uma maneira bastante generalizada, pode-se dizer que, comparado com poliéteres, os segmentos poliésteres ficam mais fortemente ligados aos grupamentos derivados do NCO. A presença de uma estrutura de ligação mais polar leva a formação de um polímero mais coeso com melhores propriedades mecânicas à temperatura ambiente. Esse efeito também pode ser atribuído a maior tendência à cristalização dos poliuretanos a base de poliésteres. Além disso, pode-se dizer que poliéteres são mais resistentes à hidrólise do que poliésteres. A instabilidade hidrolítica das ligações éster é fundamental no caso de polímeros biodegradáveis (AYRES, 2006).

A decisão entre usar um isocianato aromático ou alifático também vai depender da aplicação a que se destina o poliuretano a ser preparado. De uma maneira geral, os isocianatos alifáticos dão origem a poliuretanos mais flexíveis e resistentes às intempéries. Os isocianatos aromáticos formam poliuretanos mais viscosos. Isso, muitas vezes, dificulta a preparação de poliuretanos isentos de solventes. Os diisocianatos mais usados são o hexametileno diisocianato (HDI), o isoforona diisocianato (IPDI) e o 4,4'-diciclohexilmetano diisocianato (H₁₂MDI) cujas estruturas químicas aparecem na Figura 3.6. Devido a ambos os grupos isocianato estarem ligados em carbonos secundários, H₁₂MDI reage mais lentamente que HDI e IPDI. HDI contém somente grupos isocianato primários enquanto IPDI tem grupos isocianatos de ambos os tipos, primário e secundário (AYRES, 2006).

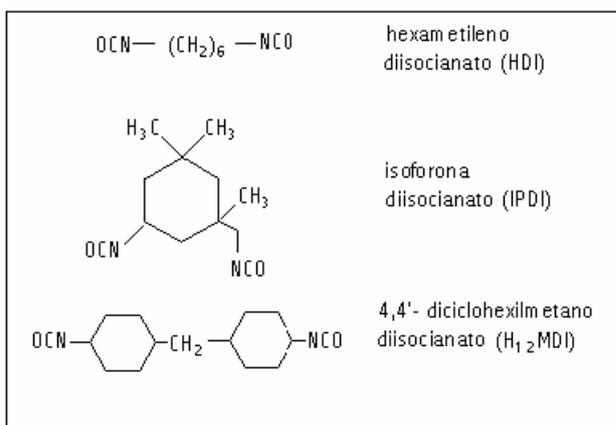


Figura 3.6: Monômeros diisocianatos alifáticos (AYRES, 2006).

A maioria das reações dos isocianatos está baseada na alta reatividade do grupo isocianato (NCO) e acontece através da adição na dupla ligação C=N. A adição com álcoois forma uretanos e com aminas forma uréias. Os isocianatos também reagem com água para formar aminas. As aminas geradas vão, então, reagir com grupos isocianato para formar uréias (AYRES, 2006). As principais reações dos isocianatos estão esquematizadas na Figura 3.7.

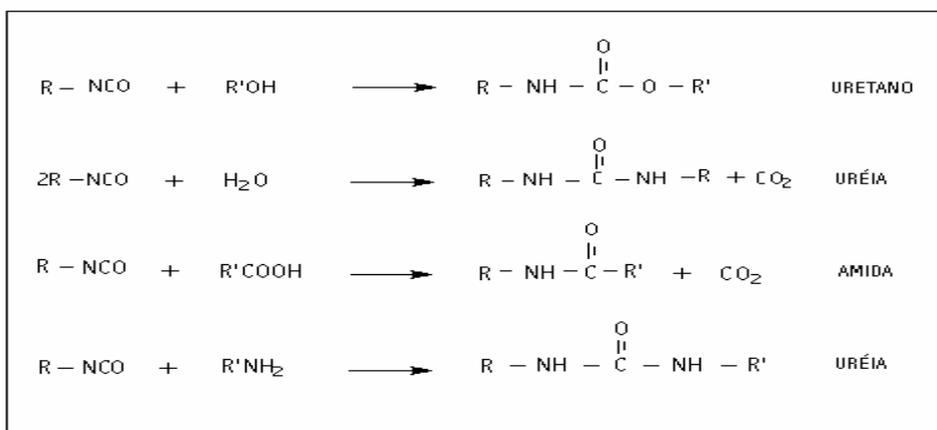


Figura 3.7: Reações de isocianatos (AYRES, 2006).

Poliuretanos segmentados (PUs) são largamente utilizados nas mais diversas aplicações devido à possibilidade de variação de sua estrutura química (AYRES, 2002). Geralmente a cadeia deste tipo de polímero consiste de segmentos “macios” e “rígidos” que dão origem a uma segregação de micro-fases causada pela incompatibilidade entre os segmentos. Tal morfologia tem influência nas propriedades térmicas e mecânicas dos poliuretanos. A combinação de uma freqüente biocompatibilidade com a ampla variedade de propriedades físicas e químicas, que podem ser alcançadas, faz com que essa classe de polímeros seja muito utilizada como biomaterial.

3.3.1 Policaprolactona

Pesquisas no campo de polímeros biodegradáveis tem sido incentivada, por suas aplicações potenciais na área biomédica. Além disso, a necessidade de se reduzir a quantidade de resíduos plásticos descartado no meio ambiente tem revelado a área de polímeros biodegradáveis como de grande interesse entre os investigadores (SCOTT & GILEAD, 1995). Do ponto de vista científico, o polímero biodegradável é definido como plástico

cuja degradação resulta primariamente da ação de microrganismos de ocorrência natural, entre eles, bactérias, fungos ou algas. Materiais como compostos de amido, poli(álcool vinílico), poliuretanos, polilactatos e poli(hidroxi butirato) são exemplos de polímeros biodegradáveis.

O poli(caprolactona) (PCL) é um polímero derivado da ϵ -caprolactona pertencente à família dos poliésteres alifáticos (AYRES, 2006). É altamente cristalino, tenaz, possui baixa temperatura de transição vítrea (entre -60°C e -70°C) e se funde a aproximadamente 60°C . Essa baixa temperatura de fusão é um fator que dificulta processabilidade, quando misturado com outros polímeros modificadores.

O poli(caprolactona) (PCL) é um poliéster alifático hidrofóbico e insolúvel em água, porém biodegradável através do ataque hidrolítico da ligação éster. Embora lentamente, seu produto de degradação, o ácido 6-hidroxi hexanóico (figura 3.8), é transformado em ácido adípico que é um metabólito de ocorrência natural. Comparado a outros poliésteres alifáticos, o PCL possui vantagens tais como: alta permeabilidade a moléculas pequenas de fármacos, manutenção do pH neutro durante a degradação, facilidade de formação de blendas com outros polímeros, e adequação para liberação de longo prazo (Figura 3.8) devido à cinética lenta de erosão, quando comparado ao polilactídeo (PLA), poliglicolídeo (PGA) e poli(ácido láctico-co-glicolídeo) (PLGA).

Produtos hidrolíticos (ácido hidroxicapróico), derivados da degradação da cadeia polimérica de ligação estão mostrados na Fig. 3.8. Esta clivagem randômica da cadeia polimérica provoca um decréscimo inicial do peso molecular que atinge 5000g/mol . A perda de peso inicia-se pela difusão de pequenos fragmentos.

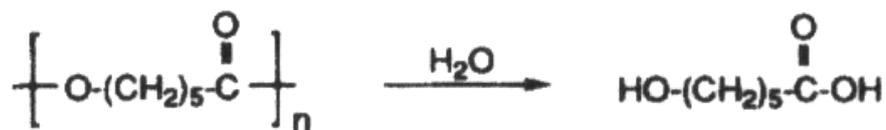


Figura 3.8: Produto de hidrólise do poli(caprolactona)

No presente trabalho, poliuretanos biodegradáveis foram projetados através da introdução de dióis de poli(caprolactona) (PCL) nos segmentos macios do esqueleto do polímero.

3.3.2 Catalisadores

O octoato de estanho é utilizado como catalisador na síntese do poliuretano. Os catalisadores de organometálicos são usados para acelerar a reação de formação de uretano. O octoato de estanho é o mais usado em espumas flexíveis. Os elastômeros microcelulares, os sistemas de RIM e os elastômeros moldados por vazamento são catalisados pelo dilaurato dibutil de estanho ou dibutil estanho mercaptídeo. Os catalisadores organometálicos formam um complexo com o grupo isocianato e a hidroxila do poliól. A formação deste complexo é inibida pelo impedimento estérico. Este efeito estérico é utilizado num tipo de catalisador de ação retardada, isto é, catalisadores pouco ativos na temperatura ambiente, mas efetivos em temperaturas mais altas.

3.4 Injetabilidade

O aumento e a reposição de volume dos tecidos moles são dos mais procurados procedimentos em todo o mundo, há séculos, e têm se tornado cada vez mais importantes, à medida que os pacientes e cirurgiões requerem mais e melhores resultados funcionais e estéticos, sem maiores procedimentos cirúrgicos.

Nos últimos anos, principalmente, tem ocorrido um enorme interesse pelos materiais a serem administrados sob a forma injetável para preenchimento e aumento de tecidos moles. Como resultado, este é um campo muito promissor para pesquisas e o desenvolvimento de novos materiais tem possibilitado o emprego destas substâncias para tratamento em humanos (ELSON, 1995), especialmente pelos cirurgiões que tratam de estética e recomposição de tecidos moles, usando técnicas minimamente invasivas.

Bernardes *et al* (2003) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar-se o comportamento do polietileno gel como um material para ser usado para a reposição de volume ou aumento de tecidos moles e para estudar-se as reações teciduais que se seguem à sua infiltração no subcutâneo dorsal de ratos. Uma infiltração de 01 cc de polietileno gel foi efetuada na região subcutânea dorsal de 24 ratos brancos, machos, pesando cerca de 200 gramas cada um, sob anestesia geral, tricotomia e assepsia. Os animais foram separados em oito grupos e foram sacrificados 7 (G1), 30 (G3), 45 (G4), 60 (M5), 180 (M7) e 365 (M8) dias após a infiltração da substância a ser estudada. Os espécimes foram removidos em bloco e foram preparados para o exame histopatológico. Este foi realizado ao microscópio óptico e foi realizada também a análise morfométrica dos dados obtidos. Os resultados foram submetidos à análise estatística (Kruskal-Wallis).

Assim, por exemplo, o uso de substâncias líquidas ou injetáveis para reposição de deficiências de volume pode ser útil, dentre outras situações, para o tratamento de rugas periorais ou periorbitais, devolvendo o contorno adequado para regiões onde existam sulcos de expressão.

Outro fim para as substâncias injetáveis seria a reposição de volume na órbita, pois para se tratar adequadamente a cavidade anoftálmica é necessária a reposição do volume perdido após a realização de uma enucleação ou uma evisceração, o que pode ser obtido com a utilização de esferas aloplásticas ou enxertos autólogos.

Ao escolher-se o implante subcutâneo apropriado há que se entender perfeitamente as características dos diversos materiais disponíveis. Nenhum deles possui tudo o que se espera do material de preenchimento ideal (DURANTI et al, 1998).

O material ideal a ser utilizado para devolver volume para os tecidos moles deve ter algumas características, tais como: possuir textura, distensibilidade e cor semelhante aos

tecidos vizinhos, ser inerte, persistir no local de implantação, não transmitir ou causar doenças e se integrar com o hospedeiro (SCLAFANI *et al*, 1977).

Além disso, para outros casos, o material ideal deve ser instável, resistente e biocompatível, de forma que haja espaços virtuais que possam ser preenchidos pelo rápido crescimento fibrovascular, o que vai propiciar o transporte de células de defesa que combaterão infecções dentro do implante (SCLAFANI *et al*, 1997).

3.5 Esterilização

Usualmente a esterilização de materiais aplicados à medicina é feita com sistema de autoclavagem (alta pressão) com secagem a quente. As técnicas mais comuns para esterilizar matriz de colágeno são o EO (óxido de etileno gasoso) ou irradiação gama. A esterilização com raios gama demonstrou ser mais simples e efetiva para esterilizar materiais sem produzir substâncias tóxicas; entretanto, este processo quebra ligações químicas, diminuindo a resistência da matriz de colágeno (NOAH *et al*, 2002).

Um trabalho de Masson *et al.* (1997), realizado com nanopartículas de PCL esterilizadas com raios Gama (2,5 M Rad), usando o cobre como fonte, provocou depolimerização do PCL, deixando-o quebradiço, provavelmente provocado pela separação da fase cristalina. Revelou, também, uma acentuada instabilidade em sua estrutura indicada pela rápida degradação enzimática, uma vez em contato com o tecido. Por outro lado, a esterilização com infiltração de EO manteve as propriedades mecânicas e físicas da matriz, mas com alto risco de resíduos tóxicos. Esses resíduos sofreram uma redução a níveis compatíveis após duas a três semanas de aeração (STAVRIDIS *et al.*, 2003).

Trabalhos realizados por Kenar *et al.* (2006) demonstraram a eficiência da esterilização em etanol 70% por 12 horas e lavagens múltiplas em PBS estéril.

3.6 Métodos de caracterização e avaliação de propriedades

A escolha do ensaio mais interessante ou mais adequado para cada material depende da finalidade deste, dos tipos de esforços que esse material vai sofrer e das propriedades mecânicas que se deseja medir.

3.6.1 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

O FTIR é uma ferramenta poderosa no estudo das propriedades estruturais dos materiais, independente do seu caráter amorfo ou cristalino. A radiação infravermelha é caracterizada por comprimentos de onda entre 800 e 1000000 nm. Nas moléculas, os átomos e os grupos atômicos estão em contínuo movimento, uns em relação aos outros (vibrações moleculares). Quando as moléculas são sujeitas à radiação infravermelha com energia semelhante à correspondente a essas vibrações, elas podem alterar o seu estado de vibração (excitação), absorvendo a radiação correspondente à diferença de energia entre o estado inicial e o estado excitado. Essas vibrações podem ter amplitudes e velocidades diferentes e ocorrem em torno das ligações covalentes que une os átomos ou grupos de átomos. A energia das vibrações é quantizada. Assim, através da comparação dos valores de energia da radiação infravermelha para os quais há absorção, é possível identificar as moléculas ou os tipos de moléculas presentes nas amostras (AYRES, 2006).

Tratando de poliuretanos segmentados, também podemos obter outras informações que estão diretamente associadas às propriedades finais do material. Geralmente considera-se que existe uma separação de microfases devido à incompatibilidade entre o segmento rígido e o segmento macio. Tais poliuretanos são capazes de formar ligações de hidrogênio nas quais o doador de prótons é o grupo N-H da ligação uretano, ao passo que os grupos receptores podem incluir tanto a carbonila e o átomo de oxigênio adjacente da própria ligação uretano como a carbonila da ligação éster, quando o segmento macio for um poliéster, ou o átomo de oxigênio da ligação éter, quando o segmento macio for um poliéter. A presença das ligações de hidrogênio se manifesta pelo deslocamento das bandas de absorção do estiramento dos grupos N-H e C=O para frequências mais baixas que aquelas observadas quando estes grupos não estão associados através de ligações de

hidrogênio (AYRES, 2006). A Tabela 3.2 reporta as principais bandas de absorção no infravermelho para poliuretanos.

Tabela 3.2: Principais bandas de absorção na região do infravermelho características de poliuretanos e nanocompósitos (LIMEÑAMA, 2005)

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3446	ν N-H (livre)
3330	ν N-H (ligado)
3000-2840	ν C-H
2270	ν N=C=O
1729	ν C=O (éster e uretano livre)
1707	ν C=O (éster e uretano ligado)
1700-1690	ν C=O (uréia livre)
1675-1660	ν C=O (uréia desordenada ligada)
1640	ν C=O (uréia ordenada ligada)
1610-1550	ν sim COO ⁻
1520	ν C-N + δ N-H
1470-1430	δ assim CH ₃
1475-1450	δ CH ₂
1450-1400	ν sim (COO ⁻)
1395-1365	δ sim CH ₃
1243	ν assim N-CO-O + ν (C-O-C)
1163	ν (C-O-C)
1078	ν sim N-CO-O + ν (C-O-C)
954	ν C-O-C
1038	ν Si-O
524	ν Si-O-Al
462	δ Si-O-Si

3.6.2 Ensaio mecânico de tração

A facilidade de execução e a reprodutividade dos resultados tornam o ensaio de tração o mais importante de todos os ensaios mecânicos relativos á polímeros. A aplicação de uma força num corpo sólido promove uma deformação do material na direção do esforço e o ensaio de tração consiste em submeter um material a um esforço que tende a esticá-lo ou alongá-lo. Com este tipo de ensaio, pode-se praticamente afirmar que as deformações promovidas no material são uniformemente distribuídas em todo o seu corpo, pelo menos até ser atingida uma carga máxima próxima do final do ensaio e, como é possível fazer com que a carga cresça numa velocidade razoavelmente lenta durante todo o teste, o ensaio de tração permite medir satisfatoriamente a resistência do material. Tal parâmetro é determinado no ensaio estático de tração e corresponde à relação entre a carga máxima, suportada pelo corpo-de-prova constituído do material a ser ensaiado.

No ensaio de tração, uma amostra do material (corpo de prova) é submetida a um esforço longitudinal. O corpo de prova tem dimensões padronizadas definidas por normas. As extremidades recebem garras do equipamento de medição. A Figura 3.9 mostra um arranjo básico, apenas ilustrativo e sem escalas.

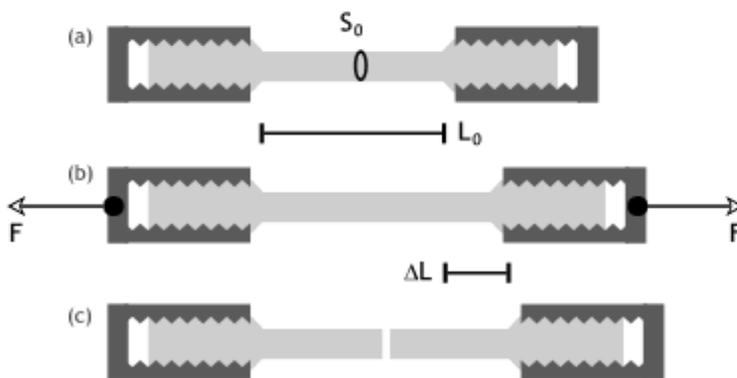


Figura 3.9 (a, b, c): Na condição inicial, a parte central tem um comprimento L_0 e área transversal S_0 . O equipamento de ensaio aplica gradativamente, a partir do zero, uma força de tração no corpo de prova. Assim, de forma genérica, pode-se dizer que, a cada valor de força aplicada F , corresponde uma deformação ΔL do corpo (AYRES, 2006).

Em princípio, seria possível estudar a relação F versus ΔL , mas o resultado ficaria dependente do material e das dimensões do corpo de prova. Para obter resultados dependentes apenas do material, são usadas grandezas relativas.

No lugar da força, é usada a tensão de tração σ , que é a relação entre força e área da seção transversal. No ensaio mais típico, considera-se apenas a área inicial do corpo:

$$\sigma = F / S_0 \quad (\text{Equação 3.1})$$

ε , no lugar da deformação absoluta, é usada a deformação relativa ao comprimento inicial L_0 :

$$\varepsilon = \Delta L / L_0 \quad (\text{Equação 3.2})$$

O valor de ε pode também ser dado em percentual, bastando multiplicar a igualdade anterior por 100. E gráficos aproximados da relação tensão x deformação podem ser vistos na Figura 3.10.

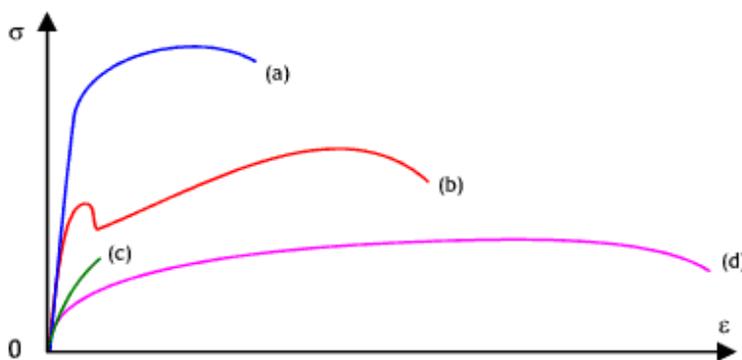


Figura 3.10: (a) é uma curva típica para aços de alta resistência; (b) curva para aços de baixo / médio carbono. (c) para ferro fundido cinzento; (d) para materiais bastante maleáveis como cobre.

Considera-se agora a curva que tem mais fases distintas, que é (b) da Fig. 3.10 (aços de baixa dureza). A Fig. 3.11 mostra a curva típica e a Fig. 3.12 fornece uma ampliação da parte inicial OE. A Figura 3.11 mostra que em B, ocorre a tensão máxima e, em R, a ruptura do corpo de prova. A tensão σ_B é a **tensão máxima**, também denominada

resistência à tração do material. Em referências de língua inglesa, esse valor pode ser representado por σ_U ou S_U ("ultimate strength"). É também comum o uso da expressão "tensile strength" para esse parâmetro. A tensão em R é a **tensão de ruptura** σ_R ou "breaking strength" em inglês.

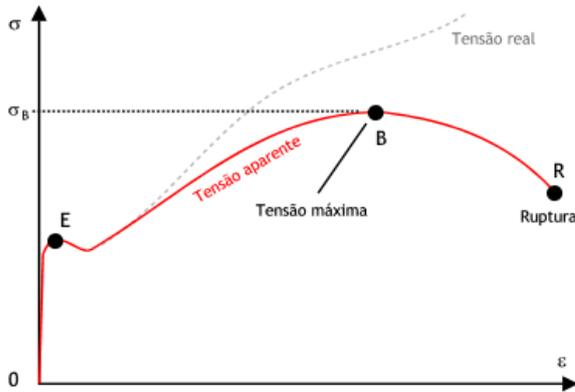


Figura 3.11: Curva tensão-deformação

Um material é dito ter comportamento elástico se, uma vez removido o esforço, as dimensões retornam àquelas antes da aplicação do mesmo, isto é, não há deformações permanentes.

A tensão máxima na região elástica é o **limite de elasticidade** σ_L do material. Dentro da região elástica, no trecho OP, a tensão é proporcional à deformação, isto é, o material obedece à **lei de Hooke**:

$$\sigma = E \varepsilon \quad (\text{Equação 3.3})$$

Onde E é o **módulo de elasticidade** do material (não tem relação com o ponto E da curva). Para aços, um valor típico de E é $2,06 \cdot 10^5$ MPa. Portanto, a tensão σ_p é o **limite de proporcionalidade** do material (Fig. 3.12). O ponto L marca o início da região plástica ou escoamento do material, significando a existência de deformações residuais permanentes. É usual considerar início ou **limite de escoamento** σ_E a tensão que produz uma deformação residual.

$\varepsilon = 0,002$ ou $0,2\%$

(ponto E conforme Figura 3.12).

Em referências de língua inglesa, é comum o uso da letra Y ("yield") para esse limite (σ_Y ou S_Y).

Depois do limite de escoamento há uma significativa redução da área da seção transversal e a tensão real segue algo como a curva tracejada da Figura 3.11. Mas a convenção é usar tensão aparente, em relação à área inicial.

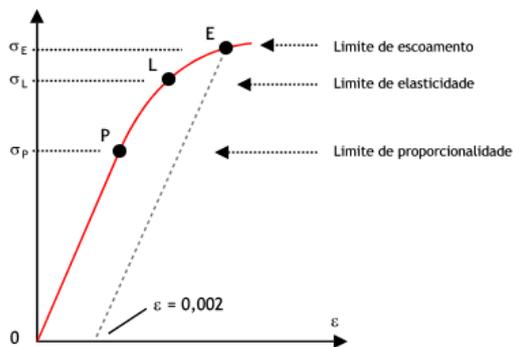


Figura 3.12: trecho 0L é a região elástica do material, ou seja, o comprimento retorna ao valor L_0 se o ensaio for interrompido nessa região.

Dois fatores determinantes para a realização de um dado tipo de ensaio mecânico são a quantidade e o tamanho das amostras a serem testadas. A especificação do produto deve mencionar estes fatores, bem como a maneira de retirar as amostras para os testes, a fim de que os mesmos sejam representativos do material a ser ensaiado, devido à possibilidade de variações nas propriedades, conforme a região do material de onde foi retirada a amostra.

As propriedades mecânicas de poliuretanos segmentados são largamente influenciadas pela morfologia desses polímeros. De modo geral, o módulo é determinado pelas características do domínio rígido ao passo que o domínio macio tem influência na natureza elástica. Segundo Miller *et al.* (1985), o comportamento mecânico de elastômeros termoplásticos durante um teste de tração está relacionado com parâmetros tais como tamanho, cristalinidade, e interconectividade dos domínios rígidos bem como a natureza da interface e também a presença de segmentos rígidos no domínio macio (mistura de fases), além da habilidade dos segmentos macios se cristalizarem quando submetidos à deformação. O

aumento do grau de ligações de hidrogênio entre as cadeias, por exemplo, à formação de filmes mais rígidos (AYRES, 2006).

3.7 Citotoxicidade *in vitro*

Inúmeros fatores devem ser examinados antes que um material possa ser utilizado como implante. Além de satisfazer critérios de funcionalidade para a aplicação específica a que se destina, os biomateriais devem ser biocompatíveis ao meio fisiológico. O implante deve induzir uma resposta controlada pelo meio fisiológico e os tecidos locais e remotos não devem sofrer danos pela presença do material. Efeitos adversos nos materiais de implante são, por exemplo, corrosão de implantes metálicos e cerâmicos ou degradação de polímeros pelos fluidos do corpo. Efeitos locais desfavoráveis são caracterizados por necroses ou reabsorção do tecido, reações celulares e ação de bactérias que podem acusar infecções. As possíveis reações sistêmicas são hipersensibilidade, toxicidade e carcinogenicidade. A avaliação de biomateriais requer a avaliação *in vitro* a partir de cultura de células, possibilitando verificar a resposta em termos de proliferação, crescimento, mutações genéticas, citotoxicidade, genotoxicidade, hemocompatibilidade, e fazer uma triagem inicial (BOSCHI, 1995).

Um dos primeiros testes é o da citotoxicidade, onde o biomaterial é colocado em contato com células de mamíferos de uma maneira direta ou indireta. Observa-se o nível de letalidade das células que define se o material é ou não citotóxico. Segundo a ISO (International Organization for Standardization) a seleção e avaliação de qualquer material ou artefato com pretensão de uso em humanos requer um programa estruturado de avaliação. A função da ISO 10993 é servir como uma estrutura para planejar uma avaliação biológica que minimize o número de exposições e o número de animais. Os ensaios *in vitro* são normalmente efetuados como um teste de triagem inicial na primeira fase da avaliação da biocompatibilidade, minimizando o uso de animais em pesquisa (BOSCHI, 1995).

A determinação da citotoxicidade pode ser através de avaliação qualitativa ou quantitativa. A avaliação qualitativa é realizada pelo exame microscópico das células para verificação

de mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento, quebra celular ou de membrana e o resultado é relatado como atóxica, leve, moderada ou severa citotoxicidade, que também pode ser numérico. Na avaliação quantitativa é realizada medida de morte celular, proliferação celular ou formação de colônias celulares. O número de células, quantidade de proteínas, liberação de enzimas, liberação ou redução de corante vital ou outro parâmetro de medida pode ser quantificado por meios objetivos.

Uma das primeiras etapas de avaliação do material biomédico é a avaliação biológica *in vitro*, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com o auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular.

3.7.1 Células tronco mesenquimais

Células tronco são as células com capacidade de auto-replicação, isto é, com capacidade de gerar uma cópia idêntica a si mesma e com potencial de diferenciar-se em vários tecidos. Sendo assim, estas células podem ser encontradas nos mais variados tecidos do corpo – tecido nervoso, sangue, córnea, retina, coração, tecido gorduroso, pele, polpa dentária, vasos sanguíneos, músculo esquelético e intestinos (WEISS, 2005), sendo as da medula óssea, placenta e cordão umbilical as mais utilizadas (SANTOS *et al.*, 2004).

A medula óssea é um órgão composto por duas linhagens celulares distintas e dependentes, a hematopoiética e o estroma associado, que formam um sistema cooperativo. O estroma medular está relacionado à manutenção de um microambiente no qual as CT-

hematopoiéticas se mantêm e a progênie diferenciada recebe os sinais necessários para a maturação celular (SCHWINDT *et al*, 2005).

As células do estroma medular, também conhecidas como células tronco mesenquimais ou unidades formadoras de colônias fibroblásticas, são células tronco não-hematopoiéticas multipotentes que aderem a placas de cultura (WEISS, 2005).

As células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea têm a capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular (CAMPAGNOLI *et al*, 2001; ROMANOV *et al*, 2003). Estas células foram descritas primeiramente por Friedenstein em 1974, que descobriu que as CTMs aderem a placas de cultura, assemelham a fibroblastos “*in vitro*”, e formam colônias (JAVASON, 2001; JOHNSTONE, 2002). Recentemente, as CTMs têm atraído a atenção de vários pesquisadores, pois são de grande interesse para serem usadas no tratamento de diversas doenças humanas. Muitos estudos têm isolado as CTMs e tem controlado, *in vitro*, a sua diferenciação em tecido cartilaginoso e osso utilizando fatores de crescimento específico, com o objetivo de usar esta nova tecnologia no reparo de tecidos de origem mesenquimal lesados (MARTIN *et al*, 1998; PITTENGER *et al*, 1999).

As células tronco mesenquimais são a fonte de tecido que envolve a medula óssea e, portanto, espera-se que elas se diferenciem em células das linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro*. Com freqüência ocorre mineralização da matriz extracelular e expressão de marcadores fenotípicos, que indicam a presença de células dessas três linhagens na cultura. No entanto, é o comportamento de linhagens clonais após transplante, e não o fenótipo observado *in vitro*, que define o grau de potencialidade das células tronco mesenquimais. Nesse sentido, após o transplante de células derivadas de uma única colônia (clones) observou-se reconstituição da medula óssea com células clonais do doador, compreendendo todo o estroma e adipócitos (BIANCO *et al*, 2001).

3.7.2 Característica da estrutura x proliferação celular

A matriz polimérica escolhida deve permitir a adesão e ligação dos tecidos , porque células são dependentes de uma matriz de suporte ordenada em meio ambiente adequado para que as células possam sobreviver, proliferar, neoformar tecido-vascular e dar funcionalidade ao tecido reconstruído. Por outro lado, o material biodegradável deve ter uma média controlada de moléculas degradadas, e com relativa facilidade de metabolização.

3.7.3 Atividade de fosfatase alcalina

O ensaio de fosfatase alcalina (coloração celular por BCIP) é realizado para verificar a porcentagem de células tronco no cultivo celular e também para verificar se as células estão em fase proliferativa. Este ensaio é baseado na reação cromagênica iniciada pela clivagem do grupo de fosfato BCIP pela fosfatase alcalina presente nas células. Esta reação produz um próton o qual reduz NBT em um precipitado arroxeadado insolúvel (Figura 3.13).

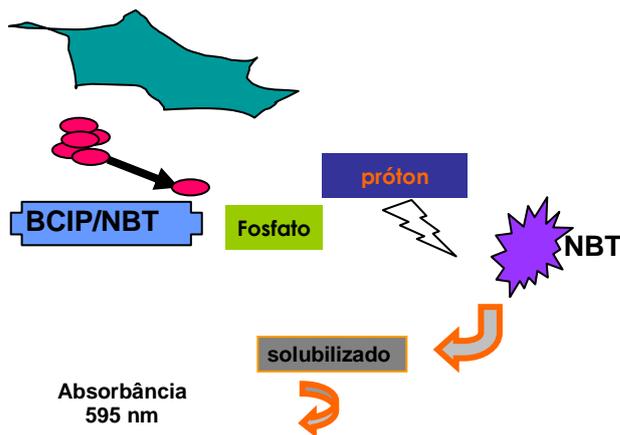


Figura 3.13: Produção de fosfatase alcalina- ALP.

Rapidamente, o sobrenadante de cada poço é removido e a camada de célula é lavada duas vezes com PBS. Então, 200 µl de solução de BCIP-NBT, preparado de acordo com o protocolo do fabricante que é adicionado a cada poço. Após duas horas de incubação, as células são observadas em Microscópio Óptico e o precipitado arroxeadado insolúvel é solubilizado com 210 µl de SDS 10% HCL e incubados durante 12 horas. A medida de densidade óptica é feita a 595 nm em um espectrofotômetro (Multiskan MCC/340, Labsystems).

3.7.4 Viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular pode ser avaliada por ensaio de MTT. Após 96 horas de incubação na presença de cada amostra, a viabilidade das células tronco é avaliada pelo ensaio de MTT, baseado na redução do sal tetrazólium para formação de cristais de formazan pelas mitocôndrias presentes nas células vivas (Figura 3.14).

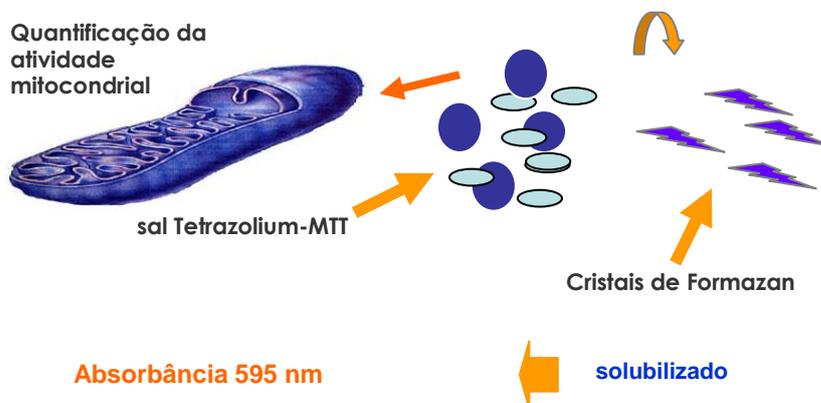


Figura 3.14: Viabilidade Celular-MTT.

Aproximadamente 60 µl de MTT (5 mg/ml) são adicionados a cada poço. Duas horas mais tarde, a morfologia da célula é analisada pelo Microscópio Óptico invertido e os sais de formazan são solubilizados com SDS 10% HCL. Após incubação por 12 horas, a medida de densidade óptica é feita a 595 nm em um espectrofotômetro (Multiskan MCC/340, Labsystems).

3.7.5 Dosagem de colágeno

A produção do colágeno pelas células tronco é avaliada pelo ensaio de SIRCOL no sobrenadante das culturas. Este método é baseado na propriedade de ligação seletiva do corante syrius-red a porção terminal [Gly-X-Y] tripeptídeo da molécula de colágeno de mamíferos. O colágeno solubilizado é quantificado por análise de densidade óptica a 495 nm (Figura 3.15).

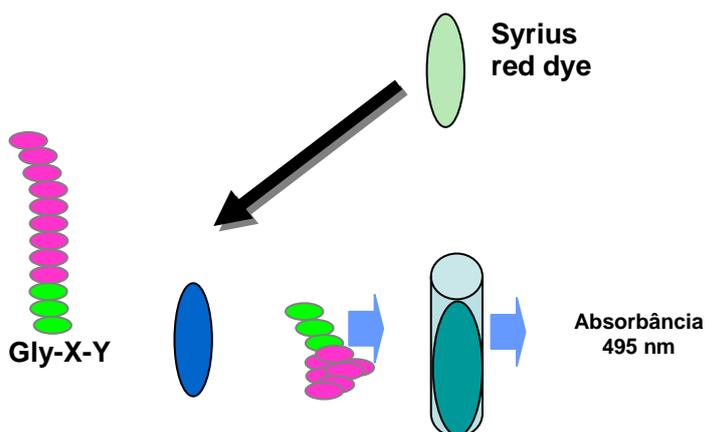


Figura 3.15: Produção de colágeno.

A quantidade de colágeno é calculada baseada na regressão linear da medida de concentração de um padrão do colágeno tipo I previamente conhecida.

3.8 Fotopolimerização

O desenvolvimento de sistemas adesivos e resinas compostas fotoativadas estabeleceram uma nova etapa na área da odontologia restauradora. Paralelamente, a utilização da luz visível tornou-se imprescindível para a polimerização de muitos outros materiais utilizados no âmbito da prostodôncia, periodontologia, medicina dentária preventiva, ortodôncia, entre outros. Para assegurar uma adequada fotopolimerização das resinas compostas deve ter-se em conta três principais factores: a intensidade de luz emitida, a sua distribuição espectral e o tempo de polimerização (NOMOTO, 1997).

Os aparelhos de luz mais divulgados e utilizados na prática clínica diária são compostos por lâmpadas de halogênio que emitem luz visível. As lâmpadas de halogênio produzem luz por incandescência (Figura 3.16), em que um filamento ao ser aquecido, conduz à excitação de átomos sobre uma vasta gama de níveis energéticos, produzindo um largo espectro de ação, onde está contida a porção azul de interesse na polimerização das resinas compostas (Figura 3.17). Para selecionar apenas esta região azul são utilizados filtros para bloquear a emissão de comprimentos de onda indesejáveis (MILLS, 1999).



Figura 3.16



Figura 3.17



Figura 3.18

Uma das mais sérias limitações associadas à tecnologia de halogênio diz respeito ao seu tempo de vida efetivo limitado de 50 a 100h de uso contínuo. O calor dissipado pela lâmpada gera temperaturas elevadas que provocam uma progressiva degradação dos filtros, lâmpadas e sistemas condutores, conduzindo, invariavelmente, a uma diminuição da intensidade de luz emitida ao longo do tempo. Na figura 3.18 podem-se observar zonas escuras na extremidade da ponta de um fotopolimerizador resultantes da degradação dos sistemas condutores (fibras ópticas) (MILLS, 1999).

O interesse na Fotoquímica de Polímeros tem crescido nas últimas décadas devido não somente ao grande número de novas aplicações como também à repercussão do ponto de vista econômico, técnico e ecológico. A fotopolimerização/fotocura tem recebido atenção especial devido às incontáveis aplicações e a sua importância na área de Materiais.

Atualmente a Fotoquímica constitui uma área de pesquisa multidisciplinar que está tendo um grande desenvolvimento tanto em nível acadêmico como industrial. Entretanto, devido à dificuldade inerente à incorporação de luz artificial a um processo industrial há uma

defasagem entre os aspectos básicos e aplicados da Fotoquímica (ALLEN & RABEK, 1985). Em nível industrial, a busca de sistemas livres de solventes orgânicos, de baixo custo energético e de aplicação rápida mesmo à temperatura ambiente tem motivado a incorporação de processos baseados na Fotoquímica de Polímeros (CATALINA et al, 1982; HODGE, 1980).

CAPÍTULO 4

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Poli(caprolactona diol) (PCL, $\overline{M}_n = 1250 \text{ g.mol}^{-1}$), poli(propileno glicol) (PPG, $\overline{M}_n = 1000 \text{ g.mol}^{-1}$), 2-hidroxietil methacrilato (HEMA), (\pm)-camforquinona, 97% (CQ), 2-(dimetilamino)etil methacrilato (DMAEM) e dibutil dilaurato de estanho (DBTL). Todos estes reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich exceto o isoforona diisocianato (IPDI), cedidos pela Bayer (Brasil), e todos estes materiais foram empregados neste estudo sem qualquer tipo de tratamento.

4.2 Síntese de Poliuretano acrilato

Dois tipos de PU acrilato foram preparados através da introdução de grupos vinílicos nos terminos das cadeias do poliuretano usando HEMA: 1- PUA-PPG: poliuretano baseado em segmentos macios sintetizados a partir do PPG. Este polímero foi projetado para apresentar grande estabilidade frente à hidrólise (não biodegradável). 2- PUA-PCL: poliuretano baseado em segmentos macios sintetizados a partir de PCL. Este polímero foi projetado para apresentar grande susceptibilidade a água (biodegradável). Um balão de vidro de três vias equipado com uma manta de aquecimento, um agitador mecânico, um termômetro e um sistema de entrada para gás nitrogênio foram usados. Primeiramente foram adicionados PCL 1250 ou PPG 1000 e HEMA ao reator e agitados à temperatura de 50°C até alcançar uma massa homogênea. IPDI (NCO/OH razão de 1,5) foi adicionado em seguida. A mistura foi aquecida até 60°C e mantida por duas horas com agitação constante. Foi então adicionado ao sistema 0.01% de DBTL. A reação permaneceu a 60°C por uma hora, quando foi novamente adicionado 0.01% de DBTL. A reação permaneceu por mais uma hora e foi monitorada pelo FT-IR até o desaparecimento do pico de absorção do grupo NCO a 2270 cm^{-1} .

4.3 Preparação dos filmes de PUA

Dois diferentes tipos de polímeros fotopolimerizáveis usando luz visível foram preparados a partir de PUA derivados de PPG e PCL (Tabela 4.1). O fotoiniciador (CQ) foi incorporado em cada amostra. O teor de fotoiniciador foi fixado em 1.0% em massa do polímero e DMAEM foi usado como catalisador para a cura. Os filmes foram preparados vazando as misturas em moldes de Teflon e expondo-as à luz halógena através do aparelho Degulux® soft-start 12 V / 75 W por 1 minuto. A cura completa foi monitorada observando-se a diminuição do pico de intensidade de absorção (1620 cm^{-1}) da ligação C=C usando espectroscopia FTIR-ATR.

Tabela 4.1. Composição (% em massa) dos PUAs sintetizados

	PCL 1250	PPG1000	HEMA	IPDI	CQ	DMAEM
PUA/PPG		68,20	8,80	22,80	0,10	0,10
PUA/PCL	72,84		7,60	19,40	0,08	0,08

- 1) Razão molar NCO/ OH = 1,5.
- 2) Teor de catalisador foi 0,02% de DBTL sobre a quantidade em massa de IPDI e PPG ou PCL.

4.4 Caracterização

Os espectros de infravermelho foram coletados no espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR; Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000). As medidas foram efetuadas usando a técnica de reflectância total atenuada (ATR). Cada espectro resultou de 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} .

Medidas de inchamento foram obtidas com a imersão das amostras em água e N, N Dimetilformamida (DMF) na temperatura ambiente por 24 h e a % de inchamento foi calculada pela equação:

$$Q = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100 \quad (4.1)$$

Onde m_0 é o peso do filme seco após 48 h a 50°C e m é o peso após a absorção do solvente. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes com cada amostra.

Para a avaliação da injetabilidade, os polímeros dentro de seringas de 20 ml foram forçados com uma pressão de $2,55 \cdot 10^6$ Pa por 1 minuto. Um poli(metacrilato de metila) comercial foi usado como controle. A quantidade de cada polímero dispensada no recipiente foi mensurada.

As propriedades mecânicas foram avaliadas utilizando-se uma máquina de teste universal (EMIC-DL3000) movimentada a 10 mm/min usando amostras preparadas conforme ASTM D-638. Os testes foram realizados na temperatura ambiente e seis ensaios com as amostras de cada PUA foram executados para reportar a média com um desvio padrão menor que 5%.

4.5 Caracterizações *in vitro*

4.5.1 Cultura de células tronco mesenquimais não diferenciadas

As amostras de medula óssea foram obtidas a partir de fêmures e tíbias de ratos adultos (250 g) da linhagem Wistar (2 ratos para cada extração). Os animais foram sacrificados por câmara de gás CO₂ e tiveram os dois fêmures e tíbias dissecados, eliminando os tecidos muscular e conjuntivo associados. Em seguida foram feitos dois cortes na região das epífises, removendo-as, possibilitando a entrada da agulha na cavidade medular, onde foram injetados 10 mL de DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium - GibcoBRL) sem soro.

O material obtido foi ressuspensão e centrifugado a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sedimento recuperado contendo as células foi ressuspensionado em solução de lise de hemácias (17 mM de Tris-HCl pH 7,2 contendo 140 mM NH₄Cl) por 5 minutos a 37°C.

Após duas lavagens, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de DMEM com 20% de soro fetal bovino (FBS) e então as células foram contadas, utilizando Trypan Blue (GibcoBRL) para acessar a viabilidade das células extraídas. Por final as células foram cultivadas em frascos T25 contendo 15 mL de meio de cultura composto por DMEM 20% SFB acrescido de 1% de penicilina e estreptomicina (StemCell Technology) e de 4% de L-glutamina (GibcoBRL).

Foram plaqueadas 1×10^6 células na cultura mais antiga e 3×10^6 células na cultura considerada nova. As células foram mantidas em estufa a 37 °C em 5% de CO₂ e umidade de 95%. O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias, retirando-se 4 mL do meio acondicionado e substituindo-se por 4 mL de meio fresco.

Quando as células em cultivo alcançaram confluência de aproximadamente 80%, foi feita a passagem. Removendo o meio de cultura do frasco, as células mesenquimais aderentes permaneceram aderidas ao frasco. Essas células foram lavadas com DMEM sem soro para remover o FBS residual e depois incubadas com 1 mL de tripsina e EDTA (StemCell Technology), a 37 °C até se destacarem (cerca de 4 minutos). Às células já soltas, adicionou-se então um meio de cultura com 20% de FBS para neutralizar a ação da tripsina. As células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos, então o sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspenso em meio de cultura completo (DMEM + 20% FBS). Essas células foram divididas em novos frascos de 25 cm² para cultura. A cultura de células sofreu 4 passagens, sendo que na primeira a concentração foi de 1:4, na segunda, terceira e quarta passagens foi de 1:10.

4.5.2 Viabilidade celular (MTT)

A viabilidade celular dos biomateriais sintetizados foi avaliada por ensaio de MTT. Após 72 horas de incubação na presença de cada amostra esterilizada em autoclave (calor úmido) a 121°C, durante 20 minutos e pressão de 1 Kgf/cm², a viabilidade das células tronco foi avaliada pelo ensaio de MTT, baseado na redução do sal tetrazólium para formação de cristais de formazam pelas mitocôndrias presentes nas células vivas.

Aproximadamente 60 µl de MTT (5 mg/ml) foram adicionados a cada poço. Duas horas mais tarde, a morfologia da célula foi analisada pelo Microscópio Óptico invertido e os sais de formazan foram solubilizados com SDS 10% HCL. Após incubação por 12 horas, a medida de densidade óptica foi feita a 595 nm em um espectrofotômetro (Multiskan MCC/340, Labsystems).

4.5.3 Atividade de fosfatase alcalina

O ensaio de fosfatase alcalina (coloração celular por BCIP) foi realizado para verificar a porcentagem de células tronco no cultivo celular e também para verificar se as células estavam em fase proliferativa. Este ensaio é baseado na reação cromagênica iniciada pela clivagem do grupo de fosfato BCIP pela fosfatase alcalina presente nas células. Esta reação produz um próton o qual reduz NBT em um precipitado arroxeado insolúvel.

4.5.4 Dosagem de colágeno

A produção do colágeno pelas células tronco foi avaliada pelo ensaio de SIRCOL no sobrenadante das culturas. Este método é baseado na propriedade de ligação seletiva do corante syrius-red a porção terminal [Gly-X-Y] tripeptídeo da molécula de colágeno de mamíferos. O colágeno solubilizado foi quantificado por análise de densidade óptica a 495 nm. A quantidade de colágeno foi calculada baseada na regressão linear da medida de concentração de um padrão do colágeno tipo I previamente conhecida.

4.6 Caracterizações *in vivo*

No procedimento *in vivo*, os animais receberam anestesia geral por meio da injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico 3% na dose de 1ml/kg de peso. Foi realizada tricotomia dos pêlos da região dorsal dos animais usando-se gilete montada. Após a assepsia, o poliuretano não fotopolimerizado foi inserido na seringa de 1 ml, a qual foi acoplada à agulha BD calibre 30x7, usada em procedimentos clínicos conservadores para preenchimento subcutâneo.

Foram utilizados 10 ratos no estudo *in vivo* para a implantação dos biomateriais, divididos conforme o tipo de biomaterial (PUA-PCL, PUA-PPG e PMMA) e de implantação (injetável ou cirúrgica). Na implantação injetável, 1 ml do biomaterial foi inserido no dorso de cada rato. Já na forma de implantação cirúrgica, foram inseridas amostras cilíndricas com dimensões padronizadas de 6 mm de diâmetro e 2 mm de altura e devidamente suturadas. A fotopolimerização final dos poliuretanos foi feita incidindo-se luz azul através da pele no dorso dos ratos após a implantação injetável. Para o grupo controle foi usado o PMMA - New Plastic 10% (Bioclinix).

), no qual os biomateriais foram apenas implantados na forma injetável, foram usados apenas dois dos dez ratos, sendo um sacrificado em duas semanas e um sacrificado em quatro semanas. Para cada um dos dois tipos de poliuretano fotopolimerizável foram usados quatro dos dez ratos. Dois submetidos a implantes na forma injetável e sacrificados, um em duas e o outro em quatro semanas, e dois submetidos a cirurgia para a implantação do biomaterial, sacrificados também nas mesmas duas e quatro semanas.

4.6.1 Coleta de material para estudo histopatológico

Após os intervalos de observação de 2 e 4 semanas os animais foram sacrificados em câmara de gás CO₂. Procedeu-se a retirada de retalho de pele acompanhado de partes moles em torno da área do implante. As peças cirúrgicas foram devidamente identificadas e imediatamente colocadas em solução fixadora (formaldeído a 10%). Uma vez fixadas, foram clivadas em cortes escalonados com espessura máxima de 3 mm. As amostras foram encaminhadas para processamento histológico, conforme as técnicas convencionais, até a inclusão em blocos de parafina. Foram obtidos no mínimo 3 e no máximo 6 cortes histológicos com 3,0 micrômetros de espessura, de cada material, tendo em vista as dimensões dos fragmentos. As lâminas receberam codificações aleatórias e foram coradas em Hematoxilina-eosina para a análise histológica básica e pelo Tricrômico de Masson para a avaliação de fibrose.

4.6.2 Estudo histológico

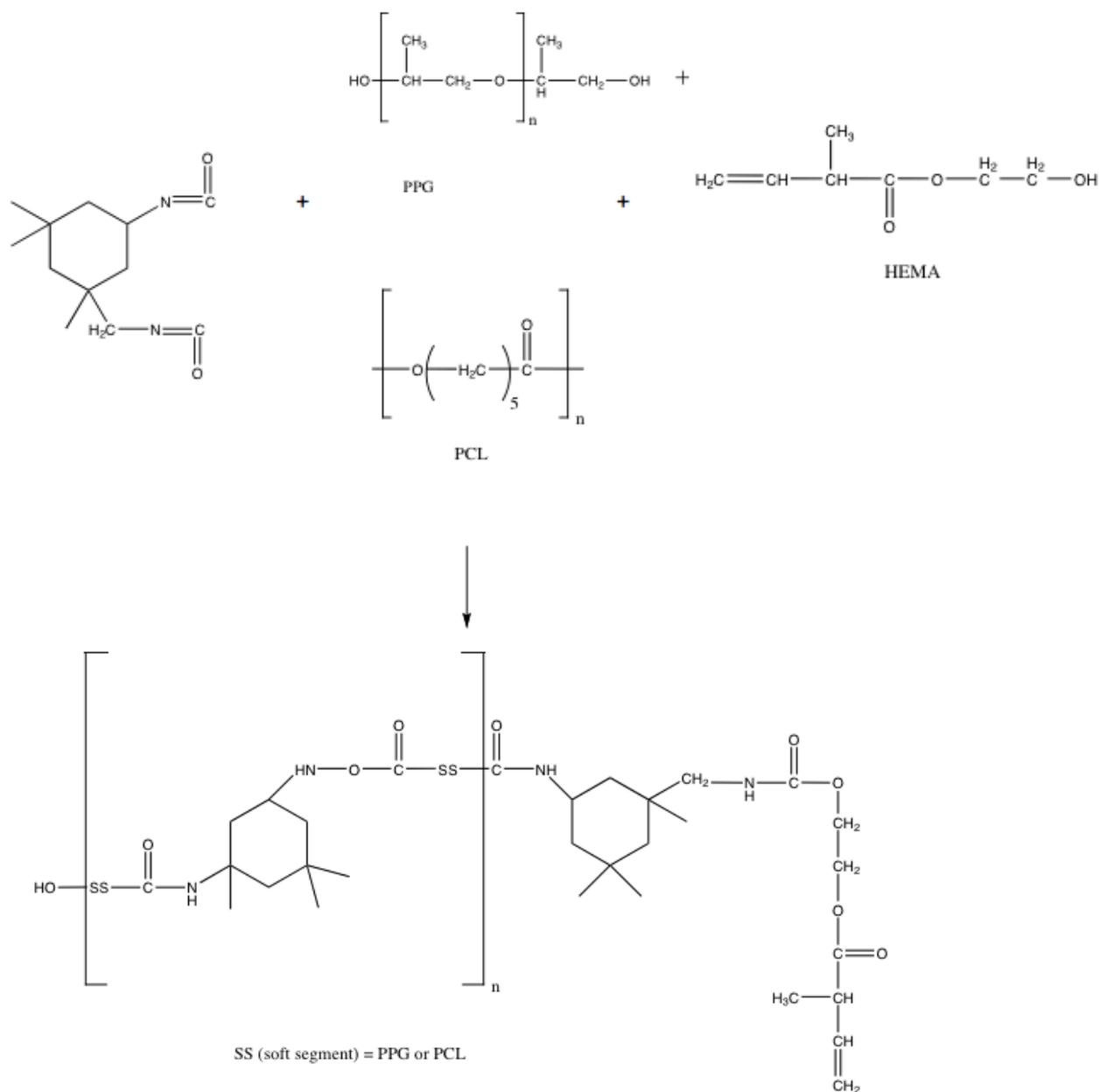
O estudo histopatológico foi realizado por um único patologista convidado do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, que examinou as lâminas sem o conhecimento prévio do tipo de material implantado em cada caso. Para a análise, utilizou-se a classificação de reações a corpo estranho proposta por Duranti *et. al.*, 1998 em cada uma das lâminas examinadas, descrita a seguir: Grau I: leve reação com poucas células inflamatórias, Grau II: reação inflamatória evidente, com uma ou duas células gigantes, Grau III: presença de resposta inflamatória, com fibrose, havendo linfócitos e células gigantes e Grau IV: formação de granuloma com implantes encapsulados e reação do tipo corpo estranho evidente.

CAPÍTULO 5

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Propriedades mecânicas

O objetivo deste estudo foi preparar poliuretanos baseados em PPG e PCL para serem aplicados no corpo na forma injetável e também capazes de serem moldados *in situ* na forma desejada antes da fotopolimerização. A preparação de cada biomaterial foi baseada no processo convencional de prepolímero. A reação do poliálcool com IPDI formou um prepolímero de poliuretano com grupos terminais NCO, os quais foram reagidos com HEMA para obter um poliuretano com duplas ligações carbono-carbono terminais. O IPDI é um diisocianato com dois grupos isocianato diferentes. O grupo isocianato alifático é dez vezes mais reativo que o grupo cicloalifático. Como os polióis contêm mais átomos de hidrogênio ativo do que o HEMA, previmos que prevalece a adição de segmentos macios aos grupos NCO primários, conforme ilustrado no Esquema 5.1.



Esquema 1: Representação esquemática das poliuretanas obtidas a partir do IPDI e diferentes segmentos flexíveis, PCL e PPG.

Análise dos prepolímeros via FTIR-ATR (Figura 5.1) revelou as principais bandas dos PUAs.

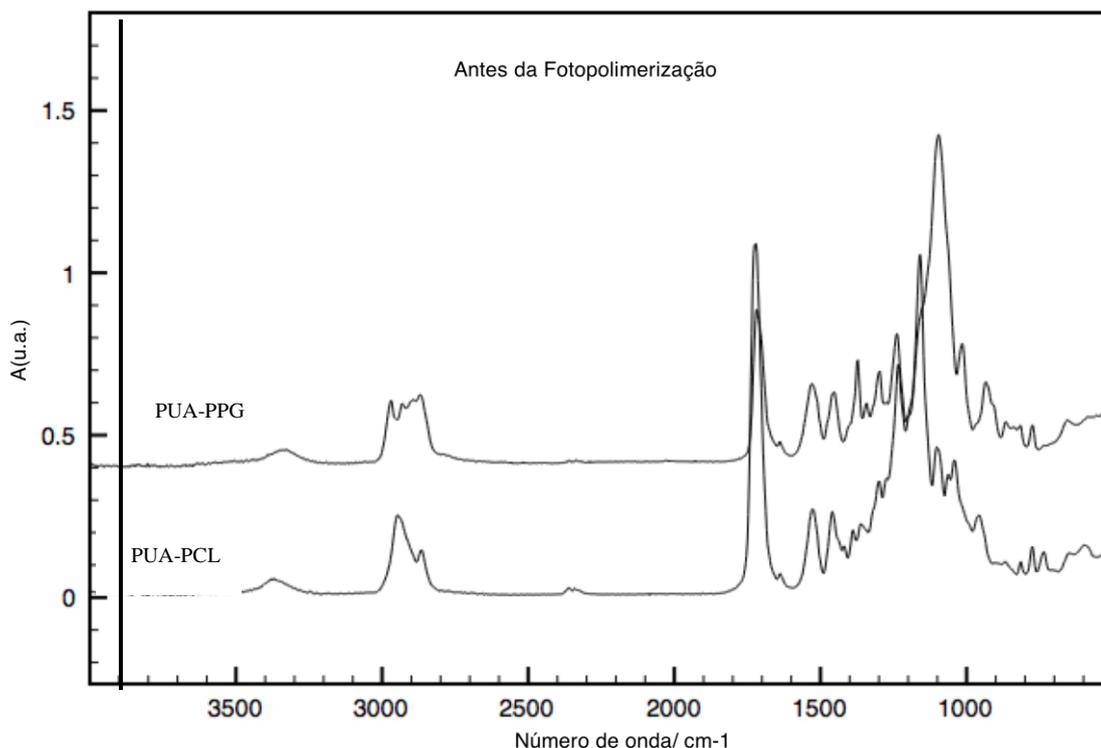


Figura 5.1: Espectros de FTIR das amostras PUA-PPG e PUA-PCL antes da fotopolimerização.

A banda característica de estiramento da carbonila foi observada entre 1740 cm^{-1} and 1600 cm^{-1} . As bandas em 1720 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} são atribuídas às carbonilas do grupo uretano livres e com ligação de hidrogênio, respectivamente. No caso do PUA-PCL, o aparecimento da banda em 1720 cm^{-1} também pode ser associado com a presença dos grupos carbonila do éster. As vibrações da carbonila da uréia se manifestam pela bandas em 1660 cm^{-1} (livre) e 1630 cm^{-1} (com ligação de hidrogênio). A relação entre as bandas das carbonilas será descrita posteriormente. As bandas de absorção resultantes das vibrações de estiramento e dobramento do grupo NH foram observadas em 3400 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , respectivamente. Os espectros de infravermelho não mostraram a banda de absorção em torno de 2270 cm^{-1} , o que indicou a ausência de grupos NCO não reagidos. Algumas diferenças na faixa entre $1400\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ podem ser notadas. No caso do espectro relativo ao PUA-PPG, por exemplo, a banda característica dos grupos metila apareceu em 1380 cm^{-1} . Por outro lado, esta banda não foi detectada no espectro relativo ao PUA-PCL. Além disso, no intervalo entre $1160\text{-}1120\text{ cm}^{-1}$ as diferenças são devido ao estiramento do grupo $=\text{C-O}$ no PUA-PCL (fraca), e ao estiramento do grupo $-\text{C-O-C}-$ do segmento éter do

PUA-PPG (mais intenso).

A figura 5.2, que ressalta as mudanças nas absorções de FTIR para os grupos vinila após a fotopolimerização, indica a cura no PU terminado com grupos vinila. As curvas mostradas nas figuras 5.1 e 5.2 foram normalizadas utilizando-se a banda 1353 cm^{-1} e 1576 cm^{-1} para PUA-PPG e PUA-PCL respectivamente.

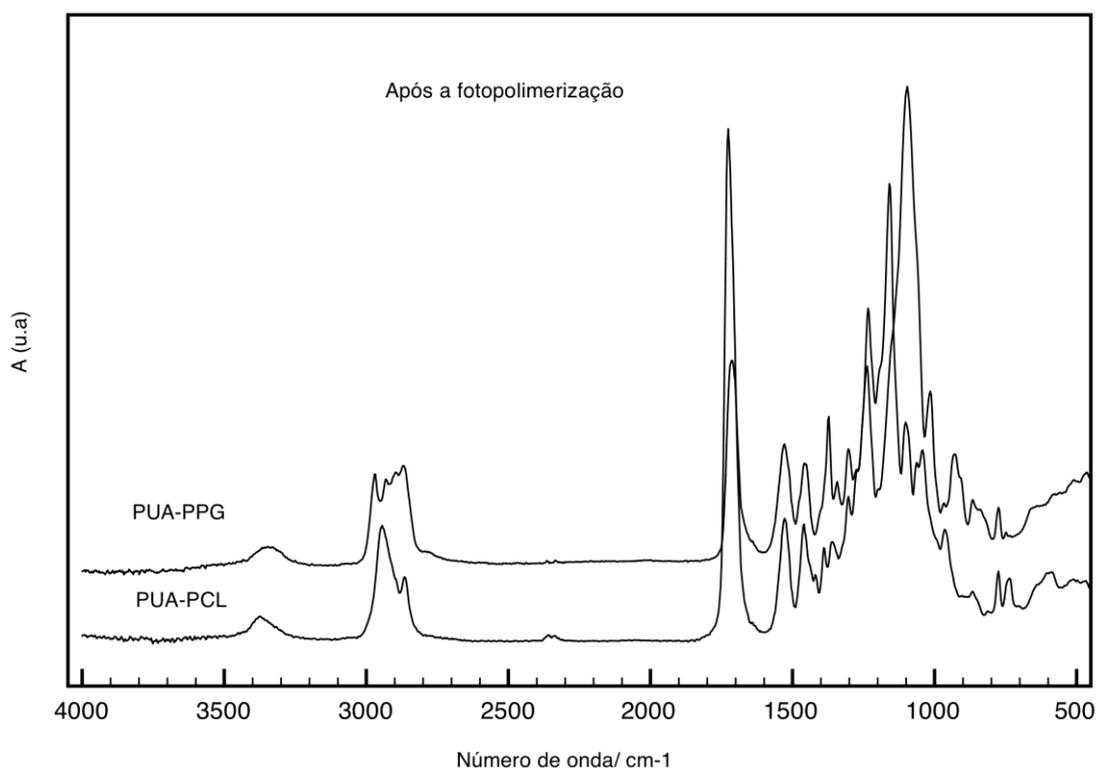


Figura 5.2: Espectros FTIR das amostras PUA-PPG e PUA-PCL após a fotopolimerização.

A conversão das duplas ligações sob luz visível foi acompanhada através de espectroscopia FTIR conforme mostrado na Figura 5.3 (a e b). A medida que a polimerização prosseguia, a banda de absorção em 1620 cm^{-1} (estiramento C=C) gradualmente foi diminuindo até seu total desaparecimento após 40 segundos, confirmando que a reação de polimerização dos grupos vinila ocorreu com sucesso.

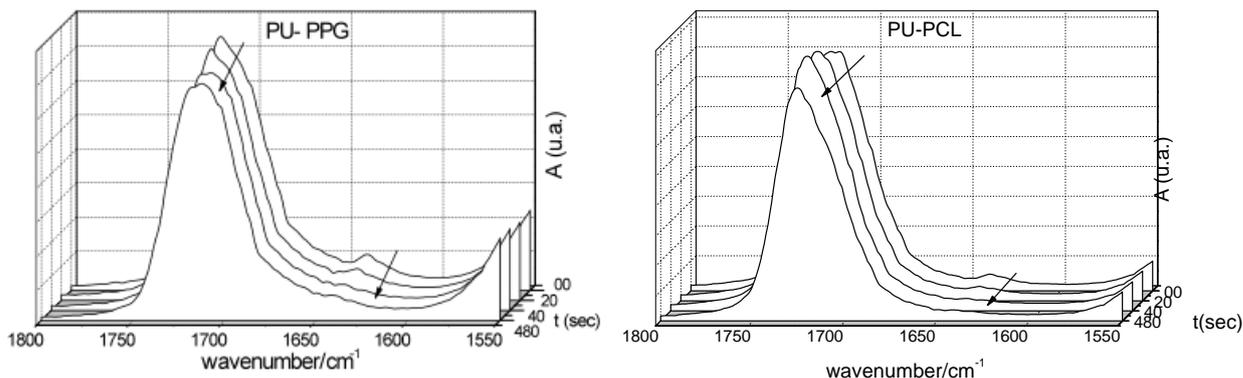


Figura 5.3: Região de estiramento dos grupos C=O e C=C de poliuretanos nos espectros de FTIR. (a) PUA-PPG e (b) PUA-PCL

A espectroscopia de FTIR também foi usada par investigar o índice de ligação de hidrogênio (IBH). Para este propósito foi realizado um procedimento matemático de deconvolução usando ajustes Gaussianos na região de absorção da carbonila. As bandas deconvoluídas da região de estiramento da carbonila para PUA-PPG e PUA-PCL estão mostradas na Figura 5.4 (a e b).

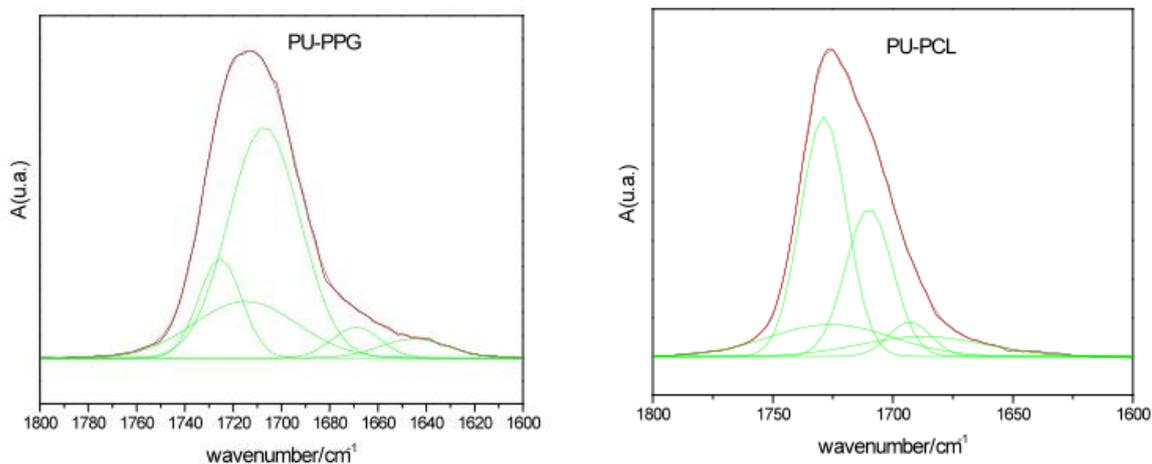


Figura 5.4: Espectros de FTIR deconvoluídos das amostras (a) PUA-PPG e (b) PUA-PCL: região de estiramento C=O.

No caso do of PUA-PPG, as bandas da carbonila em 1730 cm^{-1} e 1707 cm^{-1} foram atribuídas a carbonila de uretano livre e carbonila de uretano com ligação de hidrogênio,

respectivamente. As bandas localizadas em 1669 e 1645 cm^{-1} foram associadas a carbonila de uréia livre e carbonila de uréia com ligação de hidrogênio. O valor de IBH foi calculado a partir da razão entre as áreas Gaussianas abaixo das bandas de carbonila com ligação de hidrogênio e as bandas de carbonilas livres.

Devido a sobreposição nas absorções dos grupos carbonila do éster (1730 cm^{-1}) e ligações de uretano livre no PUA-PCL, a deconvolução foi realizada com 5 Gaussianas. A Tabela 5.1 mostra os resultados de FTIR calculados utilizando-se as áreas das bandas de carbonila livre e ligadas. Os dados apresentados mostram que o IBH relativo ao PUA-PCL é maior que aquele relativo ao PUA-PPG.

Tabela 5.1: Áreas relativas sob as bandas FTIR na região de estiramento da carbonila e os valores de IBH.

<i>Amostra</i>	<i>Uretano livre</i>	<i>Área</i>	<i>Uretano ligada</i>	<i>Área</i>	<i>IBH</i>
PUA-PPG	1730-1710 cm^{-1}	23.03	1707 cm^{-1}	37.53	1.63
PUA-PCL	1725 cm^{-1}	17.59	1709 cm^{-1}	46.92	2.64

Desde décadas passadas, o grau e a natureza das ligações de hidrogênio em PUs derivados de poliéter e poliéster continuam a ser alvo de intensas investigações (SEYMOUR *et al.*, 1970). Foi demonstrado que em elastômeros de PU, a maioria dos grupos NH está envolvida em ligações de hidrogênio (MILLER *et al.*, 1985). A partir desta conclusão, o objetivo que permanece para ser investigado é quais dos grupos funcionais disponíveis age como aceptores na ligação de hidrogênio. As possibilidades são a carbonila do uretano, o oxigênio do prepolímero derivado de éter, ou a carbonila do éster. O grau de ligação de hidrogênio inter-uretano tem sido usado como indicador da separação de fases em elastômeros segmentados de PUs. Foi concluído que o grau de ligação de hidrogênio inter-uretano aumenta à medida que a separação de fases se torna mais pronunciada. Por outro lado, a miscibilidade entre o segmento rígido e macio foi atribuída à formação de ligação de hidrogênio entre os grupos carbonilas dos segmentos macios e os grupos amida da ligação uretano nos segmentos rígidos.

Nos estudos recentes abordando as características de ligações de hidrogênios em PUs segmentados foi reportado que a ligação inter-uretano ocorre em maior extensão nos poliuretanos segmentados derivados de poliéter do que em poliuretanos segmentados derivados de poliéster (SEYMOUR *et al.*, 1970). De acordo com os autores, poli(éster-uretanos) exibem um maior grau de miscibilidade entre os segmentos rígidos e macios comparados aos poli(éteres-uretanos) devido a presença de ligações de hidrogênio relativamente fortes entre os grupos NH do uretano e carbonilas do poliéster. Em contrapartida, em um estudo recente, outros autores postularam que o uso de macrodióis não polares (tais como polibutadieno, poliisobutileno e polidimetil siloxano) como segmentos macios em PUs leva a estruturas no estado sólido com alto grau de separação de fases, dando origem à imiscibilidade entre segmentos rígidos e macios (isto é, ausência de interações razoavelmente fortes entre segmentos) (HERNANDEZ *et al.*, 2008).

O poliéster usado como segmento flexível no PUA-PCL foi um diol derivado de poli(caprolactona) (PCL). Sua estrutura química, embora com grupos éster presentes, possui também um segmento apolar $-(CH_2)_5-$, que acaba por conferir um caráter mais hidrofóbico à molécula. Portanto, a baixa compatibilidade entre segmentos rígidos e flexíveis pode ser atribuída às características hidrofóbicas do segmento flexível baseado em PCL. Com isso, uma estrutura com boa separação dos microdomínios para PUA-PCL é uma explicação razoável para o alto índice de interação de hidrogênio (IBH).

As propriedades mecânicas foram avaliadas utilizando-se uma máquina de teste universal (EMIC-DL3000) movimentada a 10 mm/min usando amostras preparadas seguindo o protocolo ASTM D-638, conforme mostrado na Figura 5.5.

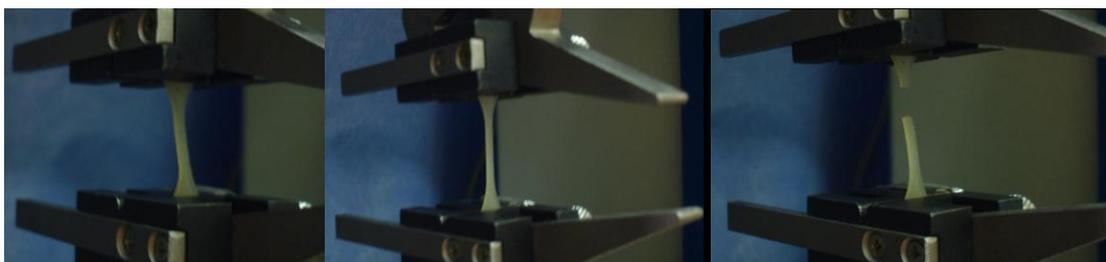


Figura 5.5: Ensaio de tração realizado com os biomateriais

Os resultados do módulo de elasticidade, resistência à tração e estiramento até a ruptura foram determinadas pela curva tensão-deformação traçadas para cada amostra de PUA. (Tabela 5.2). Entre outros fatores, as características de tração dos elastômeros termoplásticos dependem das interações intermoleculares com os domínios rígidos. O maior módulo e tensão de ruptura do PUA-PCL pode ser associado ao maior grau de interações de hidrogênio inter-uretanos e possivelmente a cristalização. Neste caso, a maior tensão foi necessária para causar a mesma deformação no PUA-PPG. Ambos PUA-PPG e PUA-PCL exibiram baixos módulos de deformação. É razoável pensar que a incorporação do HEMA de baixa massa molecular dentro da estrutura dos poliuretanos, resultou em propriedade de deformação baixa comparada à de poliuretanos puros.

Tabela 5.2: Propriedades mecânicas do PUA-PPG, PUA-PCL e pele.

	Tensão de fratura (MPa)	Deformação (%)	Módulo (MPa)
PUA-PPG	1,04	150	0,84
PUA-PCL	6,45	150	10
Pele	7,6	-	0,1 – 0,2

Para aplicação dos poliuretanos como materiais de preenchimento é desejável que suas propriedades mecânicas se assemelhem às da pele, para evitar rupturas, inflamações ou mesmo infecções locais. Embora as propriedades da pele possam variar com fatores como a localização ou o direcionamento do corte, foi realizada uma comparação entre os valores encontrados na literatura para a pele e os PUAs obtidos. Com isso foi possível verificar algumas similaridades entre as propriedades mecânicas desses materiais e alguns tecidos moles.

A aplicação do PUA como biomaterial injetável é dependente da sua capacidade de absorção de água ao longo da sua estrutura. Em geral, esse processo é governado principalmente pela afinidade entre a água e o polímero e a reticulação química. Em PUs segmentados, os segmentos rígidos atuam como agentes de reticulação física devido à formação das interações de hidrogênio entre os grupos carbonila do uretano e NH também do uretano com os segmentos rígidos. A Tabela 5.3 mostra o comportamento dos PUA-PPG e PUA-PCL em relação à absorção de água e DMF, as primeira (1^a) e segunda (2^a) imersão.

Tabela 5.3: Comportamento dos PUA-PPG e PUA-PCL em relação à absorção de água e DMF das primeira (1^a) e segunda (2^a) imersão.

	H₂O	
	Inchamento % (1^a)	Inchamento % (2^a)
PUA-PPG	2,05	3,18
PUA-PCL	1,41	2,46
	DMF	
	Inchamento % (1^a)	Inchamento % (2^a)
PUA-PPG	98,86	180,42
PUA-PCL	143,32	159,56

Os resultados confirmam que ambos materiais possuíram baixa capacidade de absorver água. Contudo, quando os PUAs foram imersos em DMF (usual bom solvente para PUs), o PUA-PCL mostrou-se menos susceptível ao inchamento, devido provavelmente à maior segregação de fases e mais baixa compatibilidade com o solvente. Com isso, o segmento rígido que é hidrofílico ficaria menos disponível para realizar interações com o DMF (solvente polar). O maior grau de interações de hidrogênio do PUA-PCL, como demonstrado através dos experimentos de FTIR, pode ter influenciado os resultados de inchamento com DMF.

Em relação aos ensaios de injetabilidade, foi usado como controle um PMMA baseado em microesferas suspensas em um hidrogel. Os fabricantes não recomendam a aplicação deste material em áreas extensas e correções devem ser realizadas, se necessário, no intervalo de 6 meses. O sistema injetável proposto neste trabalho tem a vantagem de poder ser aplicado em maior quantidade e em intervalos de tempo menores. Entretanto, eles podem ser moldados *in situ* e em seguida fotopolimerizados. A Figura 5.6 mostra a comparação entre o PUA-PPG e PUA-PCL como materiais injetáveis. Como pode ser observado, o comportamento de injetabilidade do PUA-PPG foi semelhante ao do PMMA.

A injetabilidade está ligada à viscosidade do poliuretano não polimerizado. A viscosidade, por sua vez, pode ser manipulada através de parâmetros como: razão NCO/OH, massa

molar do polioliol e quantidade de HEMA. Neste trabalho, tais parâmetros foram trabalhados no sentido de gerar resultados semelhantes ao de sistemas injetáveis comerciais (como mostrado na Figura 5.6).

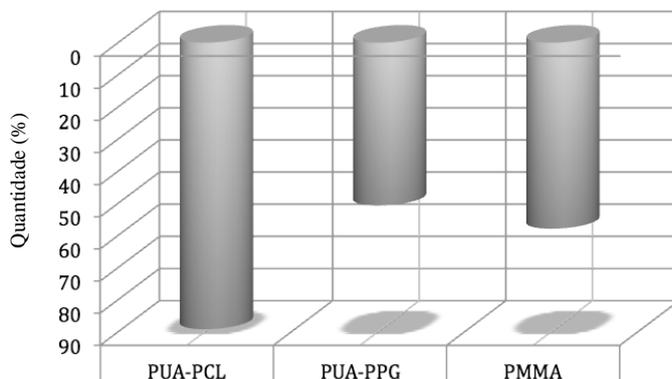


Figure 5.6: Comportamento de injetabilidade do PMMA, PUA-PPG e PUA-PCL

5.2 Estudos *in vitro*

5.2.1 Obtenção de células tronco mesenquimais

Estudos anteriores mostraram que as células tronco mesenquimais podem ser obtidas de várias fontes. Porém, as mais estudadas são as células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (GREGORY *et al.*, 2005). Assim, esses estudos sugerem que a medula óssea é uma fonte potencial de células tronco mesenquimais. Entretanto, a cultura celular destas células já está bem estabelecida e o conhecimento da sua fisiologia no que tange a cinética de proliferação e diferenciação são bem estáveis. Por essas vantagens, o uso de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea se torna interessante no tratamento de várias doenças regenerativas e também atua na recuperação de tecidos lesionados como tecido ósseo e cartilaginoso, na tentativa de restabelecer as funções do paciente (REFFITT *et al.*, 2003; CAPLAN, 1991; WILLIAMS T *et al.*, 1999; FERRARI *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 2007).

Estas células apresentam morfologia semelhante aos fibroblastos, como descrito por alguns autores, tais como Phinney *et al.*, 1999 e Kassem *et al.*, 2004 e com o decorrer da cultura, apresentam formação de colônias, denominadas unidades formadoras de colônias

semelhantes aos fibroblastos (Cfu-F), como descrito por Bianco *et al.* 2001 e representado pela figura 5.7, sem a presença de biomaterial.

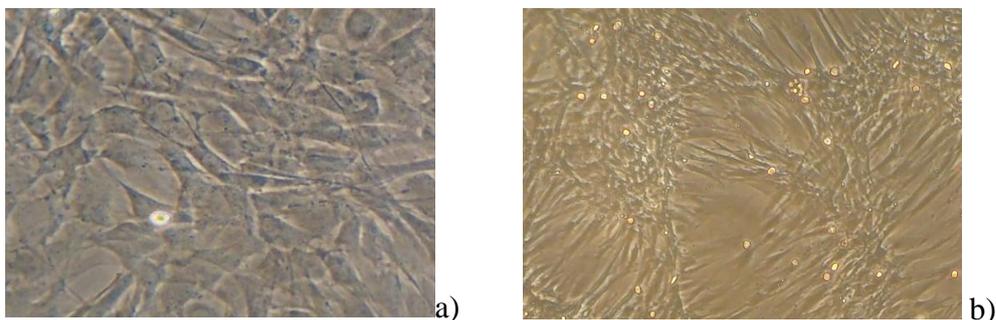


Figura 5.7: a) Visualização da cultura de células tronco mesenquimais (segunda passagem). b) Visualização da cultura de células tronco mesenquimais (quarta passagem). As células foram visualizadas através de microscopia óptica (20X).

5.2.2 Viabilidade celular

O estudo da viabilidade celular mostrou que as células tronco mesenquimais foram viáveis na cultura, em contato com os poliuretanos (PUA-PPG e PUA-PCL). Os cristais de formazan, formados depois da metabolização do MTT, foram perfeitamente visualizados, como mostrados na figura 5.8.

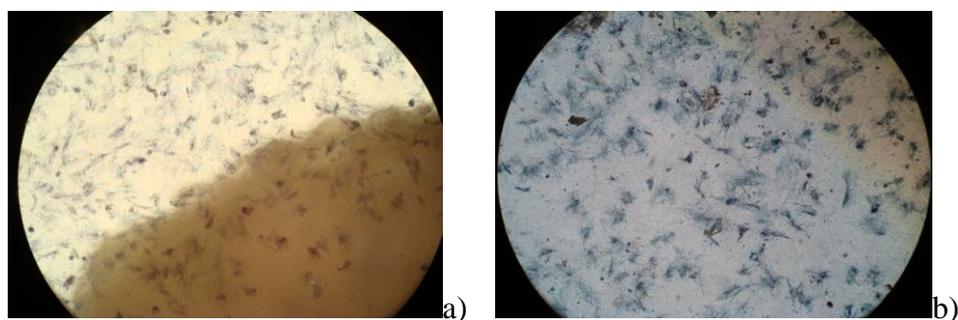


Figura 5.8: Visualização dos cristais de formazan. a) 1×10^5 cells/mL células tronco mesenquimais foram plaqueadas na presença do poliuretano PUA-PPG e submetidas ao ensaio de MTT. b) Cristal de formazan na superfície do poliuretano. A formação do cristal de formazan pelas células foram visualizadas pela microscopia optica (20X).

A medida da densidade óptica de cristais de formazan solubilizados está apresentado na figura 5.8 (a). A Figura 5.8 (b) mostra a proliferação celular na superfície do biomaterial sintetizado. A proliferação das células tronco mesenquimais na presença do PUA-PPG e PUA-PCL foi, respectivamente 89% e 96%, e não apresentou uma diferença estatística significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle. Este resultado indica que o nível de toxicidade dos biomateriais é baixo e similar ao controle. Isso significa que o material tem uma pequena toxicidade inicial, mas que não é significativa, conforme mostra a Figura 5.9.

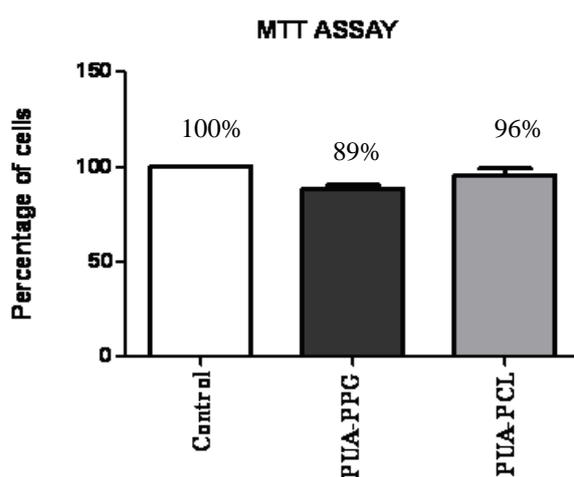


Figura 5.9: Viabilidade das células tronco mesenquimais avaliadas pelo método MTT. 1×10^5 cells/mL células tronco mesenquimais foram plaqueadas na presença de poliuretanos. Os resultados foram avaliados após 4 dias de incubação. Resultados representam Mean \pm SD de triplicatas de 4 experimentos separados ($P < 0.05$).

5.2.3 Produção de fosfatase alcalina

Neste método foi observado que a atividade de fosfatase alcalina foi similar entre as culturas de células tronco mesenquimais quando comparadas ao grupo controle. A fosfatase alcalina é uma ectoenzima, ou seja, está localizada na superfície externa da célula, onde exerce sua atividade, logo, se a célula está secretando fosfatase alcalina, está em perfeita atividade. Além disso, a fosfatase alcalina está presente como marcador de células tronco e de osteoblastos, uma vez que ela está relacionada ao processo metabólico

de mineralização óssea e também está presente em processos patológicos. Sendo assim, a positividade à reação da fosfatase alcalina é um dos fatores utilizados para a identificação de células tronco mesenquimais. Isso nos dá indício de que trabalhamos com células tronco mesenquimais e não outros tipos celulares que também são oriundos da medula extraída para obtenção das células. As células tronco mesenquimais produziram fosfatase alcalina livre na matriz que foi colorida pelo BCIP-NBT. Neste trabalho, somente as células tronco mesenquimais normais metabolizaram e transformaram o sal tetrazolium em cristais azuis observados nas células, seta branca, figura 5.10. Isto evidenciou a presença de fosfatase alcalina já metabolizada.

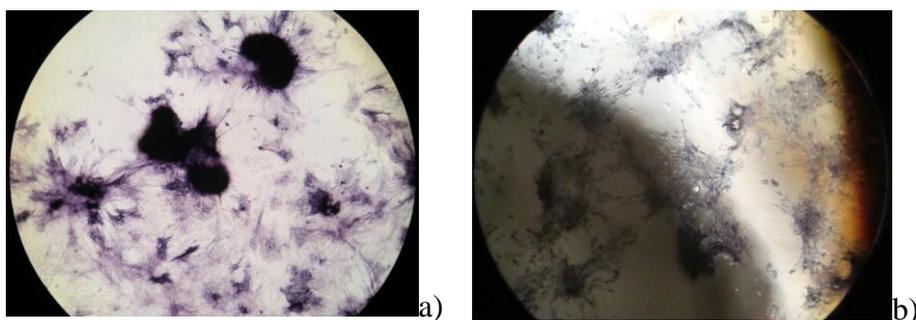


Figura 5.10 – Fotomicrografia das células tronco mesenquimais (20X) tingidas pelo BCIP-NBT evidenciando a da produção de fosfatase alcalina em contato com os PUAs: (a) controle, (b) células na presença de PUAs.

A medida da densidade óptica das células tronco mesenquimais tingidas pelo BCIP-NBT está apresentado na Figura 5.11. Isto mostrou que que a proliferação de células tronco mesenquimais foi de 98% na presença do PUA-PPG, e 3% maior na presença do PUA-PCL, quando comparado ao controle e não representa uma diferença estatística significativa ($P < 0,05$). Podemos concluir que a secreção de fosfatase alcalina de células tronco mesenquimais não foi alterada na presença dos poliuretanos PUA-PPG e PUA-PCL.

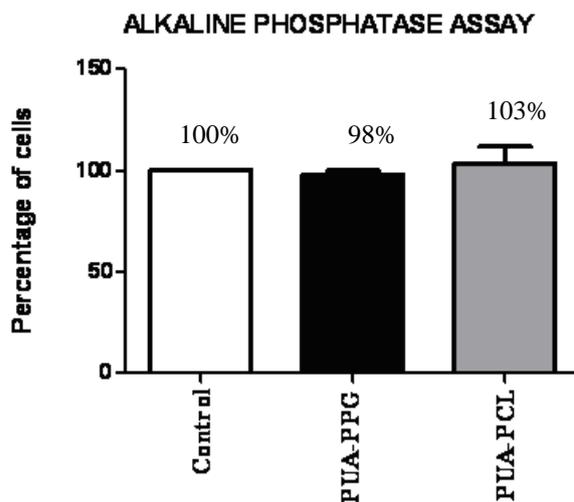


Figura 5.11: Produção de fosfatase alcalina avaliada pelo método BCIP. Os resultados foram avaliados após 4 dias de incubação. Resultados representam Mean \pm SD de triplicatas de 4 experimentos separados ($P < 0.05$).

5.2.4 Síntese de colágeno

Para investigar se as células tronco estavam produzindo colágeno, o colágeno secretado no sobrenadante das culturas foi quantificado (Figura 5.12). Vimos que a produção de colágeno nas células tronco mesenquimais na presença do PUA-PPG foi notado 7% maior do que no grupo controle e na presença do PUA-PCL a produção de colágeno foi de 88% da produção no grupo controle. Os resultados da medida de colágeno nas células fixadas foram similares aqueles observadas no sobrenadante.

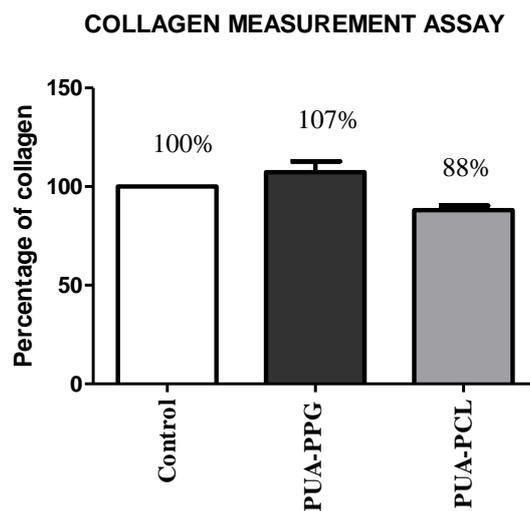


Figura 5.12: Secreção de colágeno. 1×10^5 cells/mL células tronco mesenquimais foram plaqueadas na presença de poliuretanos. Resultados representam Mean \pm SD de triplicatas de 4 experimentos separados ($P < 0.05$).

5.3 Estudos *in vivo*

5.3.1 Biomateriais implantados na forma injetável

Após a tricotomia dos pêlos e assepsia apresentadas na Figura 5.13 (a), os biomateriais não fotopolimerizados foram inseridos na seringa de 1 ml, a qual foi acoplada à agulha BD calibre 30x7, usada em procedimentos clínicos conservadores para preenchimento subcutâneo. Foi penetrada a agulha no plano subdérmico do dorso dos ratos, conforme Figura 5.13 (b). Logo em seguida o material foi moldado no local.

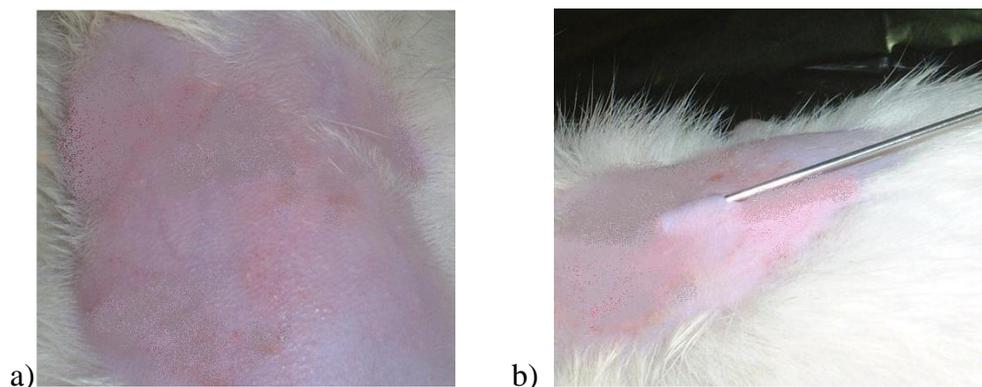


Figura 5.13: a) Tricotomia dos pêlos e assepsia b) material sendo inserido no plano subdérmico c) biomaterial inserido e moldado no dorso do rato

A fotopolimerização foi então feita no local por 1 minuto após a moldagem do biomaterial no local, implantado (Figura 5.14 a). O aspecto final do implante foi mostrado na figura 5.14 (b).

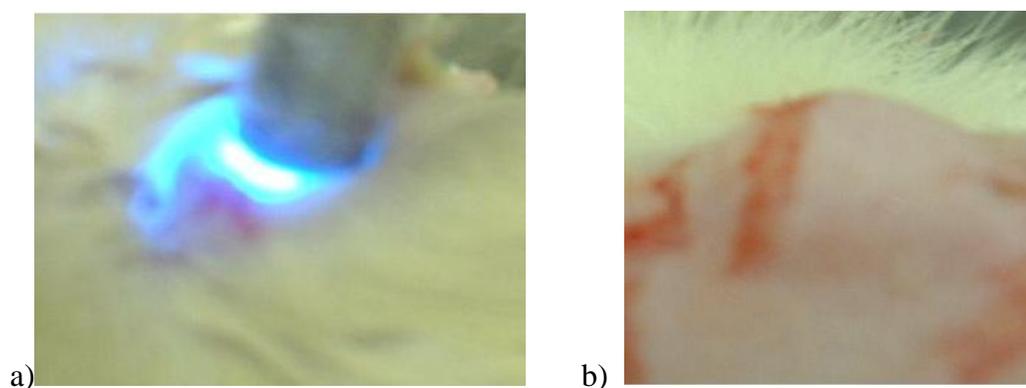


Figura 5.14: a) Biomaterial sendo fotopolimerizado no local após prévio modelamento b) Resultado final do implante

5.3.2 Biomateriais implantados na forma cirúrgica

Os biomateriais implantados sob a forma cirúrgica foram implantados seguindo os mesmos procedimentos de tricotomia dos pêlos e assepsia. Foi realizada uma incisão pequena, somente para a introdução do implante também no plano subdérmico (figuras 5.15 a e b).

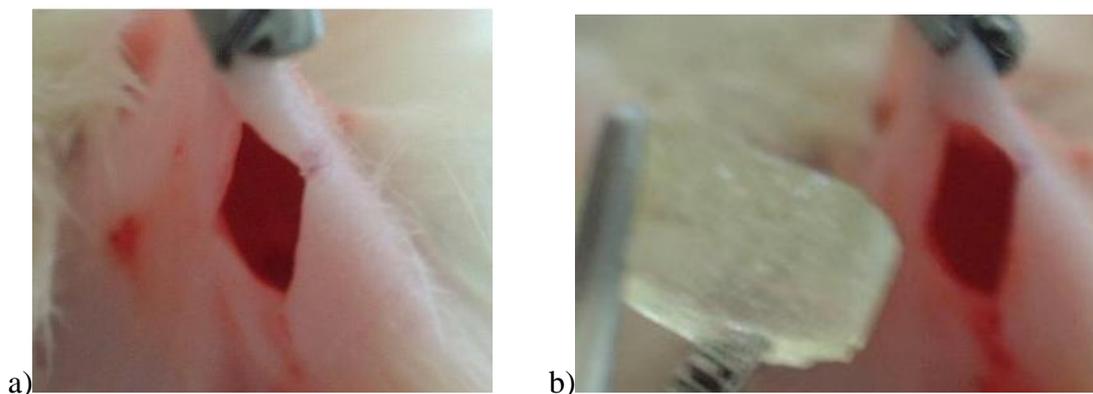


Figura 5.15: a) Incisão para a penetração do implante b) Implante a ser inserido

Após a implantação, foi realizada a sutura do local, conforme mostrado nas Figuras 5.16 (a) e (b).

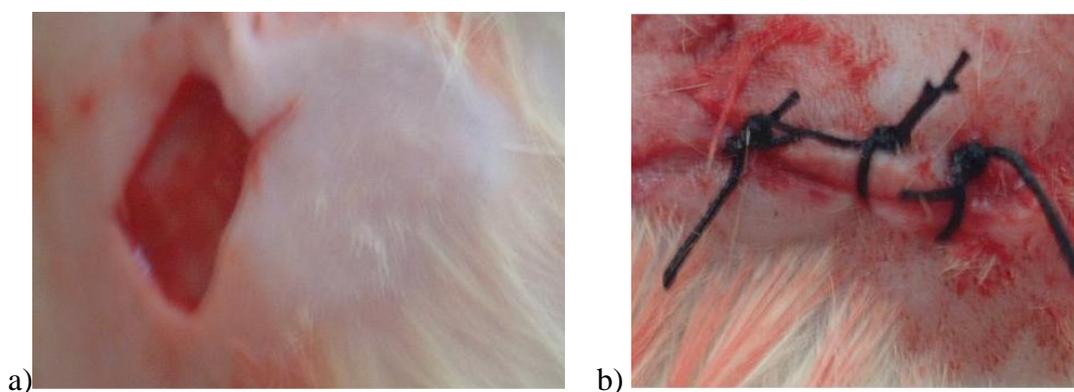


Figura 5.16 a) Implante inserido b) Sutura do local

Os ratos foram mantidos em ambiente adequado, conforme estabelecido no projeto do CETEA. Não ocorreu nenhuma infecção no local de implantação dos biomateriais, e a inflamação local foi somente decorrente do procedimento operatório. Os ratos foram sacrificados conforme metodologia e logo em seguida foi realizada a remoção dos implantes. Foram feitos então cortes histológicos para a realização da análise histopatológica das lâminas.

5.4 Estudo histopatológico

Ao exame macroscópico, todos os materiais implantados cirurgicamente ou injetados permaneceram íntegros e depositados de forma localizada geralmente no plano subdérmico original (Figura 5.17), sem evidências de difusão.



Figura 5.17: secção de pele e subcutâneo evidenciando um dos implantes polimerizado, de localização subdérmica, nitidamente contornado por cápsula conjuntiva (seta).

5.4.1 PMMA

Conforme evidenciado na Figura 5.18, o tipo de resposta tecidual nos dois ratos foi diferente. No rato de 2 semanas, o material permaneceu homogêneo, agrupado e condensado no centro da área injetada, tendo sido lavado no procedimento histológico. Entretanto, parte do material, sob a forma de microesferas, foi depositado ao redor, de aspecto basofílico e amorfo, de permeio às esferas. As esferas estão dispostas em pacotes, porém individualizadas à custa de tecido fibrilar delicado, fibroblastos e alguns histiócitos, com esparsos linfócitos. Chama atenção o grande número de células gigantes multinucleadas, que englobam esferas.

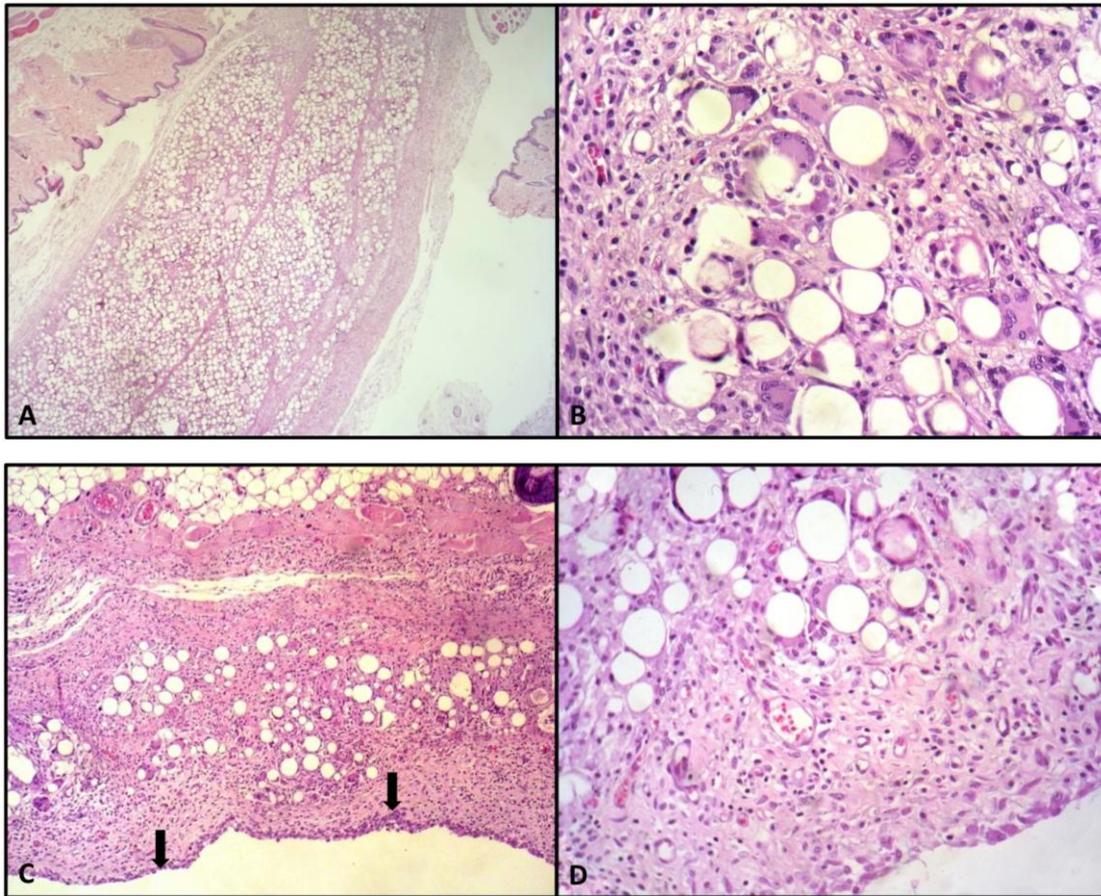


Figura 5.18: (a) aspecto cilíndrico do implante de PMMA, compatível com o diâmetro da agulha. HE X 20; (b) aspecto das microesferas entremeadas com células inflamatórias, predominando histiócitos, muitos deles espumosos, com células gigantes multinucleadas. HE X 200; (c) clivagem central do implante após 2 semanas (setas), determinando resposta inflamatória mais intensa, observada apenas no implante de 2 semanas de evolução. HE X 100; (d) detalhe da figura anterior mostrando a área de clivagem contornada por tecido de granulação, com histiócitos em paliçada. HE X 200.

No rato de 4 semanas, a disposição do material é peculiar, que apresenta a morfologia do Gauge da agulha. Foram duas “injeções” circundadas por tecido de granulação, com fibrose inicial discreta. As esferas são individualizadas a exemplo do descrito anteriormente, com menor número de células gigantes de permeio. Grupos de esferas são também contornadas por delicados septos conjuntivos no interior do material.

5.4.2 PUA-PPG

5.4.2.1 Material injetado

A resposta tecidual mais importante foi a reação com encistamento, que corresponde ao englobamento do material por tecido de granulação e início de fibrose, com formação de uma cápsula delgada, porém de espessura variável. Há resposta inflamatória discreta de linfócitos e especialmente histiócitos nos ratos com 2 e 4 semanas, havendo freqüentes células gigantes multinucleadas no período de 2 semanas, sendo menos evidentes em 4 semanas. Houve infiltração focal do tecido circunvizinho ao cisto pelo material, no rato de 2 semanas e foco de perfuração da cápsula do cisto no de 4 semanas. Porém, a região acometida é delimitada por tecido de granulação, com infiltrado inflamatório histiocitário mínimo, não havendo difusão do material em partes moles circunvizinhas. Deve ser considerada a presença de reação tecidual ao procedimento de injeção do material, com fibrose e infiltrado inflamatório muito discreto na derme e subcutâneo, havendo inclusive reação gigante-celular do tipo corpo estranho a restos de pêlos.

5.4.2.2 Material cirúrgico

O processo de reação tecidual ao material implantado cirurgicamente seguiu o padrão descrito nos ratos onde este foi injetado. A diferença básica está na intensidade da reação inflamatória, que foi mínima, com predomínio de histiócitos, tendo sido identificadas esparsas células gigantes multinucleadas somente no rato de 2 semanas. O encistamento foi completo, notando-se cápsula mais espessa no rato de 4 semanas. Não houve reação tecidual significativa ao procedimento cirúrgico.

5.4.3 PUA-PCL

5.4.3.1 Material injetado

A resposta tecidual mais importante continuou sendo o encistamento, com resposta inflamatória mínima de linfócitos e especialmente histiócitos, havendo raras células

gigantes multinucleadas. Houve foco de perfuração da cápsula no rato de 2 semanas. Deve ser desconsiderada a presença de reação tecidual ao procedimento de injeção do material.

5.4.3.2 Material cirúrgico

O processo de reação tecidual ao material implantado cirurgicamente seguiu o padrão descrito nos ratos onde este foi injetado, com cápsula fibrosa de espessura irregular, porém pouco mais espessa em comparação com os demais materiais testados nos experimentos. A diferença básica está na intensidade da reação inflamatória, provavelmente acrescida das alterações devidas ao procedimento cirúrgico, com reação gigante-celular do tipo corpo estranho a restos de pêlos e fibrose.

5.4.4 Estudo comparativo

O implante injetado de PMMA no animal de 2 semanas foi depositado de forma um pouco mais oblíqua e profunda que os demais, assim como no implante cirúrgico de PUA-PPG no animal de 4 semanas. Os implantes de PMMA nos animais de 2 e 4 semanas descrevem formatos alongados compatíveis com o diâmetro da agulha utilizada no procedimento (Figura 5.18 a). Em ambos os casos houve resposta inflamatória com infiltrado constituído predominantemente por histiócitos, em sua maioria espumosos e células gigantes multinucleadas, contornando as microesferas que se apresentaram intactas. A inflamação foi mais intensa no animal de 2 semanas, classificada como Grau IV de Durante *et al*, 1998, com formação de raros pequenos granulomas (Figura 5.18 b). Observou-se ainda descolamento de parte da região central do implante (Figura 5.18 c), separada do restante por fina faixa de tecido de granulação, com histiócitos dispostos em paliçada (Figura 5.18 d). O implante, na área central, apareceu como imagem negativa por ter sido removido durante o processamento histológico.

No animal de 4 semanas, o implante foi completamente contornado por discreto tecido conjuntivo fibroso, com emissão de delicados septos que envolveram grupos de microesferas (Figura 5.19a), o que pode ser melhor observado à coloração pelo Tricrômico de Masson (Figura 5.19b). O infiltrado inflamatório, menos intenso e classificado como Grau II, tinha menor número de células gigantes (Figura 5.19c). Em

ambos os implantes, havia delicadas fibras conjuntivas envolvendo microesferas isoladas, o que foi mais bem demonstrado pelo Tricrômico de Masson (Figura 5.19 d).

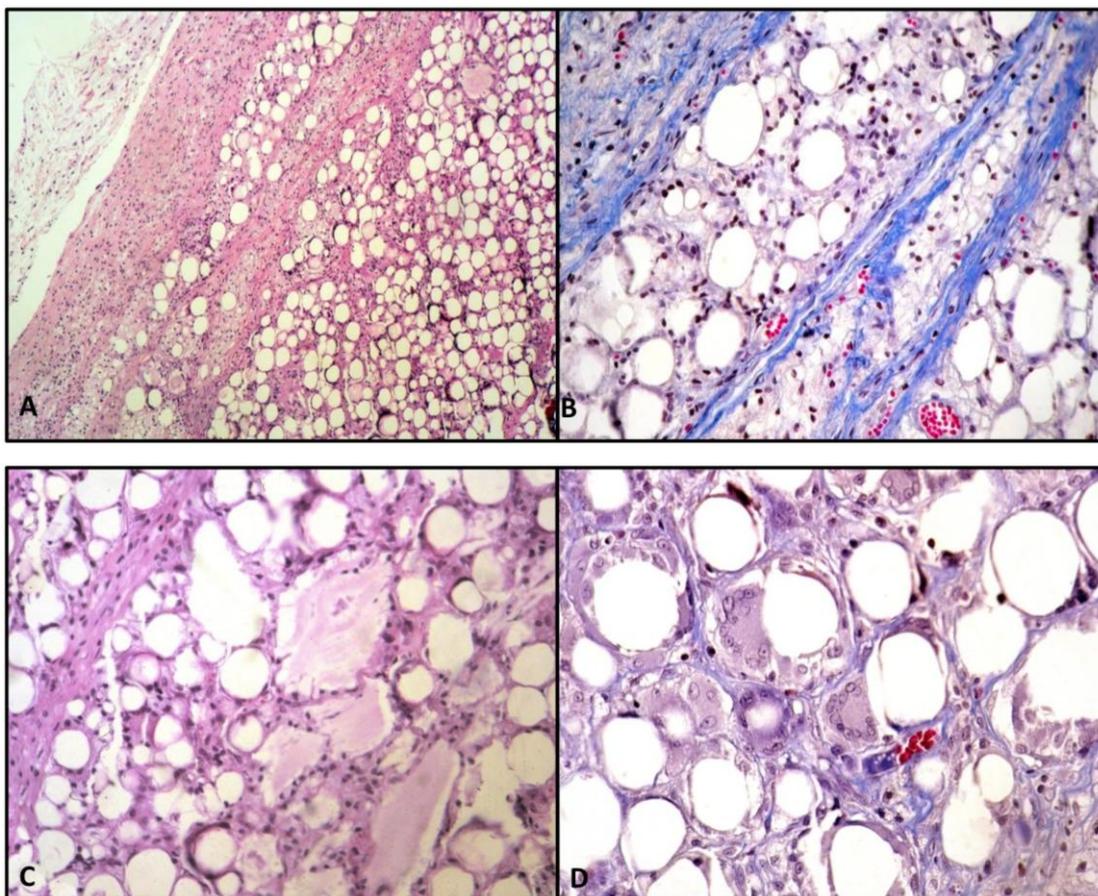


Figura 5.19: (a) periferia do implante de PMMA com 4 semanas de evolução, onde se observa area de fibrose com emissão de septos englobando grupos de microesferas. HEX100; (b) detalhe da figura anterior, destacando a fibrose em azul. Tricrômico de Masson X200; (c) presença de delicada fibrose envolvendo microesferas individualmente, com resposta inflamatória de mononucleares muito discreta. HEX 200; (d) detalhe da figura anterior ressaltando a fibrose, corada em azul, bem como algumas células gigantes. Tricrômico de Masson X400.

Os implantes de PUA-PPG e PUA-PCL, injetados ou depositados cirurgicamente, apresentaram padrões semelhantes de reação, com delimitação por cápsula de espessura variável, na maioria das vezes completa, independente se o implante foi injetado ou depositado cirurgicamente (Figura 5.20 a,b,c,d). Os materiais apareceram em imagem

negativa, lavados durante o processamento histológico. A resposta inflamatória foi discreta no animal de 2 semanas com implante injetado de PUA-PPG (Figura 5.20 a) e no animal de 2 semanas operado para introdução de implante de PUA-PCL (Figura 5.21 c), classificada como grau II/III, porém de forma mais localizada, em pequenos focos. Houve predomínio de células inflamatórias mononucleadas, particularmente histiócitos, com esparsas células gigantes multinucleadas, englobando partículas degradadas dos polímeros na cápsula. No implante de PUA-PPG, a cápsula era mais delgada e menos regular, geralmente entremeada com fibrina e histiócitos dispostos em paliçada (Figura 5.20 c).

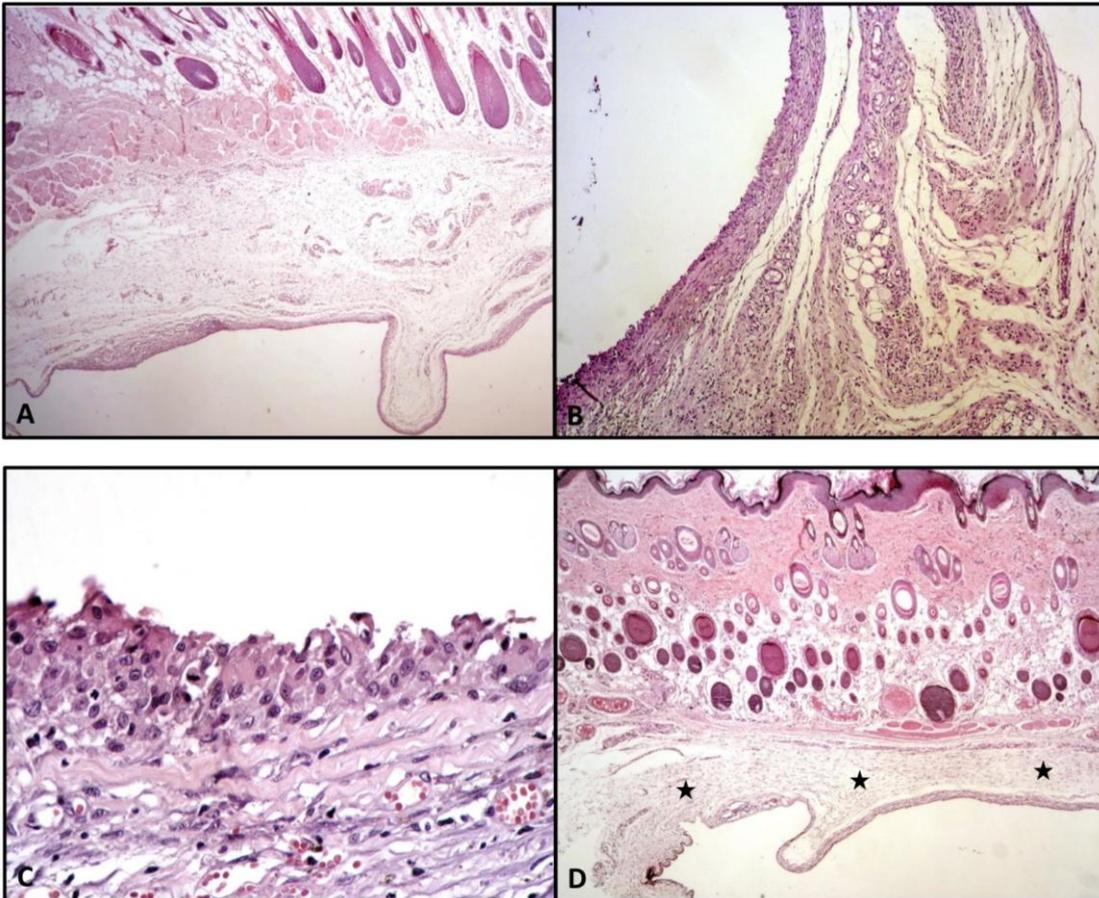


Figura 5.20: (a) implante injetado de PUA-PPG após 2 semanas, com formação de cápsula conjuntiva mais delgada e resposta inflamatória discreta, de distribuição irregular. HE X 20; (b) região de reação inflamatória mais intensa do implante anterior, associada a tecido de granulação. HE X 100; (c) outro detalhe destacando a cápsula, mais delgada, com acúmulos de histiócitos. HE X 200; (d) implante de PUA-PPG cirúrgico após 2 semanas evidenciando cápsula também delgada, com menor atividade inflamatória e tecido de granulação mais amplo (estrelas), sendo substituído por fibrose. HE X 20.

Destacam-se os implantes de PUA-PCL que, injetado ou depositado cirurgicamente, determinaram a formação de uma cápsula contínua e relativamente espessa (Figura 5.21 b), surgida já com duas semanas do implante, havendo resposta inflamatória mínima no animal onde este material foi injetado (grau I), em comparação com aquele cirurgicamente implantado (Figura 5.21 c,d).

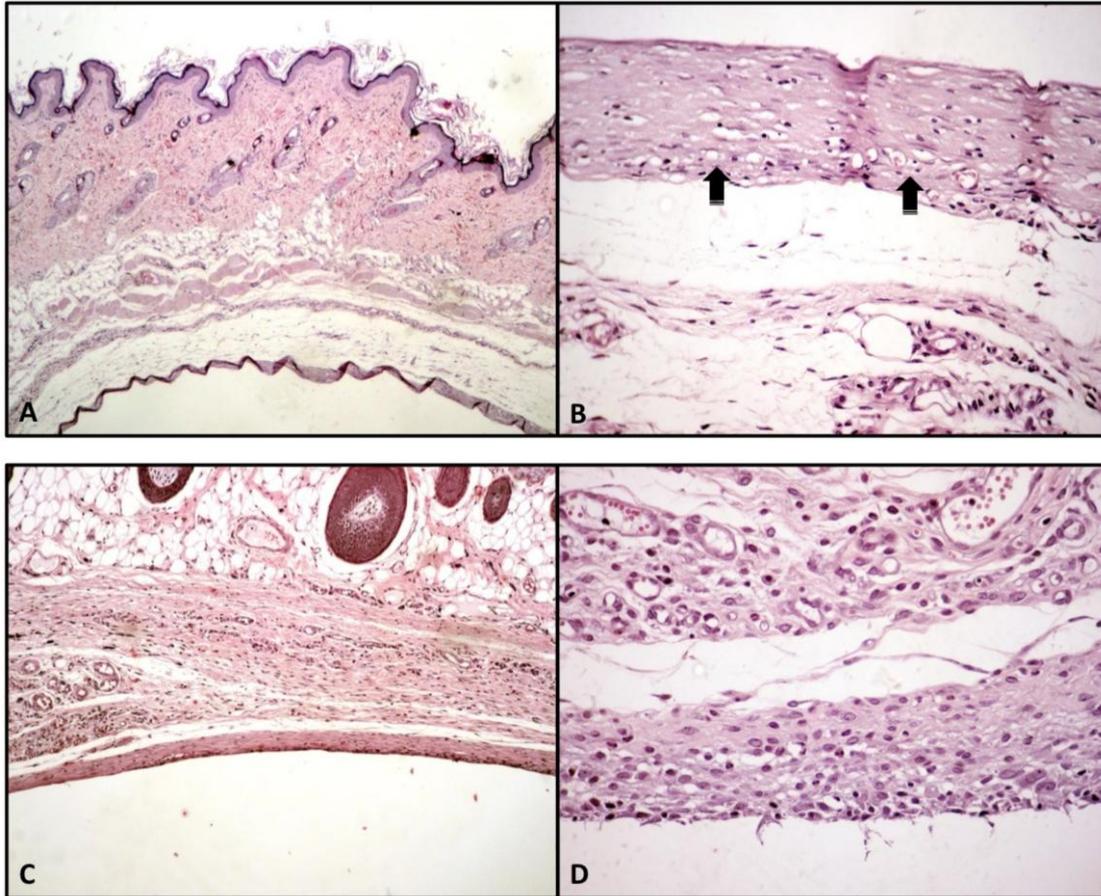


Figura 5.21: (a) implante injetado de PUA-PCL após 2 semanas, com formação de cápsula conjuntiva mais espessa e regular, praticamente sem resposta inflamatória. HE X 20; (b) detalhe da imagem anterior para ressaltar a fibrose mais densa da cápsula (setas). HE X 200. (c) implante cirúrgico de PCL após 2 semanas mostrando tecido de granulação, com resposta inflamatória leve. HE X 100; (d) detalhe da figura anterior destacando o infiltrado inflamatório de mononucleares, com predomínio de histiócitos, com esparsos linfócitos de permeio. HE X 200.

A tabela 5.4 mostra um estudo comparativo entre os materiais conforme a intensidade da inflamação local.

Tabela 5.4: Classificação de corpo estranho segundo Duranti *et al.*, 1998

Materiais	Injetados		Implantados	
	2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
PMMA (controle)	II	III	-	-
PUA-PPG	II e III	I	II e III	I
PUA-PCL	II e III	I	II e III	I

A resposta tecidual mais importante e evidente em todos os biomateriais sintetizados, independentemente da análise em 2 ou 4 semanas, foi a reação com encistamento, que corresponde ao englobamento do material por tecido de granulação e início de fibrose, com formação de uma cápsula delgada e de espessura variável. Há resposta inflamatória discreta de linfócitos e especialmente histiócitos nos ratos com 2 e 4 semanas, havendo algumas células gigantes multinucleadas no período de 2 semanas, sendo bem menos evidentes em 4 semanas. Os biomateriais apresentaram em 4 semanas características que os tornam biocompatíveis, visto que a resposta inflamatória, relacionada com a classificação de Duranti *et al.*, 1998, transitou entre Grau II e III nos biomateriais analisados em 2 semanas e Grau I para os analisados em 4 semanas.

CAPÍTULO 6

6 CONCLUSÕES

Foi demonstrada a possibilidade de produção de poliuretanos com diferentes susceptibilidades para hidrólise passíveis de serem injetados, moldados e, em seguida, fotopolimerizados com luz no comprimento de onda na faixa do visível. A injetabilidade e as propriedades mecânicas dos poliuretanos produzidos se mostraram comparáveis a, respectivamente, sistemas injetáveis comerciais e tecidos moles. Estas características podem ainda ser manipuladas através de parâmetros da síntese.

Os estudos preliminares destes poliuretanos injetáveis e fotopolimerizáveis sintetizados mostraram a capacidade dos mesmos em funcionar como suporte para adesão, crescimento e proliferação celular. Os experimentos *in vitro* com o uso de células tronco mesenquimais e *in vivo* demonstraram biocompatibilidade dos biomateriais testados, provando a ausência de efeitos citotóxicos significantes nas células.

CAPÍTULO 7

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, N. S. & RABEK, J. F. - "New Trends in the Photochemistry of Polymers", Elsevier Applied Science Publishers, London, 1985.

AYRES, E. Desenvolvimento de poliuretanos modificados a partir da inserção de entidades inorgânicas. *Dissertação (Mestrado)*. UFMG, Belo Horizonte, 2002.

AYRES, E. Poliuretanos e nanocompósitos Biodegradáveis derivados de Dispersões aquosas projetados para aplicações biomédicas. *Tese (Doutorado)*. UFMG, Belo Horizonte, 2006.

BERNARDES, S. R.; SCHELLINI, S. AR.; PADOVANI, C. R.; MARQUES, M. E.: Evaluation of the injection of gel polyethylene into the subcutaneous of rats. *Rev. bras. Oftalmologia*, vol.7, p.525-534, 2003.

BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, ROBEY PG: Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19: 180-192, 2001.

BONZANI, I. C.; ADHIKARI, R.; HOUSHYAR, S.; MAYADUNNE, R.; GUNATILLAKE, P.; STEVENS, M. M.: Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. *Biomaterials*, vol.28, p.423-433, 2007.

BOSCHI. A.O. O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial ? In: Congresso Anual da Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais, 50. Agosto, São Pedro, São Paulo: ABM, v.6, p.43-53, 1995.

CAMPAGNOLI C, ROBERTS AG, KUMAR S, BENNETT PR, BELLANTUONO I, FISK NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*; 98:2396-402.2001.

CAPLAN AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991 Sep;9(5):641-50.

CATALINA, F.; MARTINEZ-UTRILLA, R. & SASTRE - R., *Polym. Bull.*, 8, p.369, 1982.

COHN, D.; SOSNIK, A.; GARTY, S.: Smart hydrogel for in situ generated implants. *Biomacromolecules*, vol.6, p.1168-1175, 2005.

DIAS, R. C.M. Síntese, caracterização e avaliação preliminar de citotoxicidade da matriz porosa de nanocompósito biodegradável. *Dissertação (Mestrado)*. UFMG, Belo Horizonte, 2006.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J.: Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, vol.24, p.4337-4351, 2003.

DUNCAN, A. C.; BOUGHNER, D.; CAMPBELL, G.; WAN, W. K.: Preparation and characterization of a poly (2-hydroxyethylmethacrylate) biomedical hydrogel. *European Polymer Journal*, vol.37, p.1821-1826, 2001.

DURANTI. F, G SALTI, B BOVANI, M CALANDRA, ML.Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. A clinical and histological study, *Dermatol Surg - Mass Med Soc*; 1998.

ELSON, C. E. Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids: protective roles in cancer and cardiovascular disease. *J. Nutr.* 125: 1666S-1672S.1995.

FERRARI S, RIZOLLI R, BONJOUR JP.Aging (Milano). 1998 Jun;10(3):205-13. Review.

GREGORY CA, GUNN WG, REYES E, SMOLARZ AJ, MUNOZ J, SPEES JL, Prockop DJ. How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Stem Cell Biology*. Ann N Y Acad Sci. 2005 May;1049:97-106. Review.

HENCH,L.L; IONNIS. D. XYNOS AND JULIA M. POLAK. Bioactive glasses for in situ tissue regeneration. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. Volume 15, Number 4 / April, 2004.

HERNANDEZ, R., WESLER, J., PADSALGIKAR, A., CHOI, T., ANGELO, E., LIN, J S., XU, L C., SIEDLECKI, C A, RUNT, J. *Macromolecules* 2008; 41: 9767.

HILL, D. Design engineering of biomaterials for medical devices. England, 1998.

HO, E.; LOWMAN, A.; MARCOLONGO, M: Synthesis and characterization of an injectable hydrogel with tunable mechanical properties for soft tissue repair. *Biomacromolecules*, vol.7, p.3223-3228, 2006.

HODGE, P. & SHERRINGTON, D.C. - "Polymer Supported Reactions in Organic Synthesis", John Wiley, Chichester, 1980.

HOFFMAN, A. S.: Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol.43, p.3-12, 2002.

JANG, J. Y.; JHON, Y. K.; CHEONG, I. W.; KIM, J. H. Effect of process variables on molecular weight and mechanical properties of water-based polyurethane dispersion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol.196, p.135-143, 2002.

JAVASON E.H, COLTER D.C, SCHWARZ E.J, PROCKOP D.J. Rat marrow stroma cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells*; 19:219-25. 2001.

JIANG, X.; LI, J.; DING, M.; TAN, H.; LING, Q.; ZHONG, Y.; FU, Q.: Synthesis and degradation of nontoxic biodegradable waterborne polyurethane elastomer with poly (ε-caprolactone) and poly (ethylene glycol) as soft segment. *European Polymer journal*, 2007.

JOHNSTONE B. Mesenchymal stem cells and chondrogenesis. *Eur Cells Mater*; 4 (Suppl D):1473-2262.2002.

KANG, J; BEERS, K. J. Synthesis and characterization of PCL-b-PEO-b-PCL- based nanostructured and porous hydrogels. *Biomacromolecules*, vol.7, p.453-458, 2006.

KASSEM, M., KRISTIANSEN, M. and ABDALLA, B. M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic and clinical pharmacology and toxicology*. v. 95, p. 209-214, 2004.

KENAR, HALIME; KOSE, GAMZE TORUM; HASIRCI, VASIF. Tissue engineering of bone on micropatterned biodegradable polyester films. *Biomaterials*, v. 27, p. 885-895, 2006.

LIMIÑANA, M. A. P.; AÍS, F. A.; PALAU, A. M. T.; BARCELÓ, A. C. O.; MARTINEZ, J. M. M. Characterization of waterborne polyurethane adhesives containing different amounts of ionic groups. *International Journal of Adhesion & Adhesives*, v.25, n. 6, p. 507-517, 2005.

MANO, E.B. *Introdução a Polímeros*. São Paulo: Edgard Blücher, p. 111, 1985.

MARTIN, I; PADERA, R. F; VUNJAK-NOVAKOVIC, G; FREED, L.E. *In vitro* differentiation of chick embryo bone marrow stroma cells into cartilaginous and bone-like tissues. *J Orthopedic Res*; 16:181-9. 1998.

MASSOM, V.; MAURIN, F.; H. FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Influence of sterilization processes on poly(ε-caprolactone) nanospheres. *Biomaterials*, v. 18, p. 327-335, 1997.

MERKLI, A. *et al.* Biodegradable polymers for the controlled release of ocular drugs. *Prog. Polym. Sci*, v. 23, p. 563-580, 1998.

MILLS R.W. & COLS. *Br Dent J*; 186:388.1999.

MILLER, J. A., LIN, S. B., HWANG, K. K. S., WU, K. S., GIBSON, P. E., COOPER, S. L. *Macromolecules* 1985; 18: 32.

NOAH, ERNST MAGNUS; CHEN, JINGSONG; JIAO, XIANG YANG; HESCHEL, INGO; PALLUA, NOBERT. Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen spongs prepared for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 23, p. 2855-2861, 2002.

NOMOTO R. *Dent Mat J*; 16:60. 1997.

PHINNEY DG, KOPEN G, ISAACSON RL, PROCKOP DJ. , Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 1999 Mar 15;72(4):570-85.

PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD et al. Multilineage potencial of adult human mesenchymal stem cells. *Science*.284:p.143-7.; 1999.

REFFITT, D. M.; OGSTON, N. R.; H. F. J. JUGDAOHSINGH, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*, v. 32, n. 2, p.127–35, 2003.

ROMANOV YA, SVINTSITSKAYA VA, SMIRNOV VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like Cells from umbilical cord. *Stem Cells*; 21:105-10.2003.

SANTOS L. A. Biomateriais e biocerâmicas. Campinas –SP: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 45p, Monografia, 1998.

SANTOS, M. C. G, *Biomaterials, an introduction* , Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2003. XXX p. Monografia.

SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P. AND CARVALHO, A.C.C. – Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica - *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37(6): 490-495 – nov-dez, 2004.

SANTOS, M. H.; SHAIMBERG, A. P.; VALERIO, P.; et al. Cytocompatibility evaluation of hydroxyapatite/collagen composites doped with Zn²⁺. *Revista Matéria*, v.12, n. 2, p. 307-312, 2007.

SCLAFANI, ANTHONY P. M.D.; ROMO, THOMAS III M.D.; SILVER, LESTER M.D. Clinical and Histologic Behavior of Exposed Porous High-Density Polyethylene Implants. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 99(1):41-50, January , 1997.

SCHWINDT TT: Polêmica, ética e células-tronco. *Saúde Paulista*, 14: 41, 2005.

SCOTT, G. & GILEAD, D. *Degradable Polymers Principles and Application*. Londres: Chapman & Hall, 1995.

SEAL, B.L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration- review. *Mat. Science and Engineering*, v. 34, p. 147-230, 2001.

SEYMOUR, R. W., ESTES, G. M., COOPER, S. L. *Macromolecules* 1970; 3: 579.

SHIM, W. S.; KIM, J.; PARK, H.; KIM, K.; KWON, I. C.; LEE, D. S.: Biodegradability and biocompatibility of a pH and thermosensitive hydrogel formed from a sulfonamide-modified poly (ε-caprolactone-co-lactide) –poly (ethylene glycol) –poly (ε-caprolactone-co-lactide) block copolymer. *Biomaterials*, vol.27, p.5178-5185, 2006.

SHIM, W. S.; YOO, J. S.; BAE, Y. H.; LEE, D. S.: Novel injectable pH and temperature sensitive block copolymer hydrogel. *Biomacromolecules*, vol.6, p.2930-2934, 2005.

STAVRIDIS, M. *et al.* The influence of surface patterning and/or sterilization on the hemocompatibility of polycaprolactones. *Materials Science and Engineering*, v. 23, p. 359-365, 2003.

TAKEMOTO, K. T.; INAKI, Y.; OTTENBRITE, R. M.: *Funcional Monomers and Polymers*. Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, p. 555, 1987.

WEI, H.; ZHANG, X.; CHENG, C.; CHENG, S.; ZHUO, R.: Self-assembled, thermosensitive micelles of a star block copolymer based on PMMA and PNIPAAm for controlled drug delivery. *Biomaterials*, vol.28, p.99-107, 2007.

WEISS, R. – Células-tronco – O Poder de Dividir – *National Geographic*, 44-69; Julho, 2005.

WILLIAMS JT, SOUTHERLAND SS, SOUZA J, CALCUTT AF, CARTLEDGE RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*. 1999 Jan;65(1):22-6.

YEGANEH, H.; TALEMI, P.: Preparation and properties of novel biodegradable polyurethane networks based on castor oil and poly (ethylene glycol). *Polymer degradation and Stability*, vol.92, p.480-489, 2007.

http://www.bgcirurgioplastica.com.br/artigo27-creme_inj.htm

http://www.biomodulacaocorporal.com.br/polimetilmetacrilato_bioplastia.htm

CAPÍTULO 8

8 CETEA

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) INFORMAÇÃO SOBRE O PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Espécie: Ratos Wistar (1 a 3 meses), Duplo sexo

Acomodação dos animais: tipo caixa de plástico 40 X 40 X 25

Local de execução do projeto: Os animais foram manipulados no laboratório de imunologia celular e molecular. Não foi necessário um ambiente exclusivo para esses experimentos.

8.1 Condições Ambientais do local

Os animais foram mantidos em um biotério que possui 3 salas, uma sala é destinada apenas para a manutenção de ratos. Esta sala possui a dimensão de 2 X 3 metros. A sala é arejada e possui um exaustor. Esta sala também é equipada com aquecedores. Em seu interior existem prateleiras em todas as paredes. Destinadas ao apoio das caixas de animais. As 3 prateleiras são separadas umas das outras por 70 cm, sendo que a prateleira mais baixa está a 1 metro do chão. As gaiolas são separadas por um espaço de 30 cm uma das outras. Apenas técnicos e pesquisadores têm acesso à sala que é mantida trancada. O bioterista responsável monitora a limpeza das gaiolas bem como a água e a comida dos animais. Com controle de temperatura, ventilação e do ciclo da luz. Com acondicionamento e descarte adequados dos dejetos (os quais foram descartados em lixo apropriado, este lixo foi autoclavado antes de ser enviado ao lixo comum). Limpeza e desinfecção das instalações e dos compartimentos (a serragem foi trocada 2 vezes por semana) e as gaiolas foram desinfetadas com esta mesma frequência. O biotério foi limpo diariamente.

8.2 Manejo dos animais

Água: filtrada

8.3 Alimentação

Tipo de ração: Ração padrão para ratos camundongos

8.4 Procedimentos cirúrgicos e de Anestesia

Anestesia geral: Utilizado Pentobarbital, Intraperitoneal – 3cc (dose letal)

8.5 Outras informações

Utilizado o osso parietal para cultivo de células tronco mesenquimais.

8.6 Número de animais

12 ratos foram utilizados no experimento

Nota: Os animais foram manipulados no laboratório de imunologia celular e molecular do ICB da Universidade Federal de Minas Gerais, não foi necessário um ambiente exclusivo para este experimento.

- a) Cultura células: viabilidade celular, dosagem de colágeno, fosfatase alcalina.
- b) Imersão em SBF: análise da adesão em MEV

8.7 Anestesia, preparo do animal e técnica operatória

8.7.1 Tranquilização e indução anestésica

O animais em jejum de 8hs foram previamente pesados e tranquilizados com a associação acepromazina 1% (1mg/Kg) com hidrocloreto de ketamina (20mg/Kg) administrado na mesma seringa por via intramuscular. Durante esta fase de sedação inicial os animais foram tricotomizados no membro posterior esquerdo (joelho e terço proximal e médio da tibia). Em seguida a antissepsia foi feita com solução polvidine degermante e álcool 70%.

Os animais foram infundidos por via venosa com solução fisiológica de NaCl 0,9% através de um cateter de polietileno implantado na veia marginal da orelha esquerda.

8.7.2 Manutenção anestésica

Foi administrado hidrocloreto de ketamina (30mg/Kg) em doses adicionais a cada 30 minutos de procedimento ou quando necessário utilizando-se a via venosa.

8.8 Técnica operatória

O acesso ao fêmur e à tibia foi feito pelo terço proximal da mesma, em sua borda anterior. Após o isolamento estéril da região passamos a abertura da pele e do escasso tecido subcutâneo, em seguida foi visualizada a superfície tibial recoberta com periósteo, este foi incidido e afastado lateralmente para exposição da cortical. Com auxílio de brocas de diâmetros crescentes, foi feito um orifício mais proximal à articulação femuro-tibio-patelar sob irrigação local constante com solução fisiológica de NaCl 0,9%, evitando o aquecimento excessivo da região. O mesmo procedimento foi repetido a 2,0cm do anterior, distalmente, aproveitando a mesma abordagem cirúrgica. A acomodação dos implantes ocorreu quando obtivemos a completa estabilidade do mesmo na lacuna formada. A aproximação do periósteo foi feita com fio absorvível 5,0 (cat gut simples), e o fechamento de pele com fio monofilamentoso de nylon 4,0. No acompanhamento do pós-operatório imediato foi feita a higienização do local até a retirada dos pontos ao fim de 7 dias.

Para os estudos in vivo foram usados 10 dos ratos, onde os biomateriais sintetizados foram injetados ou implantados cirurgicamente sob anestesia e sacrificados em câmara de gás carbônico após 2 e 4 semanas, conforme planejado.