

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS
PROPRIEDADES BIOCOMPATÍVEIS DO POLI
(ϵ -CAPROLACTONA) COM TOPOLOGIA ESTRELA**

Elaine Cristina de Souza Vilela Silva

Itajubá, Novembro de 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA**

Elaine Cristina de Souza Vilela Silva

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DAS
PROPRIEDADES BIOCOMPATÍVEIS DO POLI
(ϵ -CAPROLACTONA) COM TOPOLOGIA ESTRELA**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Materiais para Engenharia como
parte dos requisitos para obtenção do Título de
Mestre em Ciências em Materiais para Engenharia.**

Área de Concentração: Biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antônio Alencar de Queiroz

Novembro de 2009

Itajubá – MG

Dedico este trabalho aos meus pais, Sebastião e Alzira,
ao meu marido Cristiano e à minha filha Julia

Agradecimentos

A Deus por me dar saúde e força para conquistar mais uma vitória em minha vida.

Ao meu marido, Cristiano, pelo amor, carinho, incentivo, paciência, compreensão e por me fazer tão feliz.

Aos meus pais, exemplo de sabedoria, dedicação, honestidade e humildade. Pelo amor, carinho e confiança. A minha mãe por sempre me incentivar. Em especial ao meu amado Pai.

À minha filha, Julia, meu presente de Deus, que me dá força, vida e sabedoria.

À Vanusa que me incentivou a realizar este trabalho e me acompanhou ao longo destes anos.

Ao professor Dr. Alvaro Antônio Alencar de Queiroz, por sua orientação acadêmica, competência e conhecimentos transmitidos. Por ter sido compreensivo pelas dificuldades que passei durante estes anos, muito obrigada.

Ao professor Dr. Demétrio Arthur Werner, pelo apoio e por ter acreditado em mim.

Ao professor Dr. Wander Luiz Vasconcelos da Escola de Engenharia da UFMG por permitir a utilização dos equipamentos de FTIR e Microscopia de Força Atômica do Laboratório de Materiais Cerâmicos.

À Pesquisadora Dra. Daniela Cordeiro Leite Vasconcelos da UFMG pela realização e acompanhamento dos testes de FTIR.

Ao Pesquisador Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes da UFMG pela realização e acompanhamento dos testes de Microscopia de Força Atômica.

À professora Maria Elena pela amizade, apoio e confiança.

Ao Dr. Gustavo Abraham (INTEMA – Mar Del Plata – Argentina) pelas análises de RMN, GPC e DSC.

À Dra. Olga Zazuco Higa do IPEN – SP pelas análises de citotoxicidade e por ceder o laboratório para as análises radioisotópicas.

Aos colegas, Celso Antônio e João Carlos pela colaboração e auxílio na realização de alguns testes de laboratório.

Aos colegas de classe pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao meu grande amigo Carlos Eduardo Jensen pelos ensinamentos sobre Ressonância Magnética Nuclear.

As empresas OTP Biomédica Ltda e Fixomed.

“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência.

E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que

não é preciso dominar a força, mas a razão.

É preciso, antes de mais nada, querer”

Amyr Klink

Sumário

Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
 Resumo.....	 xii
Abstract.....	xiii
 1. Tendências atuais quanto à utilização de polímeros na medicina ortopédica	
1.0 Introdução.....	01
1.1 Conceitos fundamentais sobre a biodegradabilidade e bioreabsorção de polímeros.....	03
1.2 Bioquímica da biodegradação e bioreabsorção de polímeros.....	04
1.3 Próteses fabricadas a partir de polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis: Estrutura e função.....	06
1.4 Comentários.....	08
1.5 Referências Bibliográficas.....	09
 2. Principais Motivações para este trabalho	
2.0 Introdução.....	11
2.1 Próteses de Quadril.....	14
2.2 Próteses de joelho e ombro.....	16
2.3 Implantes de Coluna.....	18
2.4 Cimentos Ortopédicos.....	20
2.5 Âncoras e implantes neurológicos.....	21
2.6 Implantes biodegradáveis e biorreabsorvíveis.....	22
2.7 Comentários.....	24
2.8 Referências Bibliográficas.....	25
 3. Revisão da Literatura	
3.0 Fisiologia do tecido ósseo.....	30

3.1 Crescimento e remodelação óssea.....	39
3.2 Mecanismos de reparo do tecido ósseo.....	40
3.3 A influência dos fatores de crescimento na reparação óssea.....	42
3.4 Poli(ϵ -caprolactona): síntese, propriedades físicas e bioquímicas.....	46
3.4.1 PCL com topologia do tipo estrela (PCL*).....	54
3.5 Referências Bibliográficas.....	61

4. Objetivos.....	66
--------------------------	-----------

5. Experimental

5.0 Síntese do Polímero Poli(ϵ -Caprolactona) com arquitetura do tipo Estrela (PCL*).....	68
5.1 Caracterização Físico-Química do PCL*.....	69
5.1.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	69
5.1.2 Ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN) e carbono ^{13}C RMN).....	71
5.1.3 Análise térmica.....	71
5.1.4 Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR).....	72
5.2 Caracterização Bioquímica.....	73
5.2.1 Produção dos filmes de PCL*.....	73
5.2.2 Adsorção de proteínas séricas.....	74
5.2.3 Estudo da morfologia de filmes protéicos adsorvidos sobre PCL* por microscopia de força atômica (AFM).....	74
5.2.4 Adesão de plaquetas.....	77
5.2.5 Formação de trombos.....	78
5.2.6 Citotoxicidade.....	78
5.2.7 Estudo da degradação enzimática de filmes de PCL*.....	80
5.3 Referências Bibliográficas.....	81

6. Resultados e Discussões

6.0 Caracterização Físico-Química.....	83
6.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	83
6.2 Ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN).....	85

6.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	91
6.4 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	94
6.5 Caracterização Bioquímica.....	95
6.5.1 Adsorção Protéica.....	95
6.5.2 Citotoxicidade.....	104
6.5.3 Adesão de plaquetas e Formação de trombos.....	105
6.5.4 Ensaio de biodegradação.....	110
6.5.5 Microscopia de força atômica da camada protéica adsorvida.....	117
6.6 Referências Bibliográficas.....	121
 7. Conclusões.....	 125
 8. Perspectivas Futuras.....	 127
 Glossário.....	 128

Lista de Figuras

Figura 1.1: Rota metabólica de biorreabsorção dos poliésteres alifáticos.....	05
Figura 1.2: Parafusos e pinos biodegradáveis.....	08
Figura 2.1: Próteses de quadril, joelho, úmero/ombro, cimento ortopédico.....	13
Figura 2.2: Implantes de coluna.....	13
Figura 2.3: Parafusos Biorreabsorvíveis.....	14
Figura 2.4: Âncora biorreabsorvível.....	14
Figura 2.5: Implantes para neurocirurgia.....	14
Figura 2.6: Prótese de quadril (haste femural e acetábulo).....	16
Figura 2.7: Prótese de joelho.....	17
Figura 2.8: Prótese de úmero/ ombro.....	18
Figura 2.9: Implantes de coluna.....	20
Figura 2.10: Âncora biorreabsorvível, âncora de liga de titânio.....	21
Figura 2.11: Distribuição das etiologias dos traumas de face.....	23
Figura 2.12: Estrutura química do poli (ϵ -caprolactona).....	24
Figura 3.1 Corte de osso frontal de rato recém-nascido em processo de ossificação intramembranosa.....	31
Figura 3.2: Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura do tecido ósseo humano mostrando suas lacunas que contém osteócitos.....	32
Figura 3.3: Esquema de reabsorção óssea.....	33
Figura 3.4: Unidade estrutural do tecido ósseo.....	33
Figura 3.5: Tecido Ósseo Compacto.....	34
Figura 3.6: Tecido Ósseo Esponjoso.....	34
Figura 3.7: Estrutura de um osso longo.....	35
Figura 3.8: Ossos chatos da abóbada craniana.....	35
Figura 3.9: Cavidade medular dos ossos.....	36
Figura 3.01: Ossificação membranosa de calota craniana.....	37
Figura 3.11: Esquema da parede de diáfise dos ossos longos.....	38
Figura 3.12: Canais de Havers e canais de Volkmann.....	38

Figura 3.13: Desenho esquemático do processo de reparação de fratura.....	41
Figura 3.14: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de fatores de crescimento incorporados em materiais carreadores.....	45
Figura 3.15: Iniciação da polimerização por abertura do anel de lactonas por iniciadores aniônicos.....	47
Figura 3.16: Polimerização aniônica de lactonas mostrando a clivagem do grupo acil-oxigênio.....	47
Figura 3.17: Polimerização da lactona pelo mecanismo de inserção por coordenação.....	48
Figura 3.18 Reações de transesterificação inter- e intramoleculares durante a polimerização por abertura do anel.....	49
Figura 3.19: Mecanismo de ativação do monômero de lactonas por ROP.....	50
Figura 3.20: Mecanismo de abertura do anel da ϵ -caprolactona.....	50
Figura 3.21: Degradação química do poli (ϵ -caprolactona).....	52
Figura 3.22: Síntese do macrômero de PCL e de PCL ramificado a partir de uma molécula de PCL diol.....	53
Figura 3.23: Representação esquemática de polímeros do tipo estrela com ramificações de mesmo peso molecular e com número de ramificações diferentes.....	55
Figura 3.24: Ilustração do comportamento do novelo polimérico em diferentes solventes.....	56
Figura 3.25: Síntese do polímero poli (ϵ -caprolactona) com topologia do tipo estrela de seis braços.....	57
Figura 3.26: Síntese por polimerização em massa do PCL com diferentes braços usando álcools como iniciadores e SnOct_2 como catalisador da reação.....	58
Figura 3.27: Fotomicrografia obtida por Microscopia Ótica Polarizada do PCL cristalizado a 38°C :.....	60
Figura 3.28: Publicações sobre o uso do PCL* na área biomédica.....	61
Figura 5.1: Síntese do polímero poli (ϵ -caprolactona) estrela.....	68
Figura 5.2: Reator de polimerização utilizado para a polimerização por abertura de anel do monômero ϵ -CL e produção do PCL* com arquitetura estrela de três braços.....	69
Figura 5.3: Filmes de PCL* depositados sobre placa de Petri.....	74

Figura 5.4: Esquema básico do posicionamento da ponta de prova e de sua varredura sobre a superfície da amostra para a coleta de dados ponta a ponta da superfície.....	75
Figura 5.5: Placas de Elisa ilustrando o ensaio de citotoxicidade.....	79
Figura 6.1: Análise de GPC do polímero PCL*.....	84
Figura 6.2: Estrutura do PCL triol.....	85
Figura 6.3A: Espectro de ^1H -RMN do PCL*.....	87
Figura 6.3B: Espectro de ^1H -RMN sinais a e b do PCL*.....	87
Figura 6.4: Espectro de ^{13}C -RMN do PCL*.....	88
Figura 6.5: Ilustração do significado físico da temperatura de transição vítrea (T_g).....	92
Figura 6.6: Curva DSC do PCL* ilustrando a temperatura de fusão cristalina.....	93
Figura 6.7: Curva DSC do PCL* ilustrando a temperatura de transição vítrea (T_g).....	93
Figura 6.8: Bioerosão de uma microesfera biorreabsorvível.....	94
Figura 6.9: Espectro do filme PCL* obtido no espectrômetro Perkin-Elmer 1000.....	95
Figura 6.10: Concentração da proteína HSA em função do tempo para PCL* e PCL em pH 7,4 e a 37 °C.....	98
Figura 6.11: Concentração da proteína HFb em função do tempo para PCL* e PCL em pH 7,4 e a 37 °C.....	99
Figura 6.12: Concentração da proteína IGg em função do tempo para PCL* e PCL em pH 7,4 e a 37 °C	99
Figura 6.13: Isoterma de Langmuir para a adsorção de HSA em PCL e PCL* em pH 7,4 e a 37 °C.....	101
Figura 6.14: Isoterma de Langmuir para a adsorção de HFb em PCL* e PCL em pH 7,4 e a 37 °C.....	102
Figura 6.15: Isoterma de Langmuir para a adsorção de IgG em PCL* e PCL em pH 7,4 e a 37 °C.....	103
Figura 6.16: Ensaio de citotoxicidade de PCL e PCL* contra células de mamíferos (CHO).....	105
Figura 6.17: Plaquetas e seus receptores de superfície responsáveis por sua ativação.....	106
Figura 6.18: Cinética do processo de adesão plaquetária nas superfícies de PCL* e PCL linear.....	107

Figura 6.19: Micrografias do microscópio eletrônico de varredura sobre: vidro, PCL*, PCL linear. Micrografias de epifluorescência das respectivas superfícies.....	108
Figura 6.20: Cinética da formação de trombos sobre PCL (A), PCL* (B) antes do contato com a solução de HSA e após o contato das superfícies de PCL (C) e PCL* (D) com a solução protéica.....	109
Figura 6.21: Ilustração da turbidez após 0h (A), 10 h (B) e 30 h (C) de incubação de uma emulsão do polímero PCL* com as enzimas lipase e colesterol esterase em solução PBS 0,1 mol.L ⁻¹ , pH 7,4 e 37 °C.....	111
Figura 6.22: Superfícies equipotenciais da Cease (A) e lipase (B) simuladas <i>in silico</i>	112
Figura 6.23: Redução da densidade ótica em função do tempo para a hidrólise enzimática do PCL* e PCL na presença de lipase.....	113
Figura 6.24: Redução da densidade ótica em função do tempo para a hidrólise enzimática do PCL* e PCL na presença da enzima colesterol esterase.....	114
Figura 6.25: Gráfico de Lineweaver-Burk obtido para a degradação enzimática dos polímeros PCL e PCL* pela enzima lípase.....	115
Figura 6.26: Gráfico de Lineweaver-Burk obtido para a degradação enzimática dos polímeros PCL e PCL* pela enzima colesterol esterase.....	116
Figura 6.27: Imagens AFM – 3D do filme de PCL* em diferentes concentrações de HSA.....	119
Figura 6.28: Imagens AFM – 3D do filme de PCL* em diferentes concentrações de IgG.....	120

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Relação entre incidência de fraturas e suas causas.....	23
Tabela 5.1 Componentes das formulações das emulsões de PCL e PCL*	81
Tabela 6.1 Grau de substituição do glicerol a partir do peso molecular médio numérico.....	88
Tabela 6.2 Valor médio de unidades de caprolactona (ϵ -CL) por braço da cadeia polimérica.....	89
Tabela 6.3 Cálculo do valor de Ln.....	90
Tabela 6.4 Condições de reação para obtenção do PCL triol.....	91
Tabela 6.5 Principais proteínas do plasma humano.....	97
Tabela 6.6 Parâmetros da isoterma de Langmuir q_m e K para a adsorção de proteínas séricas sobre PCL* e PCL linear.....	104
Tabela 6.7: Eficiência da enzima lipase na biodegradação dos polímeros PCL* e PCL.....	116
Tabela 6.8: Eficiência da enzima colesterol esterase na biodegradação dos polímeros PCL* e PCL.....	116

Lista de abreviaturas

ACD – solução de citrato dextrose
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCP – fosfato de cálcio bifásico
BMP – proteína morfogenética óssea
b-FGF – Fator de crescimento fibroblasto básico
CaCl₂ – cloreto de cálcio
Ca/P – Cálcio/fosfato
CDCl₃ – clorofórmio deuterado
CHO – Cultura de células de ovário de Hamster Chinês
CO₂ – Gás carbônico
CPC – cimento de fosfato de cálcio
⁵¹Cr – Cromo 51
¹³C-RMN – Ressonância magnética nuclear de carbono
DSC – Calorimetria exploratória diferencial
ECM – Matriz extracelular
ε-CL – ε-caprolactona
EPF – Microscopia de epifluorescência
EUA – Estados Unidos da América
DMTA – Análise Termo-Mecano-Dinâmica
FDA – Food and Drug Administration
FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier
γ-Glb – Gama-globulina
GPa – GigaPascal
GPC – Cromatografia de permeação em gel
HA – hidroxiapatita
HFb – Fibrinogênio do soro humano
ΔH_m – Entalpia ou calor de fusão
H₂O – Água
¹H-RMN – Ressonância magnética nuclear de prótons
HSA – Albumina de soro humano

IGF – Fator de crescimento MEVelhante à insulina
 IgA – Imunoglobulina A
 IgG – Imunoglobulina G
 IgM – Imunoglobulina M
 INTO – Instituto Nacional de Traumato-Ortopedia
 IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
 IR – Refratométrico
 LME – Lesão de Medula Espinhal
 MEV – Microscopia eletrônica de varredura
 MET – Microscopia eletrônica de transmissão
 MFA – Microscopia de força Atômica
 MTS – Microscopia de tunelamento de elétrons
 MgCl_2 – Cloreto de magnésio
 $\overline{M}_n$ – massa molecular (peso molecular) médio numérico
 $\overline{M}_w$ – massa molecular (peso molecular) médio ponderal
 MPa - MegaPascal
 MS – Ministério da Saúde
 NaCl – Cloreto de sódio
 IP – Índice de polidispersão
 PBS – Solução tampão fosfato
 PCL – Policaprolactona
 PDGF – Fator de crescimento vascular endotelial
 PDS – Polidioxanona
 PEG – Polietilenoglicol
 PGA – Poli (ácido glicólico)
 pH – Potencial hidrogeniônico
 PLA – Poli (ácido láctico)
 PLGA – Poli ácido láctico-co-ácido glicólico
 PLLA – l- poli ácido láctico
 PLGA – Poli ácido láctico-co-ácido glicólico
 PGI_2 – Prostaglandina sódica
 PPF – polipropileno fumarato
 PMMA- Poli(metacrilato de metila)

PVC – policloreto de vinila
PRP – Plasma rico em plaquetas
PI – Ponto isoelétrico
PS – Poliestireno
PTFE – Politetrafluoroetileno
REMATO – Rede Multicêntrica de Avaliação de Implantes Ortopédicos
rhBMP-2 – Proteína morfogenética óssea recombinante humana 2
rhBMP-7 – Proteína morfogenética óssea recombinante humana 7
ROP – Polimerização por abertura do anel lactônico
SUS – Sistema Único de Saúde
Tc – Temperatura de cristalização
Tg – Temperatura de transição vítrea
THF – Tetrahidrofurano
Tm – Temperatura de fusão
 β -TCP – β -tricalciofosfato
TGF- β – Fator de crescimento transformador ósseo β
TRM – Traumatismo raquimedular
UHMWPE – Polietileno de Ultra-alto peso molecular
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
USP – Universidade de São Paulo
UV-VIS – Ultravioleta – visível
Xc – Grau de cristalinidade

Resumo

Os polímeros biodegradáveis têm sido explorados exaustivamente como biomateriais na área de cirurgia reconstrutiva. Os poliésteres são os polímeros biodegradáveis mais investigados devido a sua ampla diversidade química e versatilidade de suas rotas sintéticas. O polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster biodegradável que tem sido estudado para aplicações médicas como substitutos de enxertos ósseos e sistemas de liberação de fármacos. Neste trabalho, o polímero PCL com topologia do tipo estrela (PCL*) foi sintetizado após polimerização por abertura do anel lactônico do monômero ϵ -caprolactona (ϵ -CL) via complexo de transferência de carga utilizando como iniciador um núcleo de glicerol. A microestrutura do PCL* foi caracterizada por técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC), cromatografia de permeação em gel (GPC), espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) e ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -NMR) e carbono (^{13}C -NMR). As propriedades biocompatíveis do PCL* relativamente ao PCL linear foram investigadas através de técnicas bioquímicas *in vitro* como a adsorção protéica, adesão plaquetária e formação de trombos. A morfologia dos filmes protéicos aderidos ao filme de PCL* foi caracterizada por microscopia de força atômica (MFA). A morfologia das plaquetas aderidas foi estudada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de epifluorescência (EPF), respectivamente. A citotoxicidade de ambos, PCL* e PCL linear foi investigada contra células de mamíferos (CHO). A degradação enzimática de PCL* foi conduzida através de ensaios *in vitro* e avaliada pelo método turbidimétrico. A análise de RMN de ^1H e de ^{13}C revelou a estrutura do tipo estrela de PCL* e FTIR foi usada para identificar a pureza do polímero sintetizado. Os resultados da microscopia de força atômica (MFA) mostraram a formação de uma camada protéica não homogênea sobre PCL* que parece ter contribuído para as propriedades hemocompatíveis do polímero. O PCL* sintetizado mostrou baixo peso molecular e maior cinética de biodegradação. As velocidades de hidrólise enzimática de PCL* foram muito mais rápidas do que aquelas para PCL linear. Os ensaios de biocompatibilidade demonstraram que o PCL* exibiu propriedades biocompatíveis e pode ser um biomaterial interessante para a área médica.

Abstract

The biodegradable polymers have been exhaustively explored as biomaterials in the field of reconstructive surgery. The polyesters are the more investigated of biodegradable polymers due to wide chemical diversity and versatility of their synthetic routes. The poly(ϵ -caprolactone) (PCL) is a biodegradable polyester that has been studied for medical applications as bone grafts replacement and drug delivery systems. In this work, the PCL polymer with star type topology (PCL*) was synthesized after ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone (ϵ -CL) monomer by a charge-transfer complex mechanism using glycerol core as initiator. The microstructure of PCL* was characterized by differential scanning calorimetry (DSC), gel permeation chromatography (GPC), infrared spectroscopy (FT-IR) and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR). The biocompatible properties of PCL* relatively to linear PCL were investigated through biochemical in vitro techniques like as protein adsorption, platelet adhesion and thrombus formation. The morphology of protein films adhered to PCL* films was characterized by atomic force microscopy (MFA). The morphology of adhered platelets was studied through scanning electron microscopy (MEV) and epifluorescence microscopy (EPF), respectively. The cytotoxicity of both, PCL* and linear PCL was investigated against mammalian cells (CHO). The enzymatic biodegradation of PCL* were conducted through in vitro assays and evaluated by turbidimetry method. The ^1H and ^{13}C NMR analysis revealed the PCL* star type structure and FT-IR was used to identify the purity of the synthesized polymer. The AFM results showed an inhomogeneous protein layer formation onto PCL* that seems to have contributed to the hemocompatible properties of material. The synthesized PCL* showed a low molecular weight and higher biodegradation kinetic. The rates of PCL* enzyme hydrolysis were much faster than those of linear PCL. The biocompatibility assays demonstrated that the PCL* exhibited biocompatible properties and may be an interesting biomaterial for medicine area.

1. Tendências atuais quanto à utilização de polímeros na medicina ortopédica

1.0 Introdução

Nas últimas duas décadas, importantes pesquisas foram realizadas no desenvolvimento de polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis destinados a aplicações na medicina e na engenharia de tecidos biológicos em substituição aos materiais tradicionais como metais e cerâmicas.

Os polímeros biodegradáveis representam atualmente os biomateriais de escolha para a construção de próteses temporárias, estruturas porosas, matrizes tridimensionais como os suportes utilizados na engenharia de tecidos e como veículos para liberação controlada de fármacos [1]. A utilização de polímeros biodegradáveis na engenharia de tecidos como suportes para crescimento de células e a formação de um novo tecido *in vivo* tem como vantagem a redução do número de cirurgias, resultando em um menor tempo de recuperação para o paciente e ao mesmo tempo reduzindo o risco de infecção [2].

A tendência atual neste século é a de que nos próximos anos as próteses permanentes sejam substituídas por materiais biodegradáveis (hidroliticamente e enzimaticamente degradáveis) que possam ajudar o corpo a reparar e regenerar os tecidos danificados. Há várias razões favoráveis à utilização de polímeros biodegradáveis sobre os materiais bioestáveis, sendo a principal delas a biocompatibilidade em longo prazo, sendo este um pré-requisito importante para qualificar um material como biomaterial [1].

Considerando a área da engenharia de tecidos biológicos, os polímeros biodegradáveis apresentam algumas vantagens significativas perante os polímeros e outros materiais a exemplo dos metálicos e cerâmicos [3- 6]:

- i) materiais poliméricos possuem módulo de elasticidade mais próximo ao módulo de elasticidade do osso. Assim, durante o processo de remodelação óssea a transferência de tensões ao osso ocorre de forma gradual enquanto ocorre a degradação do material, evitando assim que o fenômeno de *stress shielding* (fenômeno de redução da densidade óssea em função da força que um implante metálico recebe durante a remodelação óssea, sendo que esta força não é transferida ao osso ocasionando seu enfraquecimento) ocorra;
- ii) não há necessidade de uma segunda cirurgia para a remoção do implante e com isso evitam-se custos sócio-econômicos, além dos riscos associados à cirurgia;
- iii) não ocorre a corrosão do implante e liberação de íons metálicos no organismo;

O mercado de biomateriais utilizados em tratamentos ortopédicos está crescendo vertiginosamente no mundo. No passado, os materiais para implante eram designados como bioinertes e atualmente estão sendo denominados materiais bioativos, pois se integram a células ou moléculas biológicas para atuar na regeneração dos tecidos biológicos. No caso dos ossos, estes materiais devem ter a capacidade de osteoindução (promover a diferenciação dos osteoblastos) e osteocondução (permitir o crescimento de um novo tecido ósseo na superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras), promovendo a osteointegração [7, 8].

A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade que um material tem de desempenhar com um tecido hospedeiro uma resposta a uma aplicação específica, não provocando resposta inflamatória nem demonstrando citotoxicidade ou imunogenicidade [1, 2, 9]. A resposta de um tecido a um implante depende de muitos fatores que variam com as propriedades químicas, físicas e biológicas dos materiais, forma e estrutura do implante [1].

A utilização de polímeros naturais degradáveis, como o colágeno, data de milhares de anos, no entanto, a aplicação de polímeros biodegradáveis sintéticos iniciou-se apenas na metade final dos anos sessenta [1]. Suturas cirúrgicas biorreabsorvíveis feitas com polímeros sintéticos, como os poli (α -hidroxiácidos), já possuem aplicação na medicina desde 1970 [10].

As pesquisas de polímeros sintéticos biodegradáveis foram impulsionadas pelo aparecimento de novas tecnologias como a engenharia de tecidos, a medicina regenerativa, a terapia gênica, a liberação controlada de drogas e a bionanotecnologia, as quais requerem como plataforma para sua construção a utilização de materiais biodegradáveis [1].

Os polímeros sintéticos biodegradáveis possuem muitas vantagens em relação a outros materiais para o desenvolvimento de matrizes para o crescimento de células específicas e utilização na engenharia de tecidos. Entre as vantagens incluem-se a capacidade de serem produzidos com propriedades mecânicas sob medida e de degradação cinética adaptadas a várias aplicações. Também podem ser fabricados em várias formas, com poros cujas características morfológicas permitem o crescimento do tecido biológico desejado [11].

De acordo com o tipo de aplicação a que se destina na medicina ortopédica, um material sintético deve possuir características físicas, químicas, biológicas, biomecânicas específicas e propriedades de degradação que proporcionem eficiência terapêutica. As propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas de um material biodegradável variam com o tempo e os produtos de degradação produzidos [1].

Por desempenharem um papel essencial como suportes que proporcionam a formação de estruturas tridimensionais e ambientes de matriz extracelular sintéticos para a regeneração

do tecido biológico, estes suportes devem imitar características da matriz extracelular natural bem como interações célula-matriz extracelular e estratégias de liberação biológica que sinalizem o desenvolvimento do processo de cura. Estes materiais biomiméticos devem ser sintetizados através de modernas tecnologias de processos, com o objetivo de alcançar composições ou propriedades semelhantes às da matriz extracelular [12].

Devido à complexidade e ao vasto campo de aplicações dos polímeros biodegradáveis, tem sido desenvolvida uma variedade de materiais biodegradáveis para a fabricação de implantes com características específicas para cada aplicação biomédica individual. Atualmente a síntese de polímeros biodegradáveis tem sido focada em projetos de síntese de polímeros com propriedades adaptadas para aplicações específicas: desenvolvimento de novos polímeros sintéticos com características químicas exclusivas que aumentem a diversidade de estruturas poliméricas; desenvolvimento de processos biossintéticos que formem estruturas poliméricas biomiméticas; utilização de aproximações computacionais e combinatórias no planejamento do biomaterial para a descoberta de novos polímeros reabsorvíveis [1].

Os polímeros sintéticos podem ser produzidos sob condições controladas exibindo de forma reprodutível suas propriedades físicas e mecânicas como resistência à tração, módulo elástico e razão de degradação. É possível também controlar a presença de impurezas nestes materiais. Riscos como toxicidade, imunogenicidade e favorecimento de infecções são mais baixos para polímeros sintéticos puros com unidade monomérica bem conhecida e de estrutura simples quando comparados aos polímeros naturais. Os poliésteres alifáticos saturados estão entre os polímeros sintéticos biodegradáveis mais usados na engenharia de tecidos incluindo o PLA (poli(ácido láctico)) e suas formas racêmicas, copolímeros do ácido láctico, PCL (poli ϵ -caprolactona) e seus derivados dentre outros [2].

1.1 Conceitos fundamentais sobre a biodegradabilidade e biorreabsorção de polímeros

A biodegradabilidade está associada aos materiais que sofrem dispersão in vivo devido à degradação macromolecular. Os polímeros biodegradáveis podem ser atacados por células e enzimas do organismo formando fragmentos que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo [13].

A biorreabsorção está associada aos materiais poliméricos que sofrem degradação através da diminuição de tamanho sendo reabsorvidos in vivo, ou seja, são eliminados através de rotas metabólicas do organismo. A biorreabsorção traduz-se na eliminação total do material e de seus subprodutos de degradação sem efeitos colaterais residuais [13]. A

biorreabsorção é o processo de remoção do material pela atividade celular e/ou dissolução nos fluidos biológicos [5].

Os α -hidroxi-ácidos como o ácido glicólico, lático e ε -capróico são encontrados naturalmente, e são utilizados para a síntese de polímeros biodegradáveis para aplicação em uma diversidade de produtos úteis para a medicina clínica [10]. A biodegradação e biorreabsorção de poliésteres ocorrem inicialmente através da hidrólise das ligações ésteres resultando na diminuição do peso molecular do polímero, mas sem a perda de massa. Esta degradação inicial ocorre até peso molecular menor do que 50 KDa, no qual se dá início a degradação enzimática. A degradação final e reabsorção dos implantes prosseguem por meio de células do organismo como macrófagos, linfócitos e neutrófilos [10], sendo caracterizada pela perda de massa, acompanhada pela redução do peso molecular, alteração estrutural, e perda das propriedades mecânicas como resistência à tração, à compressão e dureza [6, 13].

Polímeros biorreabsorvíveis são indicados em aplicações que necessitam da presença temporária de um implante polimérico como os materiais para suturas, enxertos vasculares, sistemas de liberação de drogas e membranas periodontais [9].

O PCL de cadeia linear é um polímero aprovado pelo FDA sendo um material muito interessante para aplicação em implantes de longa duração, como o contraceptivo implantável Capronor [10, 19], pois apresenta razão de degradação lenta quando comparada a outros poliésteres como o PGA, o PLA e a polidioxanona (PDS) [10, 14].

1.2 Bioquímica da biodegradação e biorreabsorção de polímeros

O corpo humano possui mecanismos capazes de remover completamente os fragmentos de monômeros resultantes da degradação dos polímeros [2].

Os mecanismos de biodegradação e biorreabsorção envolvem eventos celulares e bioquímicos complexos [13]. Após implante de um material sintético, o organismo promove uma resposta a uma reação inflamatória de corpo estranho. A presença de peróxidos, enzimas e células fagocitárias no processo de degradação representa um papel importante nas pesquisas de polímeros biorreabsorvíveis [13].

Na primeira fase do processo de biodegradação e biorreabsorção, ocorre com a formação de fragmentos menores (monômeros) do polímero pela hidrólise das ligações ésteres, resultando na perda de massa e redução do peso molecular. Na segunda fase, os macrófagos fagocitam e metabolizam estes pequenos fragmentos via ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) [5]. Nesta fase há também a ação das enzimas no processo de degradação [13] e a água e o gás carbônico gerados são eliminados do organismo,

principalmente pela respiração. A massa do polímero desaparece rapidamente [5, 13], há perda das propriedades mecânicas do material, como resistência à tração e à compressão [6, 13].

A biorreabsorção pelo organismo ocorre quando a biodegradação gera produtos e subprodutos orgânicos que possam ser metabolizados através do ciclo de Krebs (ciclo do ácido tricarboxílico) [13]. A Figura 1.1 mostra a rota metabólica de degradação in vivo para o PLA e PGA. Após a hidrólise das moléculas de PLA e PGA, ocorre a oxidação do PLA em ácido láctico e a conversão das unidades de PGA em glicina, que por sua vez são convertidos em ácido pirúvico. Na presença de acetil coenzima A, há liberação de CO_2 seguida pela decomposição em citrato. O citrato será incorporado ao ciclo de Krebs, formando CO_2 e H_2O , que são eliminados através da urina e respiração [6, 13].

O mecanismo de degradação da PCL envolve mecanismos similares ao do PLA, através de reações enzimáticas [14] ou hidrólise das ligações ésteres ocorrendo à perda de peso através da difusão de oligômeros [2].

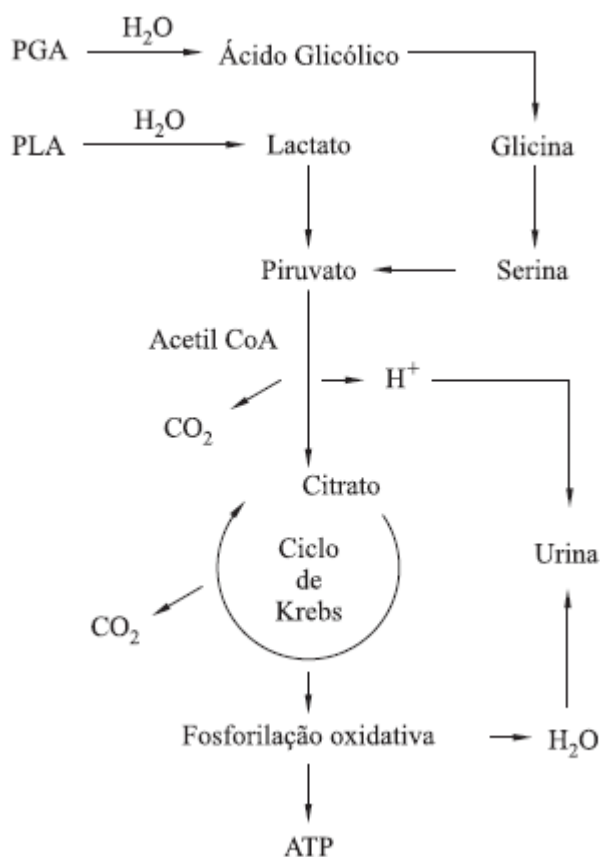


Figura 1.1 – Rota metabólica de biorreabsorção dos poliésteres alifáticos (PLA e PGA) [13].

1.3 Próteses fabricadas a partir de polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis: Estrutura e função

O uso de implantes biorreabsorvíveis iniciou-se em 1962 com o desenvolvimento de suturas de PGA (Dexon) [15]. Na década de 60, Kulkarni e colaboradores descreveram o uso de implantes de PLA na forma de haste e sutura biodegradável no reparo de fraturas mandibulares em cachorros, o que gerou grande interesse na aplicação destes materiais na medicina [6]. Em 1975 foi introduzido no mercado o Vycril, composto de 92% de PGA e 8% de PLA.

Na década de 80, melhorias nas propriedades destes implantes levaram a um aumento de seu uso fora dos Estados Unidos. Em 1991 tornaram-se comercialmente disponíveis no mercado americano implantes feitos em PGA e PDS. Os implantes feitos em PLA e PLLA foram comercializados a partir de 1994 na forma de hastes e em 1995 como parafusos.

Os polímeros utilizados como dispositivos implantáveis na área ortopédica necessitam cumprir alguns requisitos como fornecer suporte mecânico adequado ao crescimento de células enquanto é degradado gradualmente em produtos biocompatíveis. Além disso, devem ter a capacidade de incorporar células, fatores de crescimento, fármacos e propiciar ambientes de osteocondução e osteoindução [16].

No campo de cirurgia ortopédica, estes dispositivos são utilizados na fixação de fraturas, osteotomias, artrodeses e reparo de tecidos moles [15]. Na área ortopédica são descritas a fixação de fraturas de pé e tornozelo, mão, joelho [4, 15], cotovelo, pelve e fraturas zigomáticas [6]. Miniplacas e parafusos têm sido usados com sucesso em cirurgias craniofaciais.

Os pinos reabsorvíveis são ideais para a fixação de fraturas pediátricas [14, 17, 18]. Os dados da literatura mostraram que em 140 pacientes pediátricos tratados com hastes biorreabsorvíveis para fixação de fraturas de tornozelo, cotovelo e mãos, a prevalência de reações transitórias foi 2,1% e foram consideradas reações suaves [15]. Estudos mostraram que fraturas intra-articulares do talo e calcâneo podem ser tratadas com implantes biorreabsorvíveis. Com a fixação reabsorvível não é necessário a realização de uma segunda cirurgia para remoção do implante, diminui a chance de fadiga sendo possível o acompanhamento da evolução do paciente por imagens de ressonância magnética nuclear.

Com relação às propriedades viscoelásticas os implantes biodegradáveis apresentam maior deslocamento e relaxamento sob tensão quando comparados com os materiais metálicos. Clinicamente isto significa que os implantes biodegradáveis possuem um desempenho mecânico pobre quando usados sob compressão [15].

Um implante biorreabsorvível ideal deveria possuir as características de resistência similares aos implantes metálicos, preservando suas propriedades até que o processo de cura do paciente tenha ocorrido, degradando lentamente com o tempo e seus produtos de biodegradação eliminados totalmente do organismo. Entretanto, o implante biorreabsorvível não alcança a propriedade de um material “ideal”. O módulo elástico do aço inoxidável é de 200 GPa, comparado com aproximadamente 2 a 15 GPa da maioria dos implantes biorreabsorvíveis. O módulo de elasticidade médio do osso é de 16,5 GPa [22, 23]. A tensão no limite de escoamento relatada para o PLLA está entre 11 a 72 MPa e para o PGA é de 57 MPa, enquanto que para o aço inoxidável é de 250 MPa. Uma técnica chamada *self-reinforcing* (auto-reforçado) foi desenvolvida para melhorar as características mecânicas dos implantes biorreabsorvíveis [15]. Um dos métodos mais utilizados para se produzir um polímero auto-reforçado é o *die-drawing*, onde a amostra do polímero é puxada através de uma matriz aquecida (em temperaturas abaixo do ponto de fusão (T_m) e acima da temperatura de transição vítrea (T_g)) com dimensões menores que o original [24]. Dados da literatura mostram que a resistência a tração de pinos com diâmetro de 2 mm de PLLA é significativamente maior do que fios de Kirschner de aço inoxidável de dimensões equivalentes. Parafusos de PLA e de aço inoxidável foram testados em um molde de articulações cadavéricas e comparados. Nenhum dos parafusos falhou, e a resistência à fadiga foi similar entre os dois grupos [15]. As propriedades mecânicas do osso são altamente anisotrópicas, por exemplo, o módulo elástico do osso humano cortical está na faixa de 7–30 GPa, com uma média de 20 GPa, dependendo das condições do teste. Valores próximos do módulo elástico do material implantado e do osso favorecem a absorção óssea e ameniza a pressão exercida que é causada frequentemente por implantes com alto módulo elástico [21].

As propriedades mecânicas e a velocidade de degradação dos polímeros sintéticos podem ser alteradas por uma simples modificação química. Suas propriedades físicas e químicas podem ser controladas e eles podem ser fabricados em quantidades quase que ilimitadas. Isto faz com que eles sejam produzidos com velocidades de degradação variáveis, levando vários dias até anos para serem degradados e com propriedades mecânicas apropriadas a diferentes aplicações tais como substitutos para pele, ossos e cartilagens [11].

Os implantes biorreabsorvíveis para fixação de fraturas disponíveis no mercado norte americano são pinos de PLA e PGA com diâmetros variáveis de 1,1, 1,5, 2,0 e 3,2 mm. Pinos retos e cônicos de PDS são disponíveis em diâmetros de 1,3 e 2,0 mm. Parafusos de PLLA auto reforçados com roscas e em forma de rebite estão disponíveis atualmente no comércio sendo fabricados por várias empresas (Figura 1.2) [20].

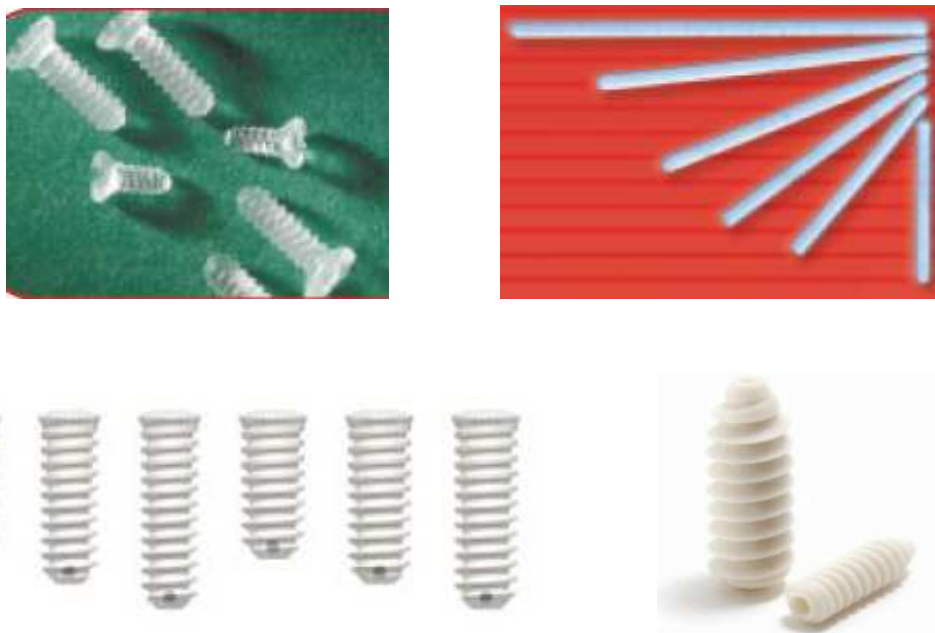


Figura 1.2 – Parafusos e pinos biodegradáveis [20].

1.4 Comentários

O uso de materiais reabsorvíveis e biodegradáveis para a fabricação de produtos médicos têm sido muito difundido na prática clínica, pois proporciona ao paciente um tempo de recuperação mais curto devido ao menor número de cirurgias e reduz o risco de infecção [2].

Os polímeros sintéticos biodegradáveis têm um grande potencial para aplicação na engenharia de tecidos [11], na utilização em implantes para a área ortopédica e como matrizes para liberação de drogas [15]. Há muitos implantes bioabsorvíveis disponíveis no mercado como pinos, placas, malhas, parafusos, parafusos de interferência, âncoras de suturas. Entre os materiais mais pesquisados e conhecidos estão o PLA e PGA. Entretanto, a maior dificuldade no desenvolvimento de implantes biorreabsorvíveis está relacionada às suas propriedades mecânicas e viscoelásticas. Parafusos biorreabsorvíveis apresentam um desempenho deficiente quando colocados em locais que sofrem compressão, como tornozelo e pé.

Implantes com área superficial maior (parafusos e pinos serrados x hastes e pinos) apresentam um aumento na incidência de reações inflamatórias clinicamente significantes. Miniplacas e parafusos têm sido utilizados com sucesso em cirurgias craniofaciais. Estes estudos já demonstraram também através de análise biomecânica que placas e parafusos de titânio têm maior rigidez do que implantes biorreabsorvíveis [15].

Apesar da variedade de polímeros sintéticos disponíveis no mercado, Estados Unidos, Europa e Japão são os países dominantes na área. O Brasil ocupa neste caso uma posição que

pode ser considerada incipiente num mercado altamente promissor que representa somente na área ortopédica cerca de 24 bilhões de dólares.

Nos últimos anos o polímero PCL tem sido investigado e sugerido como material potencial para várias aplicações clínicas, como substitutos de ureter, espaçador temporário de articulação, nanocompósitos para reparo e substituição óssea e matrizes para o desenvolvimento de enxerto vascular [9]. Entretanto, a participação brasileira na geração de conhecimentos tecnológicos para a área clínica é muito pequena o que nos motiva a desenvolver este trabalho.

1.5 Referências Bibliográficas

- 1 - NAIR L.S.; LAURENCIN C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, 32(8-9): 762-798, 2007.
- 2 - REZWAN K.; CHEN Q. Z.; BLAKER J. J.; BOCCACCINI A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials.**, 27 (18): 3413-3431, 2006.
- 3 - ELIAS N.; LEAL D. T. N.; SANTOS L. A. M. Fixação interna das fraturas do tornozelo com parafusos biodegradáveis. **Rev. Bras. Ortop.**, 32 (4): 319-322, 1997.
- 4 - FUCHS M.; KOSTER G.; KRAUSE T.; MERTEN H. -A.; SHIMID A. Degradation of and intraosseous reactions to biodegradable poly-L-lactide screws: a study in minipigs. **Arch Orthop. Trauma. Surg.**, 118: 140-144, 1998.
- 5 - BUIJS G. J.; STEGENGA B.; BOS R.R.M. Efficacy and Safety of Biodegradable Osteofixation Devices in Oral and Maxillofacial Surgery: a Systematic Review. **J. Dent. Res.**, 85 (11): 980-989, 2006.
- 6 - ATHANASIOU K. A.; AGRAWAL C. M.; BARBER F. A.; BURKHART S. S. Orthopaedic Applications for PLA-PGA Biodegradable Polymers. **Arthroscopy: J. Arthr. Rel. Surgery**, 14 (7): 726-737, 1998.
- 7 - ROSSI R. JR.; GARG A.K. **Implantodontia - Bases Clínicas e Cirúrgicas**. São Paulo, Robe Editora, p. 225, 1996.
- 8 - GUIZZARD S.; GALLI C.; GOVONI P.; BORATO R.; CATTARINE G.; MARTINI D.; BELETTI S.; SCANDROGLIO. Polydeoxyribonucleotide (PDRN) promotes human osteoblast proliferation: a new proposal for bone tissue repair. **R. Life Sci.**, 73 (15): 1973-1983, 2003.
- 9 - SERRANO M. C.; PAGANI R.; VALLET-REGÍ M.; PEÑA J.; RÁMILA A.; IZQUIERDO I.; PORTOLÉS M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials.**, 25: 5603–5611, 2004

- 10 - PACHENCE J. M.; BOHRER M. P.; KOHN J. **Biodegradable Polymers. Principles of Tissue Engineering**. 3 ed., 2007. Cap. 23, p. 323 - 39.
- 11 - GUNATILLAKE P. A.; ADHIKARI R. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. **Europ. Cells. Mater.**, 5: 1-16, 2003.
- 12 - MA P. X. Biomimetic materials for tissue Engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 60: 184-198, 2008.
- 13 - BARBANTI S. H.; ZAVAGLIA C. A. C.; DUEK E. A. R. Bioresorbable Polymers in Tissue Engineering. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 15 (1): 13-21, 2005.
- 14 - SABINO, M. A. Oxidation of polycaprolactone to induce compatibility with other degradable polyesters. **Polym. Degrad. Stability**, 92 (6): 986-996, 2007.
- 15 - RAIKIN S. M.; CHING A. C. Bioabsorbable Fixation in Foot and Ankle. **Foot Ank. Clin. N. Am.**, 10: 667– 684, 2005.
- 16 - WIDMER M. S.; MIKOS A. G. **Fabrication of Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering**. Cap. II.5. Institute of Biosciences and Bioengineering, Rice University, USA.
- 17 - EPPLEY B. L.; MORALES L.; WOOD R.; PENSLER J.; GOLDSTEIN J.; HAVLIK R. J.; HABAL M.; LOSKEN R.; WILLIAMS J. K.; BURSTEIN F.; ROZZELLE A. A.; Sadove A. M. Use of Resorbable Plates and Screws in Pediatric Facial Fractures. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 63: 385-391, 2005.
- 18 - EPPLEY B. L. Resorbable PLLA-PGA Plate and Screw Fixation in Pediatric Craniofacial Surgery: Clinical Experience in 1883 Patients. **Plast. Reconstr. Surg.**, 114(4): 850-856, 2004.
- 19 - CHENG L.; GUO S.; WU W. Characterization and in vitro release of praziquantel from poly(ϵ -caprolactone) implants. **Intern. J. Pharm.**, p. 1-8, 2009.
- 20 - Inion OY. www.inion.com. Catálogo de produtos.
- 21 - FU T.; ZHAO J.-L.; XU K.-W. The designable elastic modulus of 3-D fabric reinforced biocomposites. **Materials Letters**, 61 (2): 330–333, 2007.
- 22 – CHRISTENSEN F. B.; DALSTRA M.; SEJLING F.; OVERGAARD S.; BUNGER C. Titanium-alloy enhances bone-pedicle screw fixation: mechanical and histomorphometrical results of titanium-alloy versus stainless steel. **Eur. Spine J.**, 9: 97–103, 2000.
- 23 – IM G.; SHIN S. R. Treatment of femoral shaft fractures with a titanium intramedullary nail. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, 401: 223–229, 2002.
- 24 - MORITA A. T.; TOMA M. S.; DE PAOLI MA. Low Cost Capillary Rheometer and Self-Reinforcement Module. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 15 (1): 68-72, 2005.

2. Principais motivações para este trabalho

2.0 Introdução

Com o rápido crescimento ocorrido nas últimas duas décadas, o mercado potencial mundial de produtos desenvolvidos para engenharia de tecidos é estimado em 100 bilhões de euros por ano. A engenharia de tecidos tem como objetivo associar células do próprio paciente, suportes biodegradáveis e fatores de crescimento, proporcionando vantagens consideráveis sobre as intervenções cirúrgicas utilizadas para reparar ou regenerar tecidos lesionados por trauma ou doença [1].

Em 2005, o mercado músculo-esquelético foi estimado em US\$ 24 bilhões, com US\$13,3 bilhões correspondendo ao mercado norte-americano. A participação dos EUA no mercado de biomateriais está entre 35 a 45% do mercado mundial, enquanto o mercado europeu responde por aproximadamente 25% [2].

Somente nos Estados Unidos são executados por ano 450.000 procedimentos de enxertos ósseos e 250.000 procedimentos de artroplastia do joelho [3].

Em 2003, as vendas de biomateriais poliméricos superaram US\$ 7,0 bilhões correspondendo a quase 88% do mercado de biomateriais comercializados naquele ano. O mercado de materiais biocompatíveis alcançou US\$ 11,9 bilhões em 2008 indicando uma vasta comercialização de materiais poliméricos nas próximas décadas [4].

Em 2004, os gastos do SUS com implantes ortopédicos, incluindo implantes do tipo síntese (utilizados para a reconstituição de articulações), coluna, fixadores, próteses e cerâmicas foi de aproximadamente R\$ 103 milhões [5]. Os maiores gastos são com implantes do tipo síntese, como parafusos e placas de titânio, hastes intramedulares, síntese ligamentar e fios de aço e implantes tipo prótese utilizados para reconstituição das articulações. Estes implantes (síntese e prótese) representaram aproximadamente de 38% do valor total gasto pelo SUS para a compra de implantes ortopédicos no ano de 2003. Além do impacto financeiro, as próteses que substituem parcial ou integralmente as articulações, contribuem para altas taxas de mortalidade e agravos à saúde, grande número de cirurgias de revisão e dias de internação, além de impactos negativos na qualidade de vida dos pacientes. Entretanto, espera-se a melhoria na qualidade de vida dos pacientes e redução dos custos para o SUS [5].

A maior parte dos implantes ortopédicos é utilizada em casos de fraturas e doenças degenerativas. Há também implantes desenvolvidos para reforçar ou substituir ossos

acometidos por tumores. A recuperação do paciente envolve vários fatores como o estado geral de saúde do paciente e o tipo de problema que ocasionou a colocação do implante ortopédico. A indicação para o uso de determinada prótese depende do tipo de doença, da idade do paciente, da qualidade do osso e da experiência do cirurgião [6].

Em 2004, somente o procedimento de artroplastia total de quadril gerou quase 10 mil internações e um gasto total de quase R\$ 30 milhões para a compra de próteses, que corresponde a 38% do gasto com implantes ortopédicos. Além disso, somente em 2004 houve cerca de 1500 cirurgias de revisão responsáveis por um gasto adicional de quase R\$ 7 milhões em próteses [7]. Estes números não representam a demanda real por estes serviços, uma vez que, a esperança de vida do brasileiro vem aumentando a cada ano, passando de 71,3 anos em 2003 para 71,7 anos em 2004 e 72,35 anos em 2006. Com o aumento continuado da longevidade do brasileiro, haverá necessidade de se ampliar a oferta desta tecnologia [8].

Uma variedade de implantes ortopédicos, parafusos, placas e hastes que substituem total ou parcialmente as articulações do corpo humano, como quadril, joelho e ombro, estão disponíveis no mercado mundial [5].

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) os produtos em uso na área de ortopedia e neurortopedia são: próteses de quadril, joelho, úmero/ ombro (Figura 2.1), implantes de coluna (Figura 2.2), parafusos biorreabsorvíveis (Figura 2.3), cimentos ortopédicos (Figura 2.1), âncoras (Figura 2.4), implantes neurológicos (Figura 2.5) [7].



Figura 2.1 – Próteses de quadril (A), joelho (B), úmero/ ombro (C), cimento ortopédico (D) [6].



Figura 2.2 – Implantes de coluna [38].



Figura 2.3 – Parafusos Biorreabsorvíveis [54].



Figura 2.4 – Âncora biorreabsorvível [54].



Figura 2.5 – Implantes para neurocirurgia [38].

2.1 Próteses de quadril

De acordo com a Fundação Nacional de Osteoporose Norte-Americana, estima-se que mais de 100 milhões de pessoas no mundo esteja sob o risco de desenvolver fraturas secundárias a osteoporose. Somente nos Estados Unidos o risco de ocorrer fraturas de coluna, quadril e raio distal estão acima de 40% para as mulheres e 13% para os homens com idade superior a 50 anos. Estima-se mundialmente a ocorrência de 700.000 fraturas por ano por

compressão em vértebras osteoporóticas, sendo mais de um terço delas cronicamente dolorosas. Nos Estados Unidos os custos diretos são superiores a 17 bilhões de dólares [9]. Com o aumento da idade da população estima-se que os custos diretos associados às fraturas relacionadas à osteoporose excedam os 60 bilhões de dólares em 2030 [10].

Mundialmente estima-se que mais de 800.000 cirurgias de substituições de próteses de quadril são executadas por ano, e deste total, aproximadamente 1 a 10% são devido ao afrouxamento asséptico. O afrouxamento asséptico leva a uma substituição do implante ou revisão, ambos são dolorosos para o paciente, tecnicamente difíceis para o cirurgião e caro para o serviço de saúde [11].

De acordo com dados internacionais, aplicados também à realidade brasileira, 30% das pessoas acima de 65 anos sofrem quedas ao menos uma vez por ano. A associação da queda com o enfraquecimento do osso, que caracteriza a osteoporose, quase sempre leva à fratura. Por isso, é necessário discutir as formas de prevenção, diagnóstico e tratamento da osteoporose, especialmente em função do envelhecimento da população [12].

Cerca de 32% das mulheres que vivem até os 80 anos sofrem fratura de quadril, com risco de óbito equivalente aos causados por câncer de mama. Entre os homens, 17% terão a fratura, segundo dados da Universidade de Alabama, dos Estados Unidos. O tipo de fratura osteoporótica, ou por fragilidade, mais perigosa, é a do fêmur, ou quadril, que provoca mortalidade de 20% no ano seguinte à fratura, além de dependência e asilamento [12].

Entre os homens com 80 anos ou mais, o número de pacientes acometidos pela osteoporose chega a 36,4%. Enquanto 19% das mulheres morrem um ano depois da fratura causada por osteoporose, nos homens esse número quase dobra, subindo para 39%. Estima-se ainda que o número aproximado de fraturas de quadril em 2025 será de 3,94 milhões (1,16 milhões em homens e 2,78 milhões em mulheres). Esse é o tipo de fratura osteoporótica mais grave, responsável por um grande índice de incapacidade, que gera dependência, morbidade (complicações relacionadas à imobilidade) e mortalidade. Segundo dados de um estudo canadense publicado na revista *Clinical Therapeutics* em 2004, pelo menos um terço de todas as fraturas de quadril ocorrem em homens. A probabilidade de um homem aos 50 anos ter uma fratura de quadril é de cerca de 11% , já na mulher esse índice sobe para 22% [12].

Nos EUA, mais da metade dos indivíduos acima dos 50 anos têm osteopenia ou osteoporose. São 1,5 milhões de fraturas ao ano, com custos projetados de até 17 bilhões de dólares, maior que os com câncer de mama, ou derrame, ou diabetes, ou doença pulmonar crônica. A osteoporose ocorre em 18 a 28% das mulheres com idade igual ou maior que 50

anos, e em 6 a 22% dos homens nessa mesma faixa. Estima-se que mais de 200 milhões de mulheres no mundo tenham a doença [12].

Os tipos de próteses utilizados em cirurgias do fêmur são as próteses não cimentadas e próteses cimentadas. A prótese não cimentada é indicada para pessoas mais jovens, com boa qualidade óssea. As partes do fêmur (acetábulo e componente femural (Figura 2.6) são fixadas diretamente na superfície óssea, sem a utilização de cimento [13]. A prótese cimentada é utilizada em cirurgias de artroplastia total de quadril em pacientes com idade avançada. A prótese cimentada usa cimento ósseo para fixar o componente acetabular na bacia e a parte femoral no fêmur. A mais utilizada é a prótese de Charnley [6, 13, 14].



Figura 2.6 – Prótese de quadril (haste femural e acetábulo) [6].

As próteses atuais são feitas de materiais biocompatíveis. Os mais empregados são: polietileno de alta densidade, ligas metálicas de cromo – cobalto - molibdênio, cromo - titânio, titânio – alumínio – vanádio, cimento ósseo polimetilmetacrilato (PMMA). O acetábulo é confeccionado com polietileno de alta densidade e a parte femoral é feita de liga metálica [6].

2.2 Próteses de joelho e ombro

A artroplastia total de joelho é uma cirurgia realizada para substituir a articulação “doente” por uma prótese. A articulação danificada é substituída por materiais metálicos e poliméricos [12]. A artroplastia total de joelho pode ser realizada utilizando-se próteses cimentadas e não cimentadas (Figura 2.7) [15].



Figura 2.7 – Prótese de joelho [55].

O desenvolvimento de próteses que preservassem os ligamentos cruzados e colaterais iniciou-se com Guston [16]. Posteriormente, Hungerford et al [17] introduziram o uso de próteses totais do joelho que não necessitavam do cimento ortopédico para fixação óssea.

Os implantes não cimentados possuem superfície porosa, constituída por microesferas que permitem a aderência na interface superfície-osso, favorecendo a osteointegração. As principais justificativas para a utilização de materiais não cimentados referem-se à possibilidade de um tipo de fixação alternativa, biológica, sem os problemas potencialmente provocados pelo uso do cimento ortopédico [15]. Os cimentos ortopédicos, como por exemplo, o cimento acrílico, não é biodegradável e não favorece a osteointegração. [18].

As próteses de joelho são confeccionadas de materiais metálicos: ligas de aço, liga de cromo e cobalto, liga de titânio e alumínio; materiais poliméricos: polietileno, PVC polipropileno; espuma de poliuretano, e cimento acrílico utilizado para fixação da prótese [6].

Os gastos do SUS no ano de 2004 com próteses de joelho foram de aproximadamente R\$ 450.000,00 [19].

Desde a década de 70 é realizada no Brasil a artroplastia de ombro, entretanto, foi a partir da metade dos anos 80 que o procedimento se tornou melhor conhecido pela comunidade ortopédica [20].

As fraturas de escápula são pouco freqüentes, representando 3 a 5% das fraturas da cintura escapular (clavícula, escápula e úmero) (Figura 2.8) e apenas 0,4% a 1% das fraturas do esqueleto. Diversos estudos já demonstraram que as fraturas escapulares são decorrentes de traumas de grande energia, apresentando alto índice de lesões associadas (35 a 98%). As lesões associadas mais freqüentes, segundo a literatura, são: fraturas de costelas ipsilaterais

(27 a 54%), contusão pulmonar (11 a 54%), fraturas da clavícula (17 a 40%), pneumotórax (11 a 38%) e fraturas do úmero (12%) [21].

As fraturas da extremidade proximal do úmero são freqüentes e associadas a traumas de baixa energia, acometendo principalmente pessoas idosas, entre 60 e 80 anos de idade. A incidência dessas fraturas tem aumentado, bem como a média de idade dos pacientes acometidos. Em 2006, após análise de um grupo populacional definido, Palvanen e colaboradores sugerem que a incidência das fraturas da extremidade proximal do úmero triplique nos próximos 30 anos [22]. Estas fraturas podem ser tratadas utilizando-se placas e parafusos, como placas em liga metálica de aço inoxidável [23].

As próteses de ombro (Figura 2.8) são compostas por parte metálicas e de polímeros. A parte que substitui a extremidade superior do úmero é metálica e a parte confeccionada em material polimérico é ligada a articulação glenoumeral. As próteses de ombro são confeccionadas em aço inoxidável austenítico cromo – níquel - molibdênio e polietileno [6].



Figura 2.8 – Prótese de úmero/ ombro [55].

2.3 Implantes de coluna

A incidência das fraturas da coluna vertebral tem aumentado nas últimas décadas, tendo como causa principal o aumento no número de acidentes industriais e automobilísticos, que tem sido os responsáveis pelas lesões complexas e graves da coluna vertebral. Nos pacientes politraumatizados a incidência das fraturas da coluna vertebral é maior, e também a sua associação com as lesões neurológicas [24].

Outras causas freqüentes de fratura da coluna vertebral são as quedas de altura, mergulho em águas rasas e ferimentos por projéteis de arma de fogo. O conhecimento dos

dados epidemiológicos dessas fraturas é muito importante para a elaboração de medidas e ações preventivas, que poderiam ser muito eficientes na redução da sua incidência, e principalmente na prevenção das seqüelas decorrentes de lesão da medula e dos nervos espinhais [24].

A medula espinhal está intimamente relacionada com as vértebras, e pode ser lesada nas fraturas da coluna vertebral. A lesão da medula espinhal (LME) ocorre em aproximadamente de 15 a 20% das fraturas da coluna vertebral e a incidência desse tipo de lesão apresenta variações nos diferentes países. Estima - se que na Alemanha ocorram anualmente 17 casos novos por milhão de habitantes, nos EUA ocorram de 32 a 52 casos novos anuais por milhão de habitantes e no Brasil cerca de 40 casos novos anuais por milhão de habitantes, totalizando 6 a 8 mil casos por ano, cujo custo aproximado é de US\$ 300 milhões por ano. A lesão da medula espinhal ocorre com maior freqüência no sexo masculino, na proporção de 4:1, na faixa etária entre 15 a 40 anos. Acidentes automobilísticos, queda de altura, acidente por mergulho em água rasa e ferimentos por arma de fogo têm sido as principais causas de traumatismo raquimedular (TRM). A freqüência dos TRM em decorrência de ferimentos por projéteis de arma de fogo tem aumentado de modo considerável, refletindo o alto nível de violência nos grandes centros [24].

Os implantes para coluna vertebral são confeccionados em liga de titânio – alumínio – vanádio, na forma de parafusos, placas, hastes, ganchos e cages (cestos) (Figura 2.9) [6]. O titânio possui ótima biocompatibilidade (a melhor dentre os biomateriais metálicos), elevada resistência ao desgaste mecânico, tenacidade suficiente para reduzir o risco potencial de fratura e viabilidade de fabricação em diferentes formatos [25]. O implante de titânio apresenta-se com os tecidos adjacentes bem vascularizado, tem maior flexibilidade, isto é, um menor módulo de elasticidade (105 GPa) quando comparado a outros metais (aço inoxidável 316L – 193 GPa). O módulo de elasticidade médio do osso é de 16,5 GPa [26, 27].

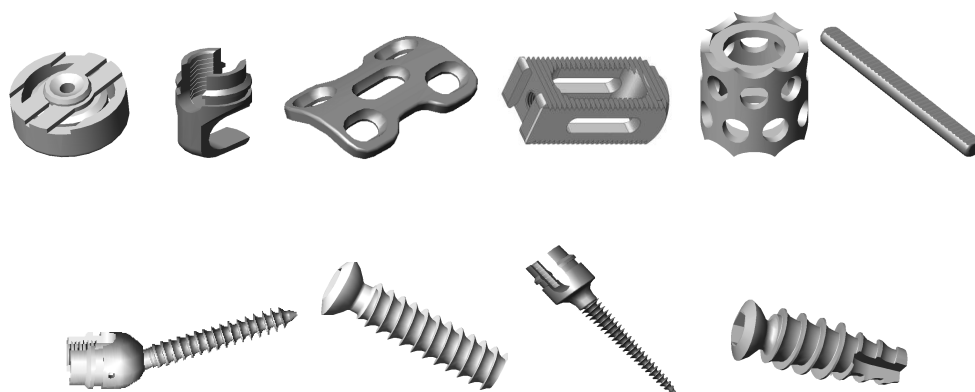


Figura 2.9 – Implantes de coluna [56].

2.4 Cimentos ortopédicos

A utilização de cimento ósseo em artroplastias causou grandes mudanças no conceito de fixação do implante ao osso [28]. Sua principal função é de colar a prótese ao osso e atuar como interface elástica capaz de transmitir cargas da prótese ao osso [29, 30, 31].

Os cimentos ósseos acrílicos à base de PMMA (poli (metacrilato de metila) são utilizados em cirurgias ortopédicas e odontológicas há mais de 40 anos [29]. Desde a década de 50, o PMMA já era utilizado para a fixação de próteses em cirurgias de artroplastia total de quadril [29, 30].

Próteses cimentadas são utilizadas em cirurgias de artroplastia total de quadril em pacientes com idade avançada. Neste tipo de prótese o cimento ósseo é utilizado para fixar o componente acetabular na bacia e a parte femoral no fêmur [6].

Muitos outros tipos de resinas acrílicas já foram testadas, no entanto, não provaram ser úteis devido à força de adesão inadequada e a baixa biocompatibilidade [32]. As resinas de cura rápida injetáveis também são utilizadas no preenchimento de defeitos ósseos, defeitos causados por fraturas do corpo vertebral e estabilização de osteoporose [33].

A aplicação de cimentos ósseos injetáveis em ortopedia requer que estes tenham propriedades adequadas, como alta resistência mecânica e biocompatibilidade [34]. Os cimentos ósseos injetáveis são aplicados nos procedimentos de vertebroplastias percutâneas, no qual o cimento ósseo é injetado diretamente no corpo das vértebras com fraturas provocadas por osteoporose ou lesões associadas a tumores [35].

Atualmente, os cimentos ósseos têm sido utilizados como veículo de liberação local de drogas, como antibióticos, antiinflamatórios e anestésicos locais. A liberação da droga diretamente no tecido danificado e em altas concentrações resolve o problema do efeito

terapêutico reduzido obtido pela administração por vias tradicionalmente utilizadas ocasionada pela limitada circulação sanguínea no tecido ósseo [31, 36]. Atualmente, existem cinco tipos de cimentos ortopédicos associado a antimicrobianos já aprovados pelo FDA [31].

Há muitos cimentos ósseos disponíveis no mercado mundial, como cimentos acrílicos, cimentos à base de poliuretanos e/ ou fosfatos de cálcio para aplicações médicas na área ortopédica [37].

2.5 Âncoras e implantes neurológicos

As âncoras (Figura 2.10) podem ser confeccionadas em materiais absorvíveis e não absorvíveis [19]. São utilizadas para aplicações em cirurgias buço-maxilo-faciais, crânio-maxilo-faciais [38] e cirurgias de ombro [39]. O produto Endobrow (LactoSorb®) comercializado no Brasil é um tipo de âncora utilizado em procedimentos de lifting. É um sistema de parafuso de pressão com orifício para a inserção de um fio de sutura [38].



Figura 2.10 – Âncora biorreabsorvível (A) [54], âncora de liga de titânio [41].

A partir dos anos 90 houve um grande desenvolvimento da artroscopia do ombro e na utilização de âncoras para fixação das suturas tendíneas. As âncoras de fixação óssea são os implantes mais utilizados na artroplastia de ombro [39].

O desenvolvimento de âncoras metálicas e absorvíveis permitiu a substituição da técnica de suturas transósseas, especialmente nos casos de instabilidade glenoumerais e lesões do manguito rotator (artroplastias de ombro) [40].

Diferentes materiais podem ser utilizados para reconstrução de defeitos crânio faciais, entre eles materiais metálicos como malhas de titânio, membranas de ácido láctico, lâmina de polidioxanona (PDS). As osteossínteses na região crânio facial podem ser feitas com placas e parafusos de titânio, fios de aço, materiais biorreabsorvíveis como placas e parafusos de copolímero de PLLA/ PGA (LactoSorb®) [41]. Há também materiais cerâmicos como a tetra-tri-cálcio de hidroxiapatita utilizada para reparar defeitos do crânio. Outros materiais incluem

uma combinação de PMMA e PHEMA (polihidroximetilmetacrilato), implante utilizado na reposição de tecido duro, indicado para defeitos de crânio resultantes de trauma, infecções e malformações congênitas [38].

2.6 Implantes biodegradáveis e biorreabsorvíveis

Os traumas, especialmente os traumas faciais estão se tornando cada vez mais freqüentes no nosso dia a dia, à medida que crescem a violência e agitação da vida moderna. Os traumas podem provocar lesões nos tecidos moles, além de lesões nos tecidos duros (ossos e dentes), podendo levar a fraturas. Os traumatismos faciais podem ser causados por vários fatores, entre eles, agressões físicas, acidentes automobilísticos, motociclísticos, ciclísticos, quedas, acidentes esportivos, acidentes de trabalho.

As fraturas faciais acometem os ossos da mandíbula, da maxila, do complexo zigomático-orbitário, do arco zigomático, naso-órbito-etmoidais, do nariz e fraturas dento-alveolares.

Um estudo epidemiológico dos traumas com fraturas faciais operados no Serviço de Cirurgia e Traumatologia Buço-Maxilo-Facial do Hospital XV, da cidade de Curitiba – PR, no período de janeiro de 1986 a dezembro de 2000, num total de 350 pacientes, foi realizado e avaliou o perfil dos pacientes atendidos, a evolução do tratamento e a etiologia das complicações ocorridas neste período, objetivando determinar estratégias preventivas que minimizem os riscos de traumatismos faciais.

Várias etiologias foram encontradas no estudo, conforme ilustrado na Figura 2.11, sendo os acidentes automobilísticos responsáveis pela grande maioria dos casos (31,71%), seguido por quedas (24,57%), agressões físicas (19,43%), acidentes esportivos (11,43%), acidentes ciclísticos (8,28%), acidentes de trabalho (2,86%), além de iatrogenias e pacientes SEM informação sobre a causa, com 0,86% cada um [42].

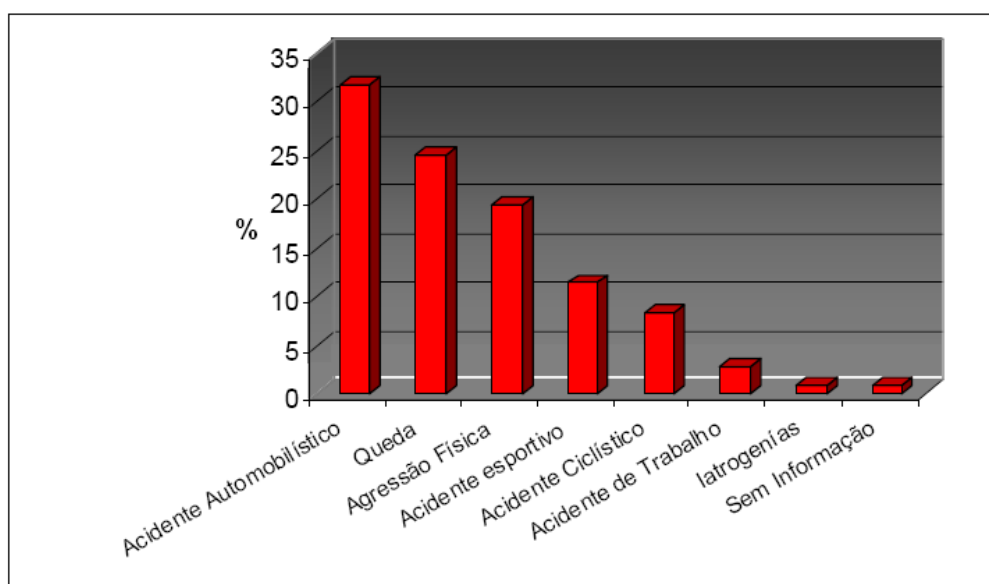


Figura 2.11 – Distribuição das etiologias dos traumas de face [42].

Entretanto, correlacionando as etiologias com os ossos acometidos, a pesquisa demonstrou que as quedas foram às principais causas de fraturas mandibulares, os acidentes automobilísticos foram responsáveis pelas fraturas nas regiões da maxila, complexo zigomático-orbital, naso-orbitário-etmoidal e nasal, e o arco zigomático foi acometido no caso de acidentes esportivos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Relação entre incidência de fraturas e suas causas

Fraturas	Etiologia mais comum	Número	Total	%
Mandibulares	Quedas	61	171	35,67
Maxilares	Acidentes automobilísticos	32	71	45,07
Zigomático-orbitárias	Acidentes automobilísticos	42	113	37,17
Arco zigomático	Acidentes esportivos	13	39	33,33
Naso-orbitário-etmoidais	Acidentes automobilísticos	01	02	50,00
Nasais	Acidentes automobilísticos	12	23	52,17

O tratamento das fraturas faciais é realizado através de fixação interna rígida com uso de miniplacas e parafusos de titânio, placas e parafusos reabsorvíveis, bloqueio maxilomandibular ou reduções cirúrgicas com osteossíntese a fio de aço [42].

Atualmente placas e parafusos de titânio são utilizados de forma segura e efetiva em sistemas de fixação de cirurgias maxilofaciais. Entretanto, estes sistemas apresentam algumas desvantagens uma vez que interferem nas radioterapias e técnicas de imagem. A necessidade de uma segunda cirurgia para remoção do implante implica em desconforto, riscos de infecção e custo sócio-econômico, o que não ocorre com dispositivos biodegradáveis. Outra

vantagem dos dispositivos biodegradáveis é sua radioluminescência o que os torna compatíveis com radioterapia e exames de imagem. Além disso, com dispositivos biodegradáveis a osteoporose por ser evitada devido à transferência gradual de forças ao osso durante o processo de cura (remodelação óssea), enquanto as cadeias de polímeros se desintegram pelo processo de degradação do material [43].

Desde a introdução de dispositivos biodegradáveis em 1966, vários estudos in vitro, animais e clínicos têm sido publicados com resultados positivos bem como resultados negativos. Os dispositivos biodegradáveis ainda não substituem os implantes de titânio devido às suas propriedades mecânicas (resistência e dureza) menos favoráveis. Outro fator limitante ao uso de dispositivos biodegradáveis é a resistência dos cirurgiões em modificar as técnicas de tratamento convencional as quais eles têm mais experiência [43].

Entre os materiais biodegradáveis mais utilizados na confecção de placas, pinos, parafusos e âncoras de sutura estão o poli ácido glicólico (PGA) (Dexon®), o copolímero de PGA/PLA (Vycril®, LactoSorb®), a polidioxanona (PDS) e o poli (ácido láctico) (PLA) [44].

O PCL é um poliéster alifático que tem sido muito utilizado em várias aplicações biomédicas como sistemas de liberação controlada de drogas e suportes para a engenharia de tecidos [45]. Homopolímeros e copolímeros do PCL estão sendo utilizados para preparar sistemas de liberação controlada e prolongada de fármacos e proteínas [46].

2.7 Comentários

As aplicações do PCL de cadeia linear são limitadas quando comparada a outros poliésteres alifáticos, devido à sua lenta cinética de reabsorção e degradação, em função da sua alta cristalinidade e caráter hidrofóbico [47]. Seu caráter hidrofóbico se deve à presença de cinco grupos metileno apolares e um grupo éster relativamente polar em cada unidade repetitiva (Figura 2.12) [48]. A degradação do PCL linear é bem lenta quando comparada a outros poliésteres como PGA e PLA, e por isso, ele é utilizado na fabricação de dispositivos médicos que levam longo prazo para degradar como o contraceptivo implantável denominado comercialmente como Capronor [49].

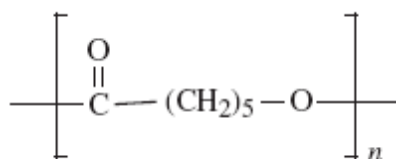


Figura 2.12 – Estrutura química do poli (ε-caprolactona) [49].

Neste trabalho foi realizado um estudo do PCL estrela, um poliéster de cadeia ramificada. Um polímero estrela constitui-se de um núcleo central acoplado com três ou mais ramificações de mesmo peso molecular [50]. O PCL estrela pode ser sintetizado por diferentes rotas de síntese, obtendo-se polímeros com diferentes pesos moleculares devido à variação da razão molar entre o monômero ϵ -caprolactona (ϵ -CL) e o iniciador utilizado [51].

A razão de degradação de um polímero é determinada pelo peso molecular inicial, pela cristalinidade, pela área superficial do polímero exposta, e pela razão entre os monômeros (no caso de copolímeros) [49]. A presença de ramificações na cadeia polimérica diminui a regularidade espacial da molécula e desfavorece a cristalização [52], com isso a degradação hidrolítica é afetada, pois a estrutura cristalina dificulta a permeação de água na molécula. Polímeros amorfos apresentam cinética de degradação mais rápida do que polímeros cristalinos [53].

No presente trabalho, o PCL estrela (PCL*) foi sintetizado através de uma rota de síntese que parece não ter sido ainda descrita pela literatura e sua cinética de degradação enzimática foi estudada em condições fisiológicas. A cinética de degradação enzimática é uma propriedade importante para uma avaliação preliminar do tipo de dispositivo médico que poderá ser projetado/fabricado a partir de um polímero biorreabsorvível.

2.8 Referências Bibliográficas

- 1 - Biomaterials and Tissue Engineering. Centre for bioengineering, University of Canterbury. Christchurch, New Zealand. Disponível em <<http://www.bioengineering.canterbury.ac.nz/biomate/index.shtml>>. Acesso em: 14 jan. 2008.
- 2 - Biomet, Inc. Warsaw, Indiana, EUA. Disponível em <<http://www.biomet.com/ci/investors/financials/2005.pdf>>. Acesso em 14 janeiro 2008.
- 3 – SOO-HONG LEE; SHIN H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 59: 339–359, 2007.
- 4 – NAIR L.S.; LAURENCIN C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, 32(8-9): 762-798, 2007.
- 5 – Disponível em < www.saude.gov.br/sctie/decit >. Acesso em 14 janeiro 2008.
- 6 – Disponível em < www.baumer.com.br >. Acesso em 14 janeiro 2008 e 29 maio 2009.
- 7 – REBELO FERNANDA; SANTOS VÂNIA. Seminário Produtos para a Saúde: Ortopédicos. Gerência Geral de Regulação Econômica e Monitoramento de Mercado,

ANVISA. Brasília – DF. 9 dez 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/produtossaude.htm>>. Acesso em 14 janeiro 2008.

8 - IBGE – Instituto Nacional de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 29 abril 2008.

9 - SOBANIA LUIS CARLOS. Workshop de Produtos para Ortopedia. SBOT (Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia). Brasília – DF. Ago 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/produtossaude/workshop/apresentacoes_pp.htm>. Acesso em 14 janeiro 2008.

10 – WANG M.L; MASSIE J.; PERRY A.; GARFIN S. R.; KIM C. W. A rat osteoporotic spine model for the evaluation of bioresorbable bone cements. **The Spine Journal**, 7: 466–474, 2007.

11 - SIMÕES J. A.; MARQUES A. T.; JERONIMIDIS G. Design of a controlled-stiffness composite proximal femoral prosthesis. **Comp. Science Tech.**, 60 (4): 559-567, 2000.

12 - INTO – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia. Disponível em: <<http://www.into.saude.gov.br/documentos/noticias.pdf>>. Acesso em 29 abril 2008.

13 – Disponível em <http://www.wgate.com.br/fisioweb/art_traumato.asp>. Acesso em 24 maio 2009.

14 – GOLÇALVES D. Artroplastia do quadril com a prótese total de Charnley. Bases biomecânicas. Técnica casuística pessoal. **Rev. Bras. Ortop.**, 38 (7): 363–371, 2003.

15 - VILLARDI A.; VEIGA L. A.; MANDARINO M.; SCHOTT M. Artroplastia total do joelho não cimentada, SEM substituição da patela: avaliação clínico-funcional. **Rev. Bras. Ortop.**, 40 (9): 507–524, 2005.

16 - GUNSTON F.H. Polycentric knee arthroplasty. **J. Bone Joint Surg.**, 53: 272–277, 1971.

17 - HUNGERFORD D.S.; KENNA R.V.; KRACKOW K.A. The porous coated anatomic total knee. **Orthop. Clin. North Am.**, 13: 103 – 22, 1982.

18 - GUELCHER S. A.; SRINIVASAN A.; DUMAS J. E; DIDIER J. E.; MCBRIDE S.; HOLLIGER J.O. Synthesis mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine polyisocyanates. **Biomaterials.**, 29 (12): 1762–1775, 2008.

19 - SANTOS VÂNIA. Uso Racional de Tecnologias em Saúde: perspectivas para o Brasil, ANVISA. Brasília – DF. Ago 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/produtossaude.htm>> Acesso em 14 janeiro 2008.

20 - LECH O.; HUBER T.; SEVERO A.; PITÁGORAS T. Fratura da diáfise do úmero associada com artroplastia do ombro. **Rev. Bras. Ortop.**, 32 (9): 691- 694, 1997.

21 - ALMEIDA M. B. VAZ de; FILHO R.; L. EPITÁCIO. Fratura cominutiva exposta da glenóide: relato de caso. **Rev. Bras. Ortop.**, 32 (12): 982 - 984, 1997.

- 22 – PALVANEN M.; KANNUS P.; NIEMI S.; PARKKARI J. Update in the epidemiology of proximal humeral fractures. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, (442): 87 – 92, 2006.
- 23 - CHECCIA S. L.; S. DONEUX P.; MIYAZAKI A. N.; FREGONEZE M.; SILVA A. A.; LOBO A. C.; JUNIOR M. M.; MOLIN F. F. D. Avaliação do tratamento cirúrgico da fratura em duas partes do colo cirúrgico do úmero com placa *PFS 80®*. **Rev. Bras. Ortop.**, 39 (10), 2004.
- 24 – Disponível em <<http://www.medsobral.ufc.br/paph/producao/artigos/artigo4.htm>>. Acesso em 25 maio 2009.
- 25 – Disponível em <http://sigcti.mct.gov.br/fundos/rel/ctl/ctl.php?act=nav.prj_vis&idp=11743>. Acesso em 10 junho 2009.
- 26 – CHRISTENSEN F. B.; DALSTRA M.; SEJLING F.; OVERGAARD S.; BUNGER C. Titanium-alloy enhances bone-pedicle screw fixation: mechanical and histomorphometrical results of titanium-alloy versus stainless steel. **Eur. Spine J.**, 9: 97–103, 2000.
- 27 – IM G.; SHIN S. R. Treatment of femoral shaft fractures with a titanium intramedullary nail. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, 401: 223–229, 2002.
- 28 - CHARNLEY J. Anchorage of the femoral head prosthesis of the shaft of the femur. **J Bone Joint Surg Br.**, 42-B (1): 28 – 30, 1960.
- 29 - BOESEL L. F.; R. L. REIS. A review on the polymer properties of Hydrophilic, partially Degradable and Bioactive acrylic Cements (HDBC). **Prog. Polym. Sci.**, 33 (2): 180-190, 2008.
- 30 - RUSEN E. Z.; ZAHARIA C.; ZECHERU T.; MARCULESCU B.; FILMON R.; CHAPPARD D.; BADULESCU R.; CINCUIA C. Synthesis and characterization of core–shell structures for orthopaedic surgery. **J. Biomech.**, 40 (15): 3349-3353, 2007.
- 31 – GIORDANO V.; RIOS H.; MOREIRÃO M.; GIORDANO M.; AMARAL N. P.; PALLOTTINO A.; OLIVEIRA S. Ensaio mecânico da resistência ao impacto do cimento ósseo puro e associado a duas drogas anestésicas. **Rev. Bras. Ortop.**, 42 (7): 225 - 230, 2007.
- 32 - DONKERWOLCKE M.; BURNBY F.; MUSTER D. Tissues and bone adhesives-historical aspects. **Biomaterials**, 19 (16): 1461 - 1466, 1998.
- 33 - CORCHON G. M. A.; SALVADO M.T.; COLLIA B. J. F. P.; BLANCA J. A. V.; SAN J.R. Injectable and self-curing composites of acrylic bioactive glass and drug systems. A Histomorphometric analysis of the behaviour in rabbits. **Biomaterials**, 27 (9): 1778 - 1787, 2006.
- 34 - BONZANI I. C.; ADHIKARI R. H.; SHADI MAYADUNNE R.; GUNATILLAKE P.; STEVENS M. M. Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. **Biomaterials**, 28(3): 423-433, 2007.

- 35 – Disponível em <www.cirurgiasdacoluna.com.br/tecnicascirurgicas>. Acesso em 10 junho 2009.
- 36 - RUIZ D. S. M.; BURKHARDT K.; JEAN B.; MUSTER M.; MARTIN J. B.; BOUVIER J. FASEL J. H. D.; RUFENACHT D.A.; KURT A. M. Pathology finding with acrylic implants. **Bone Suppl.**, 25 (2), suplement (1): 85S - 90S, 1999.
- 37 - MIAO X.; HU Y.; LIU J.; WONG A. P. Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements. **Mat. Letters**, 58 (3-4): 397-402, 2004.
- 38 – Disponível em <<http://www.intermedic.com.br>>. Acesso em 20 junho 2009.
- 39 – RAMADAN L. B.; REBOLLEDO D. C. S.; DOS SANTOS A. L G.; DINATO M. C. M.; SCHOR B.; FILHO A. Z.; PEREIRA C. A. M. Comparação da resistência à tração da âncora metálica rosqueada inserida no osso. **Acta Ortop. Bras.**, 14 (2): 83-86, 2006.
- 40 - EJNIAMAN B.; ANDREOLI C. V.; POCHINI A. C.; MONTEIRO G. C.; FALOPPA F.; COHEN M. Artropatia glenoumeral pós-tratamento de lesões labiais com implantes metálicos. **Rev. Bras. Ortop.**, 41 (5): 167-172, 2006.
- 41 – MARZOLA C.; JÚNIOR J. L. DE L.; DE GÓES K. K. H; RIBEIRO E. D.; JÚNIOR E. S. H.; DUTRA M. I.; COSTA V. S. Utilização de sistema reabsorvível no tratamento da fratura fronto – naso – órbito –etmoidal: relato de caso. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.**, 6 (3): 17–26, 2006.
- 42 – REBELLATO N. L. B. **Análise epidemiológica das fraturas faciais em um serviço da cidade de Curitiba – PR, de janeiro de 1986 a dezembro de 2000.** 2003. 208 f. Tese (Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buço-Maxilo-Facial) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- 43 – BUIJIS G. J.; STEGENGA B.; BOS R. R. M. Efficacy and safety of biodegradable osteofixation devices in oral and maxillofacial surgery: a systematic review. **J. Dent. Res.**, 85 (11): 980 - 989. 2006
- 44 – FILHO J. R. L.; CAMARGO I. B.; FERREIRA D. M. R.; BARROS T.Q. Fixação Interna Rígida Biorreabsorvível. **Rev. Cir. Traum. Buco-Maxilo-Fac.**, 2 (2): 31- 40, 2002.
- 45 - KUO-YUNG CHANG; YU-DER LEE. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone initiated by the antitumor agent doxifluridine. **Acta Biomaterialia.**, 5: 1075–1081, 2009.
- 46 - CHENG L.; GUO S.; WU W. Characterization and in vitro release of praziquantel from poly(ϵ -caprolactone) implants. **Int.. J. Pharm.**, p. 1- 8, 2009.
- 47 - KWEON H. Y.; YOO M. K.; PARK I. K.; KIM T. H.; LEE H. C.; LEE H-S; OH J-S.; AKAIKE T.; CHO C-S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**, 24(5): 801- 808, 2003.

- 48 - DE QUEIROZ A. A. A.; FRANÇA E. J.; ABRAHAM G. A.; ROMAN J. S. Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone by Iodine Charge-Transfer Complex. **J. Polym. Sci.**, 40: 714 - 722, 2002.
- 49 - PACHENCE J. M.; BOHRER M. P.; KOHN J. **Biodegradable Polymers. Principles of Tissue Engineering.**, 3 ed., 2007. Cap. 23, p. 323 - 339.
- 50 - NÚÑEZ, E.; FERRANDO C.; MALMSTROM E.; CLAEISSON H.; WERNER P.-E.; GEDDE U.W. Crystal structure, melting behaviour and equilibrium melting point of star polyesters with crystallisable poly ϵ -caprolactone) arms. **Polymer**, 45 (15): 5251-5263, 2004.
- 51 - YANJUN CUI; XIAOMEI MA; XIAOZHEN TANG; YINPEI LUO. Synthesis, characterization, and thermal stability of star-shaped poly(ϵ -caprolactone) with phosphazene core. **Eur. Polym. J.**, 40(2): 299-305, 2004.
- 52 - CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros**. 1 ed. São Paulo: Artliber, 2002. 183 pp.
- 53 - REZWAN K.; CHEN Q. Z.; BLAKER J. J.; BOCCACCINI A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials.**, 27 (18): 3413 – 3431, 2006.
- 54 – Inion OY. www.inion.com, catálogo de produtos.
- 55 – Disponível em < <http://www.medicaltrade.com.br/ortopedia>>. Acesso em 27 agosto 2009.
- 56 – OTP Biomédica Ltda, catálogo de produtos.

3. Revisão da Literatura

3.0 Fisiologia do tecido ósseo

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto e serve de suporte para as partes moles e protegendo os órgãos vitais, como os contidos nas caixas craniana, torácica e no canal raquidiano. Atua alojando e protegendo a medula óssea, formadora das células do sangue. Proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular.

Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais [1].

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo de sustentação, formado por células e por material extracelular calcificado, denominado matriz óssea. O osso é composto de três tipos de células (osteoblastos, osteoclastos, osteócitos), uma matriz extracelular mineralizada (composta de 65% de hidroxiapatita e fosfato tricálcio) e uma matriz extracelular orgânica (composta de 35% de colágeno e outras proteínas como glicoproteínas, proteoglicanas, osteocalcina, osteopontina e fatores de crescimento). Estas proteínas contribuem para a abundância de sinais no interior da matriz extracelular. As fibras de colágeno flexíveis e resistentes reforçadas com cristais de hidroxiapatita são importantes para o requisito de força compressiva e alta resistência do osso a fratura [2]. Mesmo representando apenas 1% da matriz extracelular orgânica, os fatores de crescimento têm se tornado de grande interesse para entender os processos fisiopatológicos de regeneração óssea e osteointegração [3].

Os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea, sendo, portanto, as células responsáveis pela formação do osso. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Uma vez aprisionado pela matriz recém sintetizada, o osteoblasto passa a ser chamado de osteócito. A matriz se deposita ao redor do corpo da célula e de seus prolongamentos, formando assim as lacunas e os canalículos. Os osteoblastos em fase de síntese mostram as características ultra-estruturais das células produtoras de proteínas. A matriz óssea recém formada, adjacente aos osteoblastos ativos e que não está ainda calcificada, recebe o nome de osteóide (Figura 3.1) [1].

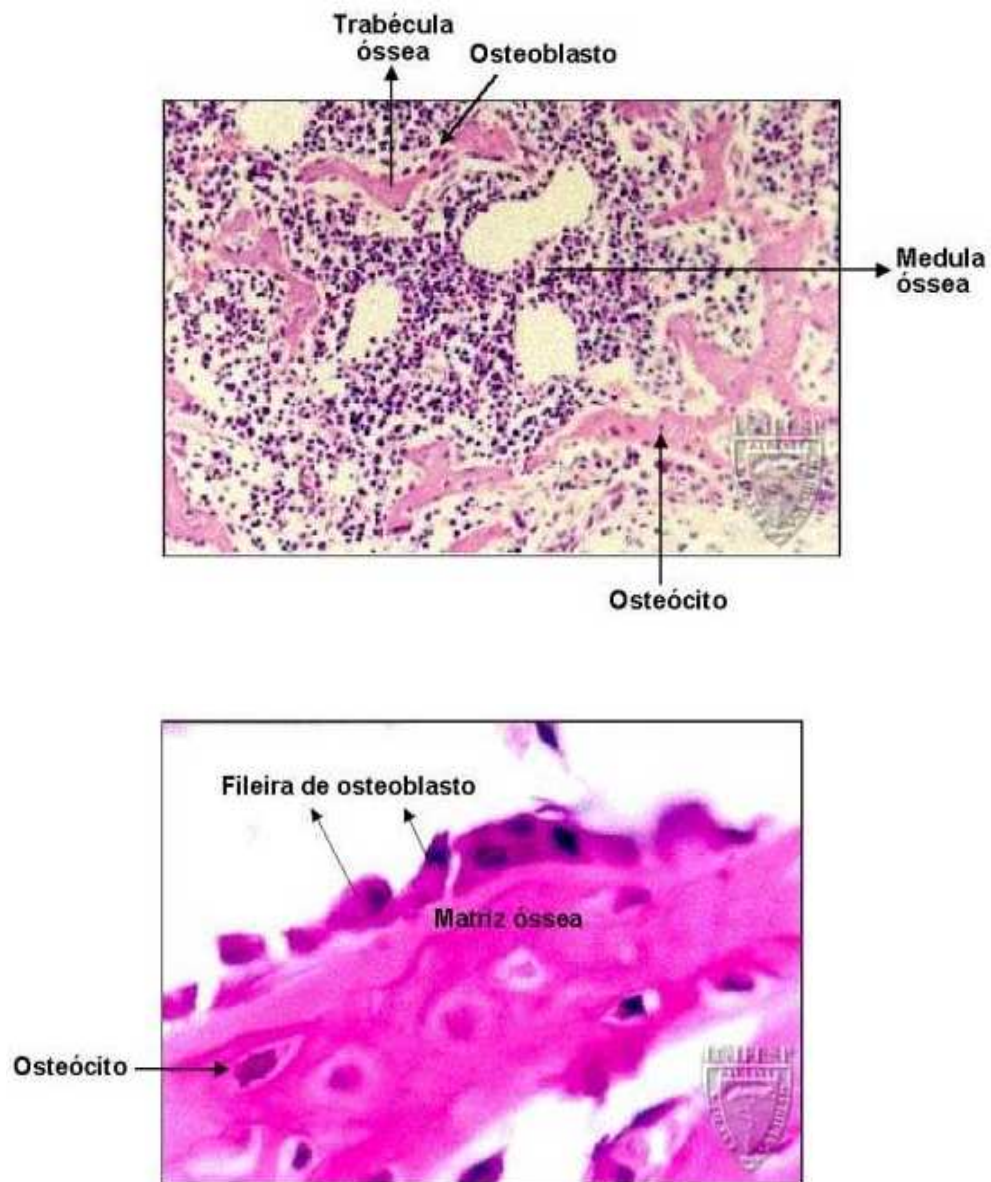


Figura 3.1 – corte de osso frontal de rato recém-nascido em processo de ossificação intramembranosa. Observa-se a matriz óssea acidófila da trabécula e os osteócitos no seu interior necessariamente circundados pela matriz óssea. A massa de células nos espaços vazios corresponde às células da medula óssea. Em maior aumento, junto à trabécula e não no seu interior, observe os osteoblastos, células basófilas, alongadas ou cúbicas [46].

Os osteócitos são as células encontradas no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem os canalículos (Figura 3.2).

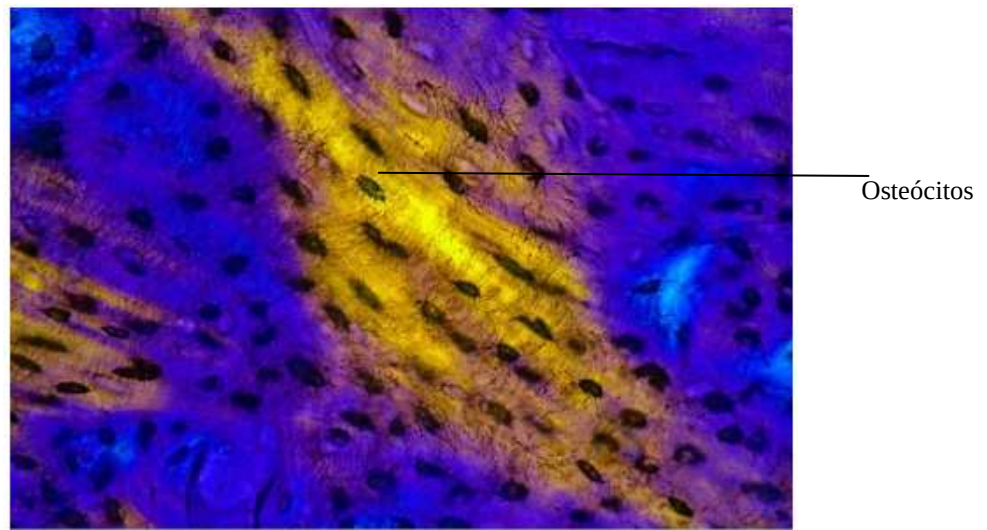


Figura 3.2 – Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura do tecido ósseo humano mostrando suas lacunas que contém osteócitos [47].

As células responsáveis pelo remodelamento ósseo são os osteoclastos. São células móveis, gigantes, ramificadas, que se originam de precursores mononucleados provenientes da medula óssea que, ao contato com o tecido ósseo, unem-se para formar os osteoclastos multinucleados.

A superfície ativa dos osteoclastos, voltada para a matriz óssea, apresenta prolongamentos vilosos irregulares, circundados por uma zona citoplasmática, a zona clara, pobre em organelas, porém contendo muitos filamentos de actina. A zona clara é um local de adesão do osteoclasto com a matriz óssea e cria um microambiente fechado, onde tem lugar a reabsorção óssea que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio. A atividade dos osteoclastos é coordenada por citocinas e por hormônios como calcitonina, um hormônio produzido pela glândula tireóide, e paratormônio, secretado pelas glândulas paratireóides [1].

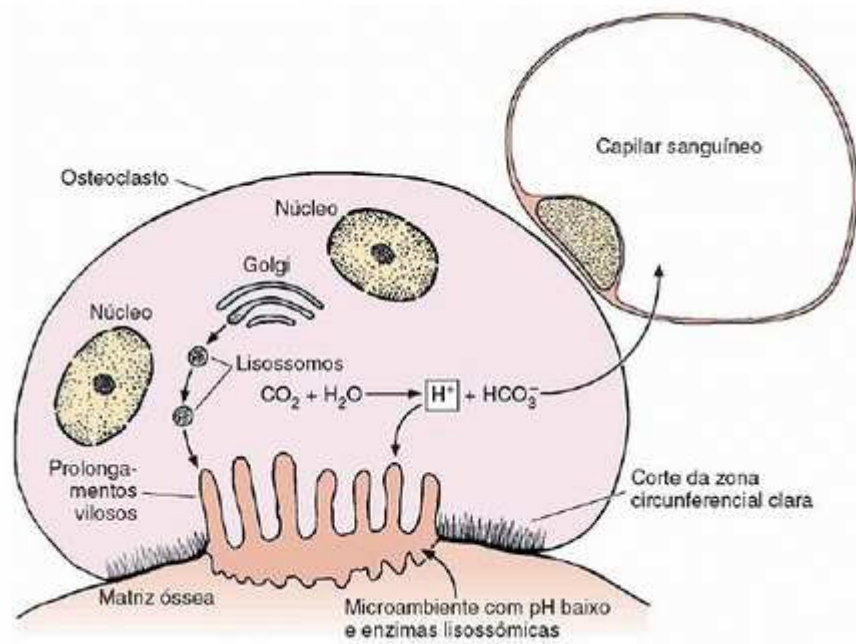


Figura 3.3 – Esquema de reabsorção óssea, onde enzimas produzidas no osteoclasto digerem a matriz e enviam os minerais para o capilar sanguíneo [1].

Todos os ossos são revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o periósteo e o endósteo, respectivamente (Figura 3.4). As principais funções do endósteo e do periósteo são a nutrição e oxigenação das células do tecido ósseo e o fornecimento de novos osteoblastos, para o crescimento e a recuperação do osso [1].

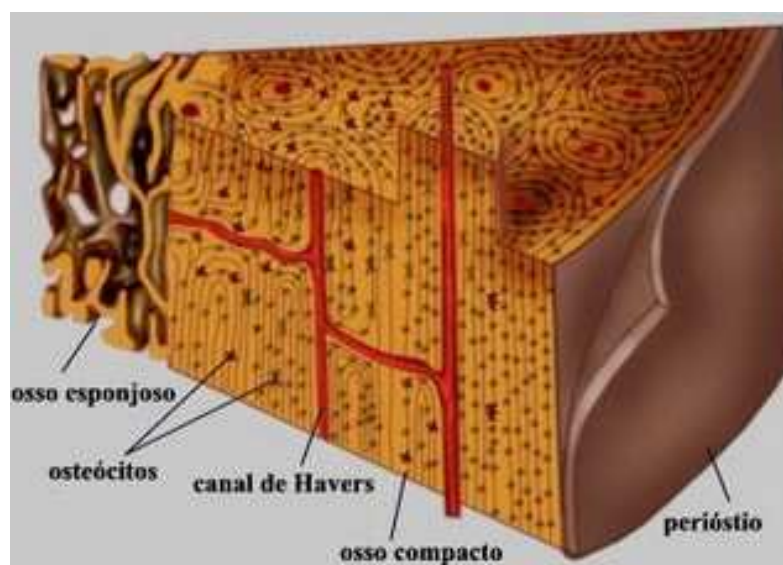


Figura 3.4 – unidade estrutural do tecido ósseo [48].

Macroscopicamente o osso é formado por partes sem cavidade visíveis, o osso compacto (Figura 3.5), e por partes com muitas cavidades intercomunicantes, o osso esponjoso (Figura 3.6). Nos ossos longos (ex: fêmur, úmero) (Figura 3.7) as extremidades ou epífises são formadas por osso esponjoso com uma delgada camada superficial compacta. A diáfise (parte cilíndrica) é quase totalmente compacta, com pequena quantidade de osso esponjoso na parte profunda, delimitando o canal medular. Nos ossos longos, o osso compacto é chamado também de osso cortical [1].

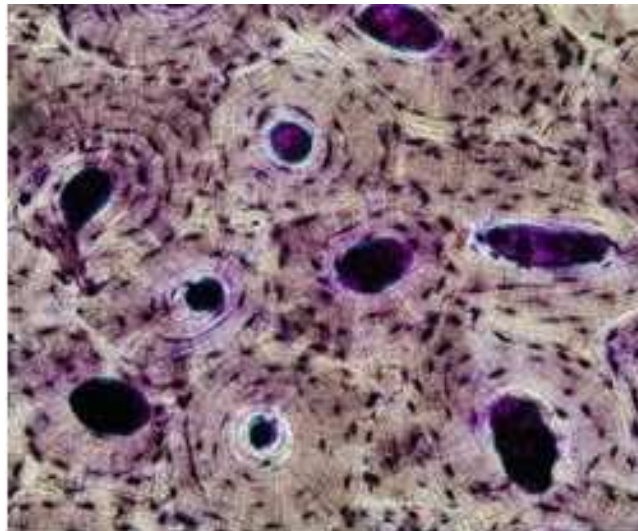


Figura 3.5 – tecido ósseo compacto [49].



Figura 3.6 – tecido ósseo esponjoso [49].

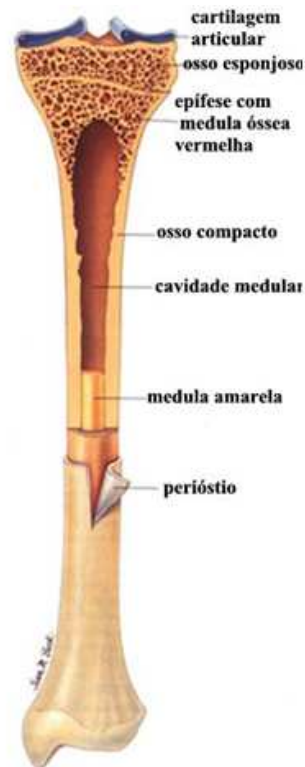


Figura 3.7 – estrutura de um osso longo [48].

Nos ossos chatos, que constituem a abóbada craniana, existem duas camadas de osso compacto, as tábuas interna e externa, separadas por osso esponjoso que, nesta localização, recebe o nome de *díploe* (Figura 3.8).

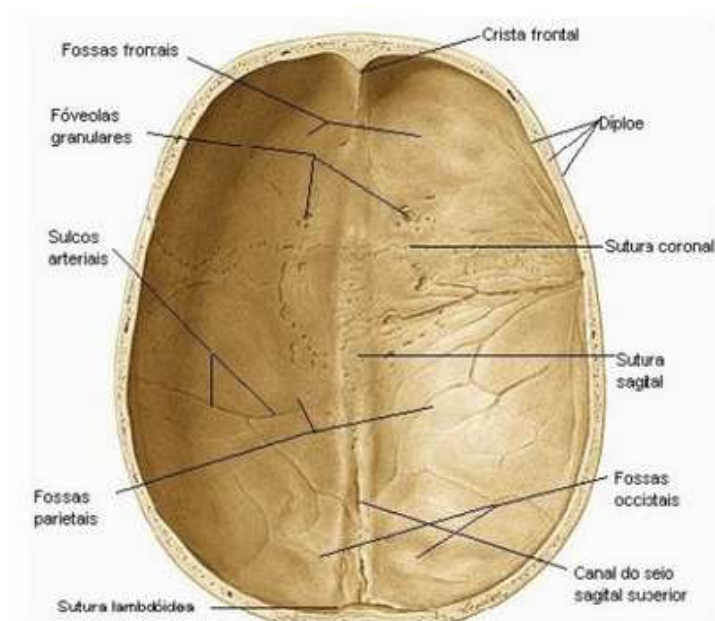


Figura 3.8 – ossos chatos da abóbada craniana [50].

As cavidades do osso esponjoso e o canal medular da diáfise dos ossos longos são ocupados pela medula óssea (Figura 3.9). No recém-nascido, toda a medula óssea é vermelha, devido ao alto teor de hemácias, e é ativa a produção de células do sangue (medula óssea hematógena). Já no adulto, a medula vermelha fica restrita aos ossos chatos do corpo (esterno, costelas, ossos do crânio), às vértebras e às epífises do fêmur e do úmero (ossos longos). Com o passar dos anos, a medula óssea vai sendo infiltrada por todo tecido adiposo, com diminuição da atividade hematógena (medula óssea amarela) [1].

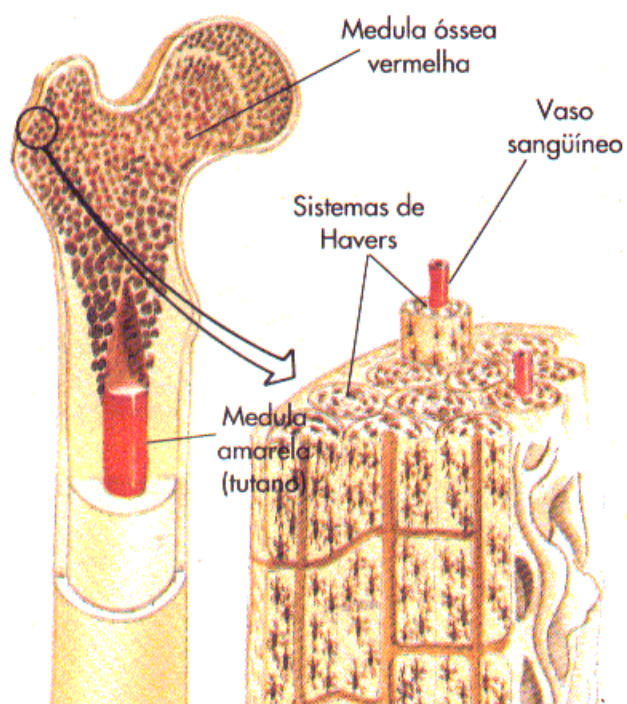


Figura 3.9 – Cavidade medular dos ossos [49].

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: imaturo (ou primário ou trabecular) e maduro (ou secundário ou lamelar). Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz óssea, porém, apresentam diferentes organizações tridimensionais em suas fibras colágenas [1].

O tecido primário é o que aparece primeiro, tanto no desenvolvimento embrionário como na reparação das fraturas, sendo temporário e substituído por tecido secundário. É osso esponjoso visto a olho nu. No adulto é muito pouco freqüente, persistindo apenas próximo às suturas dos ossos do crânio, nos alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção de tendões.

O tecido ósseo primário apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções sem organização definida, tem menor quantidade de minerais (mais facilmente penetrado pelos raios X) e maior proporção de osteócitos do que o tecido ósseo secundário (Figura 3.10) [1].

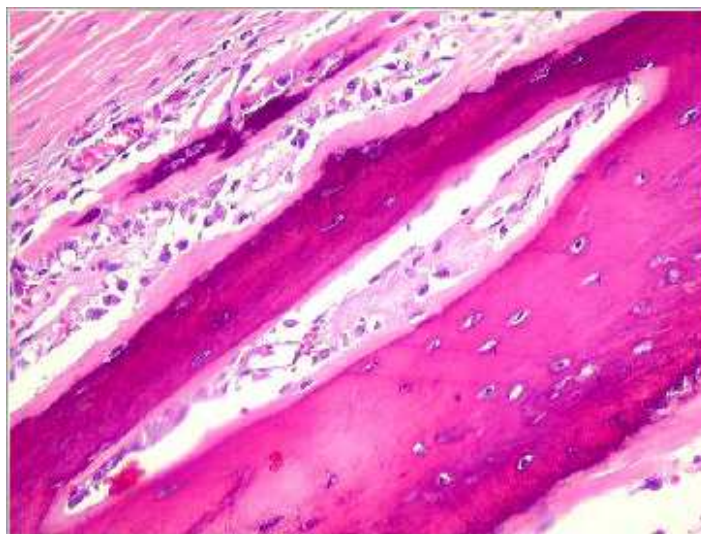


Figura 3.10 – Ossificação membranosa de calota craniana. No osso formado, a matriz óssea produzida pelos osteoblastos está mineralizada. No interior dela, observam-se os pequenos espaços que abrigam os osteócitos, células derivadas dos osteoblastos. O tecido ósseo dispõe-se em trabéculas, como uma esponja, deixando espaços que serão colonizados por células hematopoiéticas para formar medula óssea. Continuará havendo deposição óssea a partir da periferia pelos osteoblastos lá situados [51].

O tecido ósseo secundário (lamelar) substitui gradativamente o tecido ósseo primário. É a estrutura característica do tecido ósseo adulto. Sua principal característica é apresentar fibras colágenas organizadas em lamelas, dispostas paralelamente umas às outras, em camadas concêntricas em torno de um canal central, denominado canal de Havers, por onde ocorrem vasos sanguíneos e nervos. Cada conjunto desses constitui um sistema de Havers ou ósteons (Figura 3.11). As lacunas onde se alojam os osteócitos também estão distribuídas regularmente. Este sistema é típico do tecido ósseo secundário. Os canais medulares de Havers percorrem o osso longitudinalmente e comunicam-se entre si com a cavidade medular, e com a parte externa do osso por canais transversais ou oblíquos, os canais de Volkmann (Figura 3.12). Estes se distinguem dos canais de Havers por não apresentarem lâminas ósseas concêntricas. É osso compacto visto a olho nu.

O tecido ósseo secundário que contém sistemas de Havers é característico da diáfise dos ossos longos, embora sistemas de Havers pequenos sejam encontrados no osso compacto de outros locais [1].

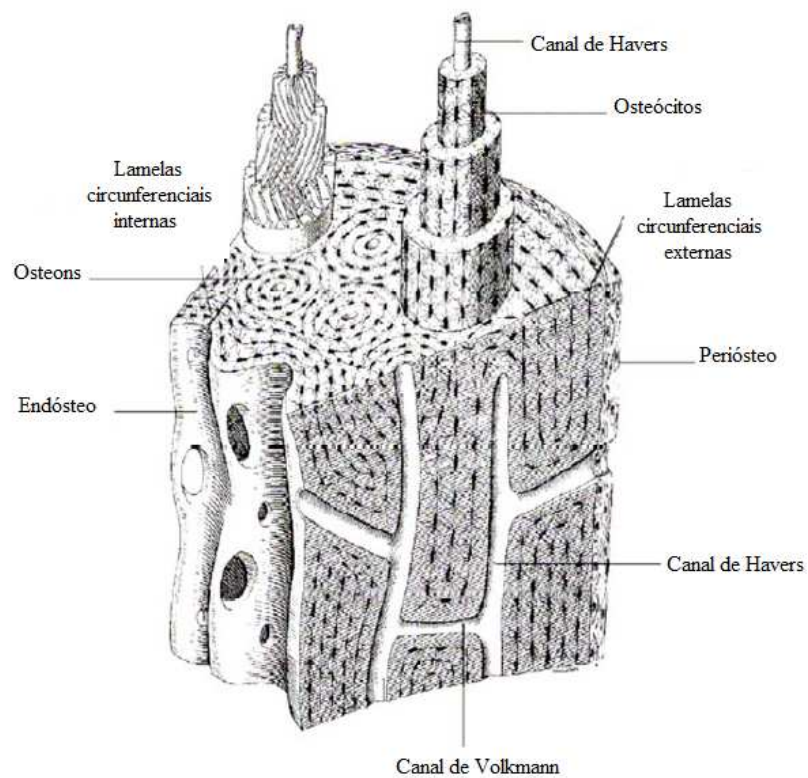


Figura 3.11 – Esquema da parede de diáfise dos ossos longos. Aparecem três tipos de tecido ósseo lamelar: os sistemas de Havers e as lamelas circunferenciais externas e as internas. O sistema de Havers desenhado em três dimensões no alto e à esquerda, mostra a orientação das fibras colágenas nas lamelas. O sistema de Havers saliente, à esquerda, mostra a direção das fibras colágenas em cada lamela. À direita observe um sistema de Havers isolado, mostrando um capilar sanguíneo central (há também nervos, que não foram mostrados no desenho) e muitos osteócitos com seus prolongamentos. [1].

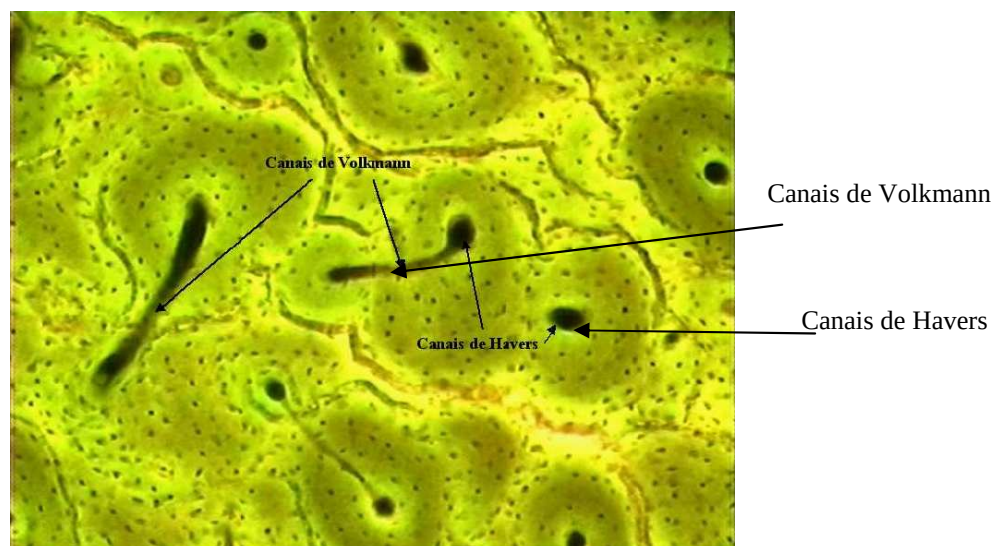


Figura 3.12 – Canais de Havers e canais de Volkmann [52].

O tecido ósseo é formado ou por um processo chamado de ossificação intramembranosa, que ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, ou pelo processo de ossificação endocondral. Este último se inicia sobre um molde de cartilagem hialina, que gradualmente é destruído e substituído por tecido ósseo formado a partir de células do conjuntivo adjacente. Tanto na ossificação intramembranosa como na endocondral, o primeiro tecido ósseo formado é do tipo primário. Este é pouco a pouco substituído por tecido secundário lamelar. Portanto, durante o crescimento dos ossos podem-se ver, lado a lado, áreas de tecido secundário. Uma combinação de formação e remoção de tecido ósseo persiste durante o crescimento do osso, acontecendo também no adulto, embora em ritmo muito mais lento [1].

3.1 Crescimento e remodelação óssea

O crescimento dos ossos consiste na formação de tecido ósseo novo, associada à reabsorção parcial de tecido já formado; assim, os ossos conseguem manter sua forma enquanto crescem.

Os ossos chatos crescem por formação do tecido ósseo pelo perióstio situado entre as suturas e na face externa do osso, enquanto ocorre reabsorção na face interna. Sendo extremamente plástico, o tecido ósseo responde, por exemplo, ao crescimento do encéfalo, formando uma caixa craniana do tamanho adequado. [1].

Nos adultos também existe remodelação dos ossos, um processo fisiológico que ocorre simultaneamente em diversas partes do esqueleto. Neste caso a remodelação não está relacionada com o crescimento e é muito mais lenta. Estima-se que a remodelação nas crianças pequenas seja 200 vezes mais rápida do que nos adultos.

Nos ossos longos, as epífises aumentam de tamanho devido ao crescimento radial da cartilagem, acompanhado por ossificação endocondral. A diáfise cresce em extensão pela atividade dos discos epifisários e, em espessura, pela formação de tecido ósseo na superfície externa de diáfise, com reabsorção na superfície interna. Esta reabsorção interna aumenta o diâmetro do canal medular [1].

Apesar da sua resistência às pressões e da sua dureza, o tecido ósseo é muito plástico e possui alta capacidade de se remodelar mediante diversas situações a que é submetido, tais como lesões, fraturas e perdas ósseas. O processo de regeneração óssea se inicia a partir de importantes reações biológicas, desencadeadas pela própria lesão do tecido.

O remodelamento ósseo depende da atividade integrada de dois tipos de células: os osteoblastos, para produção de tecido ósseo novo, e os osteoclastos, para reabsorção óssea,

ambos os eventos cruciais ao processo no decorrer do crescimento ósseo normal, ou após lesão [1].

3.2 Mecanismos de reparo do tecido ósseo

O acometimento de uma lesão no tecido ósseo, traumática ou cirúrgica, é seguido por seqüência histológica definida, destinada a reparar a lesão. Nos locais de fratura óssea, ocorre hemorragia, pela lesão dos vasos sanguíneos, destruição de matriz e morte de células ósseas [1, 4]. A reparação se inicia após a remoção, pelos macrófagos, do coágulo sanguíneo e dos restos celulares e da matriz. O periósteo e o endósteo próximos à área fraturada respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras que constitui um colar em torno da fratura e penetra entre as extremidades ósseas rompidas (Figuras 3.13 A e B). Nesse anel ou colar conjuntivo e também no conjuntivo que se localiza entre as extremidades ósseas fraturadas, surge tecido ósseo imaturo, tanto pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem que aí se formam, bem como por ossificação intramembranosa. Desta forma, no local de reparação podem ser encontradas ao mesmo tempo áreas de cartilagem, áreas de ossificação intramembranosa e áreas de ossificação endocondral [1]. Esse processo evolui de modo a aparecer, após certo tempo, um calo ósseo que envolve as extremidades do osso fraturado (Figura 3.13 C e D).

As trações e pressões exercidas sobre o osso durante a reparação da fratura, e após o retorno do paciente à suas atividades normais, causam a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por tecido ósseo lamelar. Se essas trações e pressões forem idênticas às exercidas sobre o osso antes da fratura, a estrutura do osso volta a ser a mesma que existia anteriormente. Ao contrário dos outros tecidos conjuntivos, o tecido ósseo, apesar de ser duro, repara-se sem a formação de cicatriz [1].

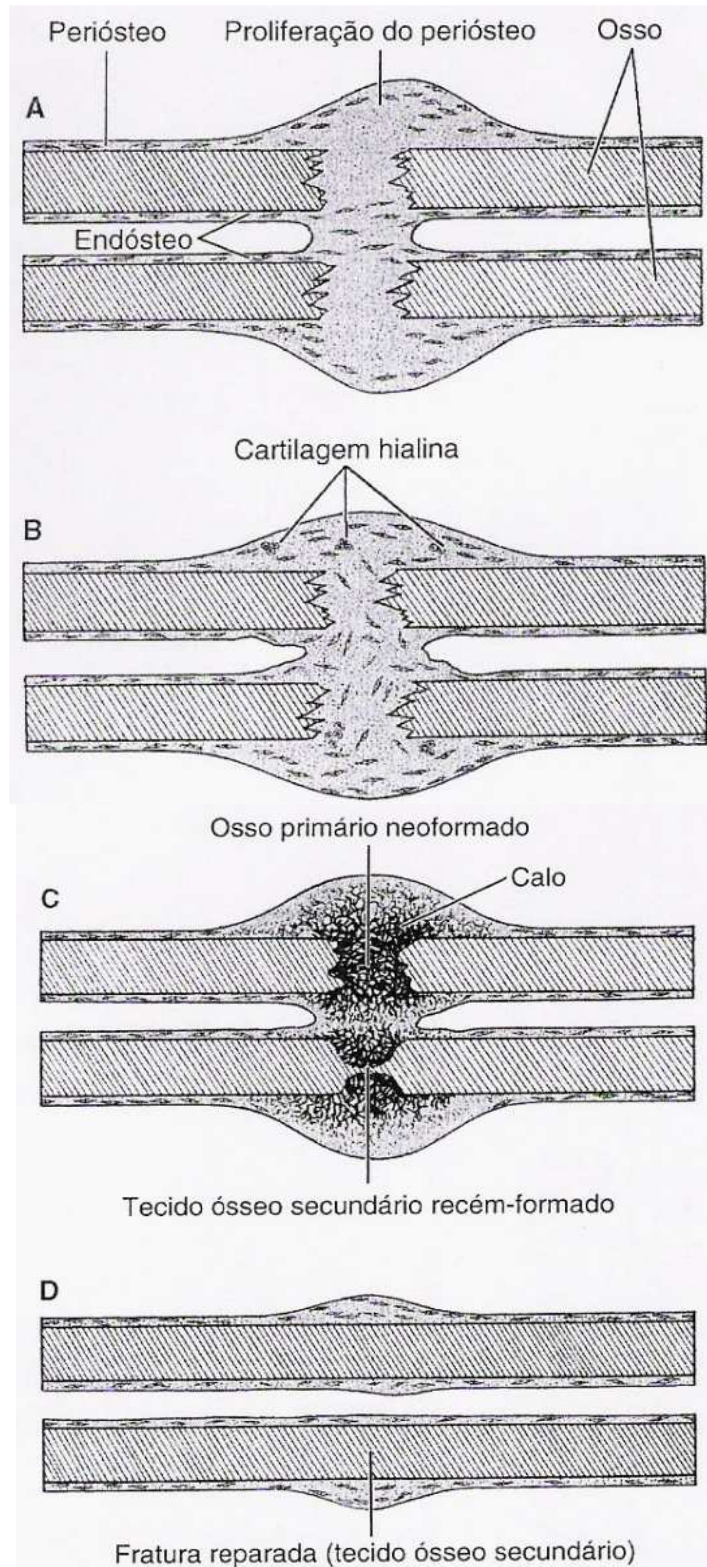


Figura 3.13 A, B, C, D – Desenho esquemático mostrando o processo de reparação da fratura, por formação de novo tecido ósseo a partir do endósteo e do periosteio [1].

3.3 A influência dos fatores de crescimento na reparação óssea

O processo de reparação óssea é uma cascata complexa de eventos biológicos regulados por células específicas, a matriz extracelular e diferentes fatores de crescimento [5].

Os fatores de crescimento e citocinas são importantes reguladores do processo de cura e são produzidos por células presentes no local de regeneração como também são liberados nesta área por tecidos vizinhos (extremidades ósseas danificadas, músculos, medula, periósteo) [4].

Os fatores de crescimento combinados às suas proteínas ligantes formam depósitos na matriz óssea, de onde são liberados e agem como reguladores locais das funções celulares, estimulando a diferenciação, proliferação, migração, adesão celular e expressão gênica. Eles se ligam ao domínio extracelular de um receptor de fator de crescimento, ativando o sinal de transdução intracelular no núcleo da célula resultando na transcrição do RNAm e síntese das respectivas proteínas. Em casos de lesão óssea, fraturas, tratamentos de tumores ósseos, defeitos congênitos e outras patologias, o osso danificado não se regenera espontaneamente. É necessário um auto-enxerto ou osso alogênico para restaurar a integridade estrutural e funcional, no entanto, efeitos adversos estão associados a estas técnicas. A liberação de fatores de crescimento nos locais lesionados pode complementar a terapia convencional de reparação óssea [5].

Os fatores de crescimento são secretados por uma grande variedade de células para regular o processo de cura de ferimentos. Vários fatores de crescimento como fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento fibroblasto básico (bFGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) tem sido usados para melhorar os resultados clínicos em cirurgias cardíacas, ortopédicas, plásticas, oral e periodontal [6].

As BMPs têm sido muito estudadas para aplicações na regeneração de tecidos [5]. Na década de 60, Urist demonstrou a formação de um novo osso a partir de matriz óssea descalcificada e propôs a existência de moléculas osteoindutivas que se diferenciam diretamente de células precursoras presentes no osso formando osteoblastos [7].

Análises biológicas e técnicas de clonagem identificaram várias proteínas pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) que exercem muitas funções biológicas no osso fraturado, possivelmente estimulando o recrutamento e proliferação de células mesenquimais, sua diferenciação em osteoblastos e/ou condrócitos, e produção de matriz extracelular (ECM).

A BMP é um dos fatores de indução mais utilizados em aplicações na engenharia de tecidos ósseos [7]. As BMPs são glicoproteínas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea [5, 8]. Primeiramente, as BMPs são fatores de diferenciação celular que induzem a diferenciação de células mesenquimais presentes nas células ósseas e cartilagens. A resposta celular pode ocorrer através de tecidos adjacentes (por exemplo, muscular e vascular), da medula óssea, do periósteo e estroma associado. As BMPs mais utilizadas são a BMP-2 e BMP-7 [5].

Outros fatores de crescimento que agem localmente têm sido investigados para aplicação na área de regeneração óssea, incluindo o IGF, o FGF e o PDGF [5]. Estes fatores têm como atividade expandir a população celular, como células mesenquimais e osteoprogenitoras, com o aumento subsequente da formação óssea. Além do mais, eles podem estimular a expressão do fenótipo de osteoblasto diferenciado, incluindo moléculas da matriz óssea extracelular [5, 9].

O IGF estimula a proliferação de osteoblastos e a produção de matriz óssea [4, 9], regula a produção de colágeno tipo I e estimula os osteoclastos [10]. O IGF atua como molécula indutiva endócrina, parácrina e autócrina, mediando efeitos de hormônios, fatores de crescimento, citocinas e morfogênese durante a cura da fratura. O padrão de expressão de IGF durante a cura óssea difere daquele das BMPs, sugerindo que ele regula a formação óssea através de um mecanismo molecular diferente [7].

O FGF-2 tem sido muito estudado como estimulante da cura óssea [7]. O FGF induz a migração, proliferação e diferenciação de células estromais da medula óssea; induz à migração e proliferação de células endoteliais, vasculogênese e angiogênese; aumenta a proliferação celular de precursores de osteoclastos; inibe a formação de matriz e mineralização em altas doses [10].

O PDGF (-AA, -AB, -BB) regula a síntese de DNA e a proliferação celular; regula a reparação inicial da fratura e cura de ferimento; inibe a aposição de matriz (colágeno tipo I); estimula os osteoblastos a produzir interleucina seis (IL-6), que recruta osteoclastos; PDGF-BB e PDGF-AB aumenta a reabsorção óssea e a degradação de colágeno [10].

Os VEGFs também são potencialmente importantes na reparação óssea. Os VEGFs estimulam a angiogênese, que é um fator essencial para a formação óssea [5, 11], sendo importantes na formação e manutenção dos vasos sanguíneos [10]. A produção dos VEGFs é o principal mecanismo de ligação entre angiogênese e a osteogênese durante a cura de uma fratura [4]. Os VEGFs regulam a migração, proliferação, sobrevivência e atividade de células endoteliais [4, 9], osteoclastos e osteoblastos [4]. São secretados pelos osteoblastos e células

endoteliais, inibem a apoptose de células endoteliais, estimulam as células endoteliais a produzir fatores de crescimento osteoanabólico que induz a proliferação e diferenciação de osteoblastos, são importantes na angiogênese normal e patológica [10]. Além disso, os VEGFs desempenham um papel importante na maturação e reabsorção de cartilagem [4]. Produzidos pelos condrócitos hipertróficos, eles iniciam a cascata de ossificação endocondral pelo recrutamento e/ ou diferenciação dos osteoclastos que reabsorveram cartilagem e pela atração de osteoblastos [4].

Estudos clínicos controlados usando BMPs associadas a sistemas de liberação têm demonstrado a capacidade dessas proteínas/sistemas de liberação de induzir o crescimento ósseo e estimular a reparação de fraturas. Como exemplos podemos citar a utilização de rhBMP-7 (proteína morfogenética óssea recombinante humana sete) associada a matriz de colágeno na cura de fraturas de tíbia recalcitrantes; a incorporação de rhBMP-2 (proteína morfogenética óssea recombinante humana dois) em cimentos de fosfato de cálcio/hidroxiapatita usada em modelos de osteotomia de ulna de coelhos, tíbias de cães e fíbulas primatas não humanas, apresentou resultados superiores a 50% na aceleração da reparação óssea. As BMPs também podem ser liberadas de implantes metálicos e poliméricos para aumentar o crescimento ósseo ou a cura de fraturas. Por exemplo, a rhBMP-2 liberada de um implante de titânio revestido com BCP (fosfato de cálcio bifásico) aumentou o crescimento ósseo em um modelo canino. De modo semelhante, a rhBMP-2 liberada de PLGA (poli ácido láctico-co-ácido glicólico) em implantes intramedulares acelerou a cura de fraturas em ratos [5].

Muitos materiais podem ser utilizados como carreadores para liberação de fatores de crescimento no tecido ósseo. Entre eles podemos citar [7]:

- Polímeros naturais: colágeno, fibrina, alginatos, ácido hialurônico, quitosan.
- Polímeros sintéticos: PLA, PGA, PLGA, PCL, polianidrido, polifosfazeno, PPF, PEG, copolímeros de PLA e PEG.
- Materiais inorgânicos: CPC, vidros bioativos, HA, β TCP, copolímeros de materiais inorgânicos e polímeros sintéticos (HA-PLA-PEG, PLGA-CPC).

Para melhorar a eficiência da reparação óssea através da liberação localizada de fatores osteoindutores, a seleção prévia do material de liberação apropriado e o tipo de molécula bioativa são decisivos [7]. Os métodos utilizados para incorporar os fatores de crescimento no interior do material carreador também são de grande importância. Entre os métodos de imobilização incluem-se os métodos de ligação covalente (conjugação química)

ou não covalente (formação de rede física interpenetrante, adsorção física, imobilização química, ou complexação iônica).

A velocidade de liberação pode ser controlada pela variação do método de imobilização. Outro fator que determina a cinética de liberação e estabilidade de fatores de crescimento é a configuração do material carreador; os sistemas de liberação podem ser matrizes, géis injetáveis, micro/nanopartículas e seus compósitos [7]. A Figura 3.14 representa algumas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de fatores de crescimento incorporados em alguns materiais carreadores [7].

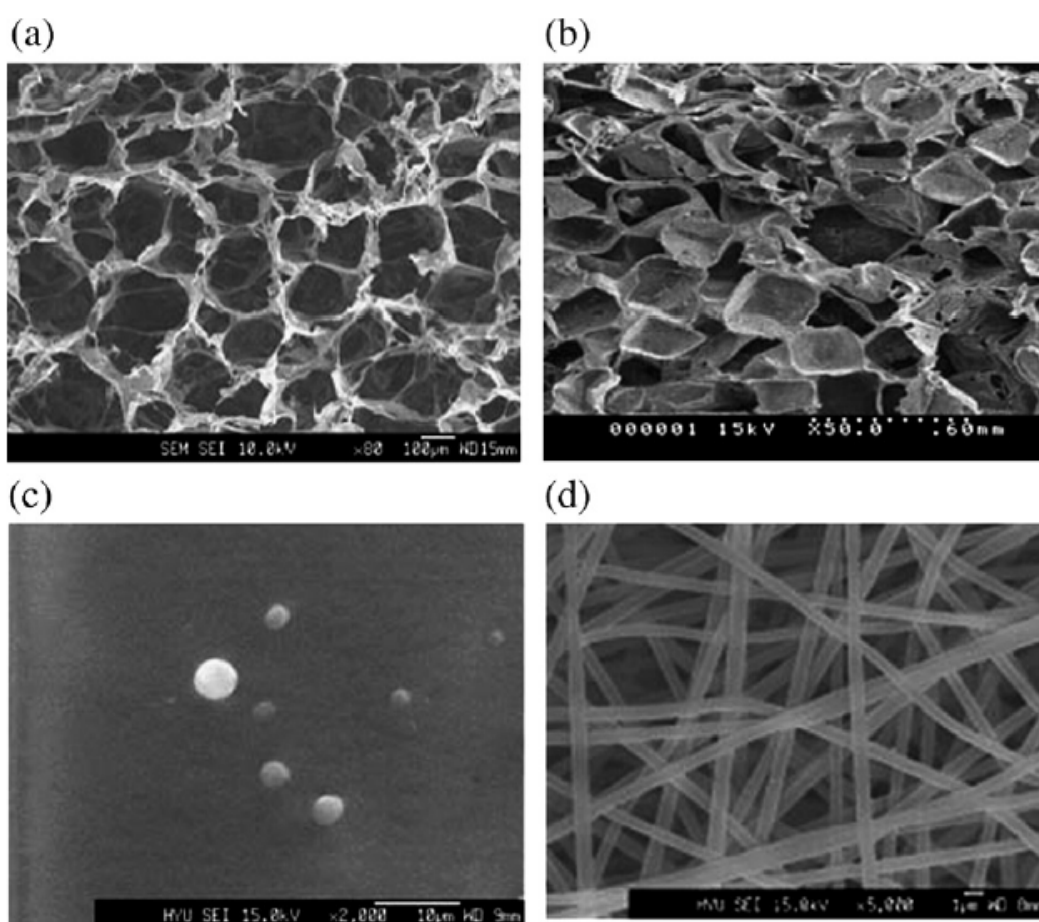


Figura 3.14 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de fatores de crescimento incorporados em materiais carreadores: (a) esponja de colágeno preparada pelo método de congelamento-descogelamento (freezing-thawing), (b) matriz porosa de PLLA preparada pelo método de lixiviação (particulate-leaching method), (c) micropartículas de PLCL preparadas pelo método de extração por dupla emulsão (Double-emulsion extraction), e (d) nanofibras de PLLA fabricadas pela técnica de electrospinnig [7].

3.4 Poli(ϵ -caprolactona): síntese, propriedades físicas e bioquímicas

Os polímeros biodegradáveis possuem várias aplicações biomédicas, entre elas: implantes ósseos, veículos para liberação de drogas em escala micro e nano particulada, anticoncepcionais [12], suturas cirúrgicas, membranas e estruturas porosas para a regeneração dos tecidos [13].

Os polímeros sintéticos biodegradáveis geralmente mais utilizados como suportes tridimensionais na engenharia de tecidos são os poli (α -hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos saturados como o poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli (ϵ -caprolactona) (PCL), assim como copolímeros de PLA e PGA como o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA).

Os polímeros sintéticos biodegradáveis têm muitas vantagens sobre os polímeros naturais biodegradáveis (chitosan, gelatina, ácido hialurônico, entre outros). Eles podem ser produzidos com características específicas como biodegradabilidade, hidrofobicidade, cristalinidade, solubilidade, temperatura de fusão e temperatura de transição vítrea de acordo com sua forma de síntese (por exemplo, copolimerização) e/ou as condições de síntese [14].

Os poliésteres geralmente são sintetizados por poli-condensação de uma mistura de diol e diácido, ou de hidroxíácido [14] e geralmente são obtidos a partir de técnicas como abertura de anel e polimerização por condensação [15, 16, 17]. Alguns poliésteres podem ser obtidos também por rotas que envolvem processos fermentativos [15].

O principal método industrial de síntese do poliéster poli(ϵ -caprolactona) é a polimerização por abertura do anel lactônico (ROP) [13, 16, 18]. Os catalisadores utilizados na obtenção destes materiais envolvem compostos organometálicos a base de estanho e zinco [13], enzimas [16, 41] e mais recentemente o iodo [16].

Óxidos, carboxilatos e alcóxidos são eficientes iniciadores para controlar a síntese de poliésteres através da ROP de lactonas [41]. A polimerização catalisada por enzimas tem muitas vantagens sobre os métodos químicos convencionais incluindo: (a) condições de reação mais suaves, como por exemplo, temperatura, pH, pressão e ausência de solvente orgânicos, (b) alta seletividade de enantiômeros e (c) reciclabilidade do catalisador. As reações enzimáticas são reversíveis, e, portanto, as condições de reação são apropriadas e podem controlar o equilíbrio da reação. As enzimas que catalisam a clivagem de uma ligação química por hidrólise também catalisam a reação reversa de formação da ligação química. Os polímeros produzidos por rotas enzimáticas normalmente possuem massas moleculares baixas [41].

A polimerização por abertura do anel lactônico (ROP) pode ser realizada em massa, em solução, em emulsão ou em suspensão. Iniciadores eficientes são necessários para dar início à polimerização [14]. Dependendo do tipo de iniciador utilizado a polimerização ocorre através de três mecanismos diferentes de reação: catiônica, aniônica, ou inserção por coordenação [14, 41, 44]. Entretanto, poliésteres de alto peso molecular têm sido obtidos usando os mecanismos de polimerização aniônicos e inserção por coordenação.

A polimerização aniônica, representada pelas Figuras 3.15 e 3.16, é iniciada por metais alcalinos, óxidos de metais alcalinos, etc. A reação consiste em um ataque nucleofílico de um iniciador carregado negativamente (ânion) ao carbono da carbonila (C=O) ou ao átomo de carbono adjacente ao oxigênio da lactona, resultando na formação do poliéster linear [14, 41].

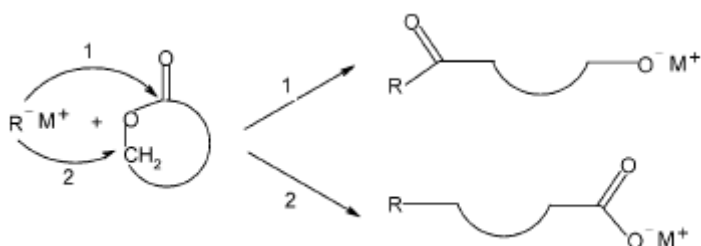


Figura 3.15 – Iniciação da polimerização por abertura do anel de lactonas por iniciadores aniônicos [41].

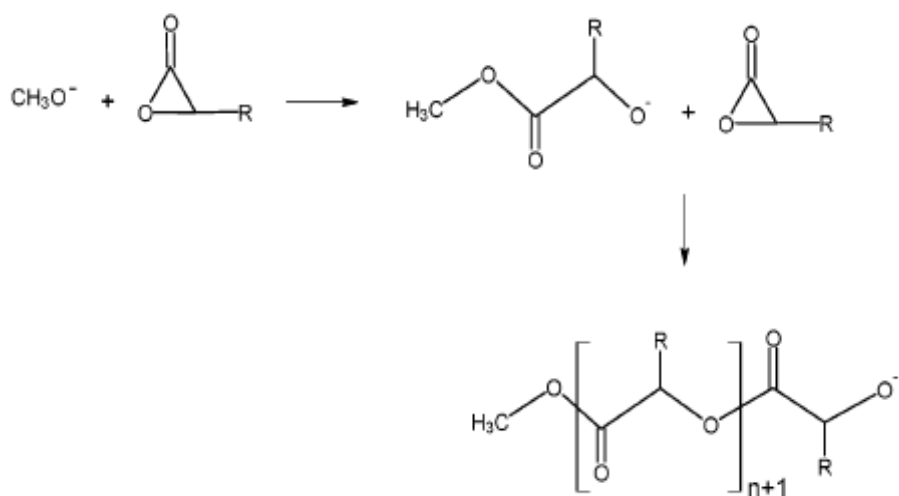


Figura 3.16 – Polimerização aniônica de lactonas mostrando a clivagem do grupo acil-oxigênio [41].

Em lactonas mais extensas como a ϵ -caprolactona a reação procede pela clivagem do grupo acil-oxigênio levando a formação de um íon alcóxido como espécie propagadora (Figura 3.16) [41].

O mecanismo de polimerização de inserção por coordenação com abertura do anel tem sido muito usado para preparação de poliésteres alifáticos com estrutura e arquitetura bem definida [41].

Os compostos orgânicos de metais como estanho, alumínio, ítrio, lítio e zinco [41] são catalisadores de metal ativo utilizados na polimerização do ϵ -caprolactona (ϵ -CL) com a finalidade de controlar a microestrutura do polímero, a qual afeta as suas propriedades mecânicas e de biodegradabilidade. Dentre estes catalisadores, o cloreto de estanho e o octanoato de estanho (2-etil-hexanoato de estanho), são usados na síntese de polímeros para aplicações biomédicas e são aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) como suplementos alimentares. O mais utilizado é o octanoato de estanho, SnOct_2 , que, além de ser aceito pelo FDA para fins alimentícios e médicos, apresenta solubilidade em solventes orgânicos e monômeros de ésteres cíclicos, auxiliando na reação de síntese do poliéster [42].

A polimerização por inserção por coordenação, representada pela Figura 3.17, ocorre por meio da clivagem do grupo acil-oxigênio da lactona com inserção do monômero na ligação metal-oxigênio do iniciador. A coordenação do oxigênio heterocíclico com o metal resulta na sua polarização e torna o carbono do grupo carbonila do monômero mais susceptível ao ataque nucleófilico [41].

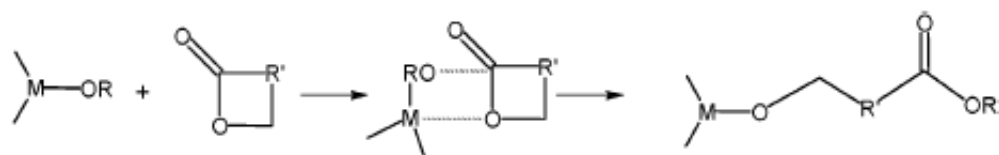
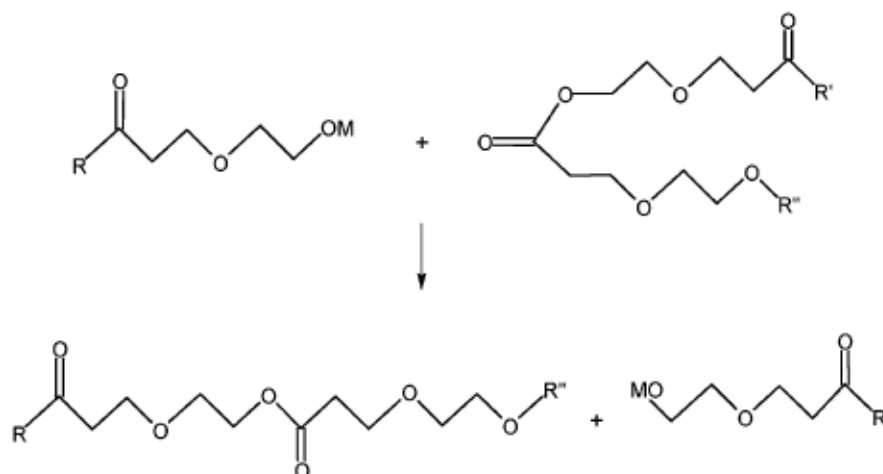


Figura 3.17 – Polimerização da lactona pelo mecanismo de inserção por coordenação [41].

A polimerização por abertura do anel lactônico com iniciadores organometálicos a altas temperaturas ou por longos tempos de reação leva a reações de transesterificação inter e intramoleculares (Figura 3.18). Ambos os tipos de reações de transesterificação levam a um aumento no índice de polidispersão do poliéster.

Transesterificação intermolecular



Transesterificação intramolecular (back-biting)

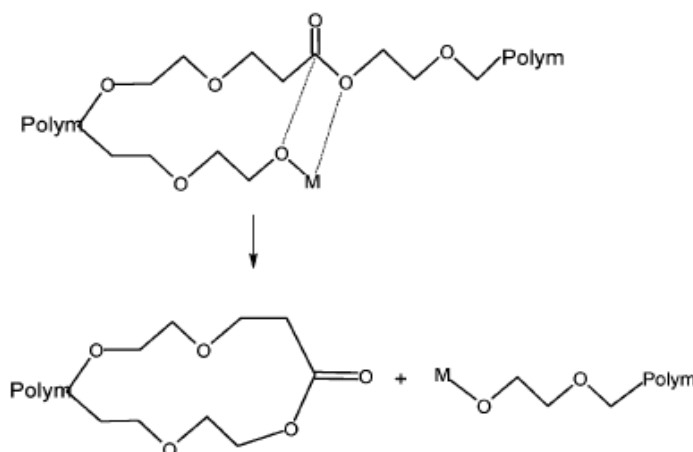


Figura 3.18 – Reações de transesterificação inter- e intramoleculares durante polimerização por abertura de anel [41].

Parâmetros como temperatura, tempo de reação, tipo e concentração do catalisador ou iniciador, e a natureza da lactona são fatores que afetam as reações de transesterificação.

A Figura 3.19 mostra o mecanismo de abertura do anel de lactonas usando compostos organometálicos como iniciadores. A reação de ROP usando Sn(Oct)₂ (octanoato de estanho) como catalisador é conduzida na presença de compostos com hidrogênio ativo (ex: alcoóis). No mecanismo de ativação do monômero, o mesmo é coordenado com o catalisador e é ativado. A abertura do anel lactônico procede via ataque nucleofílico do álcool levando a inserção do monômero na ligação metal-oxigênio pelo rearranjo de elétrons. A funcionalidade do álcool e do monômero são coordenados no complexo Sn(Oct)₂ durante a propagação. A reação é terminada pela hidrólise formando um grupo hidroxila terminal [41].

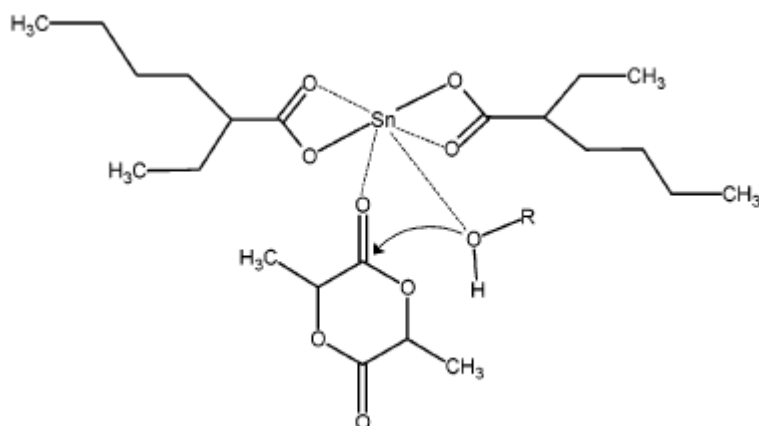


Figura 3.19 – Mecanismo de ativação do monômero de lactonas por ROP [41].

Outro mecanismo alternativo sugere a mistura do $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ e um composto contendo hidrogênio ativo (ROH) formando um complexo que participa da etapa de propagação da polimerização [14, 41]. A Figura 3.20 representa a polimerização da ϵ -caprolactona através deste mecanismo. Na primeira etapa $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ reage com o co-iniciador (ROH), gerando um alcóxido, o verdadeiro iniciador da reação. Em uma segunda etapa, ocorre a inserção do monômero cíclico entre a ligação $\text{Sn} - \text{OR}$, formando uma reação reversível e promovendo o crescimento da cadeia (propagação). ROH é co-iniciador de massa molar baixa ou uma macromolécula com grupo hidroxila terminal.

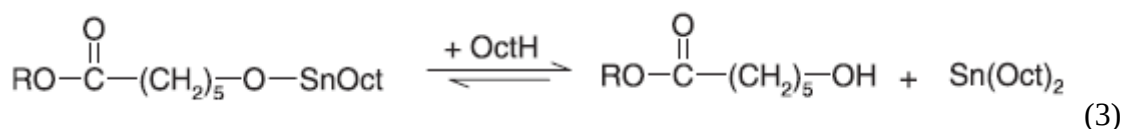
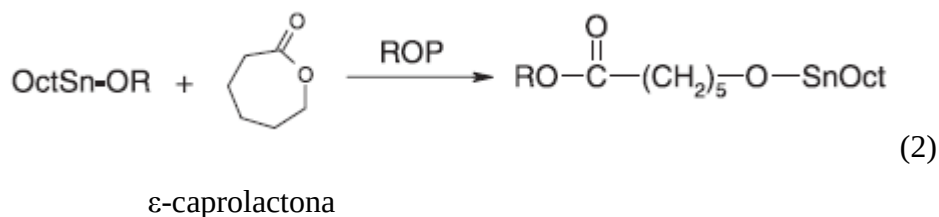


Figura 3.20 – Mecanismo de abertura do anel da ϵ -caprolactona.

Os poliésteres alifáticos são degradados por hidrólise das ligações éster. Após degradação, as unidades monoméricas dos polímeros são eliminadas através de mecanismos regulados pelo próprio organismo [19, 20].

Vários fatores interferem na cinética de degradação dos poliésteres alifáticos, dentre eles pode-se citar a composição química e estrutura conformacional [20, 21], massa molar (M_w) [20], índice de polidispersividade (M_w/M_n) [20], histórico de processamento [20], condições ambientais [20], tensão e deformação [20], cristalinidade [20, 21], área de contacto [20], morfologia [20], orientação da cadeia [20, 21], distribuição dos componentes quimicamente reativos no interior da cadeia [20], presença de monômeros originais [20], hidrofilicidade [20], temperatura de fusão (T_m) [21], e temperatura de transição vítrea (T_g) [21]. O PLGA, por exemplo, tem uma ampla faixa de taxas de degradação sendo a cinética de degradação governada pelo equilíbrio hidrofóbico/hidrofílico e pela cristalinidade. Já a degradação da PCL de alto peso molecular ($M_n=50.000$) é bastante lenta, sendo necessários três anos para sua remoção completa do corpo [20].

A degradação do poli (ϵ -caprolactona) PCL e seus copolímeros envolve duas etapas: a clivagem hidrolítica da porção éster da molécula e a perda de massa através da difusão de espécies oligoméricas. Os produtos gerados da degradação da PCL são metabolizados através do ciclo ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs) ou eliminados por secreção renal direta [20]. A degradação química da PCL através da clivagem hidrolítica origina o monômero 6- hidroxí-ácido capróico que é oxidado em unidades de Acetil CoA para favorecer a degradação via ciclo de Krebs [32] (Figura 3.21).

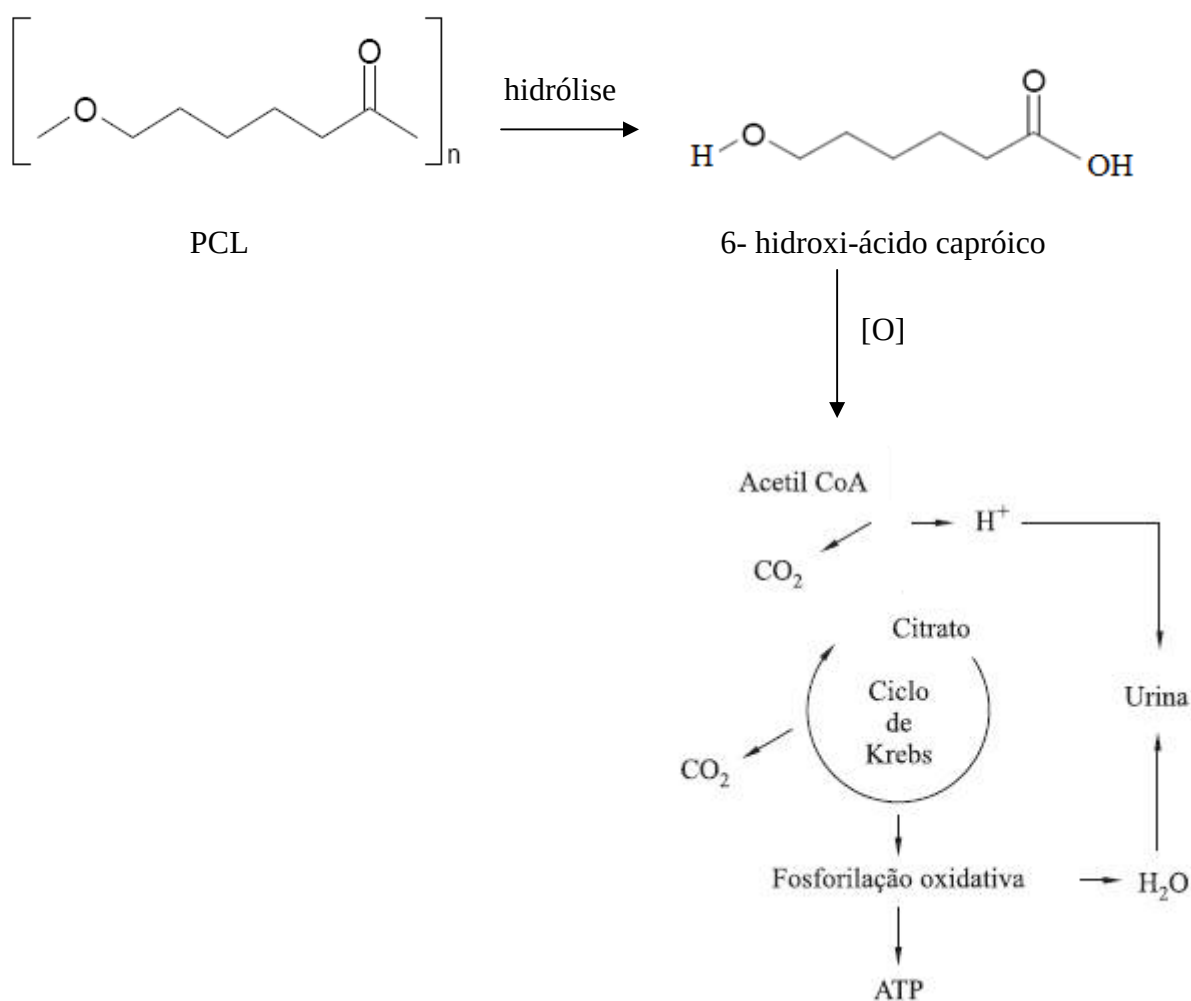


Figura 3.21 – Degradação química do poli(ε-caprolactona).

O polímero PCL é um polímero biorreabsorvível de grande aplicação no reparo de ossos e cartilagens. A reconstrução de articulações complexas como, por exemplo, a articulação temporal-mandibular é um grande desafio para a engenharia de tecidos [22].

Devido a sua grande biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* o poli (ε-caprolactona) (PCL) tem sido usado em sistemas de liberação de drogas [16], por exemplo, para encapsular antibióticos, além de ser um material compatível com suturas reabsorvíveis e substitutos de enxerto ósseo [20], o que resultou na aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration) de vários dispositivos médicos e de liberação de drogas. Entretanto, as aplicações do PCL são limitadas quando comparada a outros poliésteres alifáticos, devido a sua lenta cinética de reabsorção e degradação, em função da sua alta cristalinidade e caráter hidrofóbico [23]. Seu caráter hidrofóbico se deve à presença de cinco grupos metileno apolares e um grupo éster relativamente polar em cada unidade repetitiva [16].

O poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um polímero SEMi-cristalino [24], com temperatura de transição vítrea entre -60°C e -72°C [19, 20 23, 25] sendo maleável à temperatura ambiente e corporal [25]. As características maleáveis do PCL resultam em uma alta permeabilidade e por isso tem sido comumente utilizado na liberação de drogas de baixo peso molecular [19]. Ao mesmo tempo, o PCL é um polímero com baixo ponto de fusão ($58-60^{\circ}\text{C}$) [26] o que facilita seu processamento. Suas propriedades mecânicas e degradação enzimática podem ser alteradas através do controle da sua cristalinidade. O poli (ϵ -caprolactona) (PCL) pode ser misturado a vários polímeros amorfos ou cristalinos [27].

Macrômeros de PCL podem ser sintetizados a partir de moléculas de PCL dióis, com hidroxilas terminais, em presença de grupos acrílicos após reação das hidroxilas terminais com cloreto de acríloila (cloreto de vinila) formando-se em seguida o macrômero por polimerização radicalar (Figura 3.22). O poli (ϵ -caprolactona) (PCL) ramificado tridimensional pode ser preparado pelo método de fotopolimerização dos macrômeros com radiação de luz ultravioleta (UV) na presença de um grupo iniciador, por exemplo, o 2,2-dimetoxi-2-fenil acetofenona, como mostrado na Figura 3.23 [23].

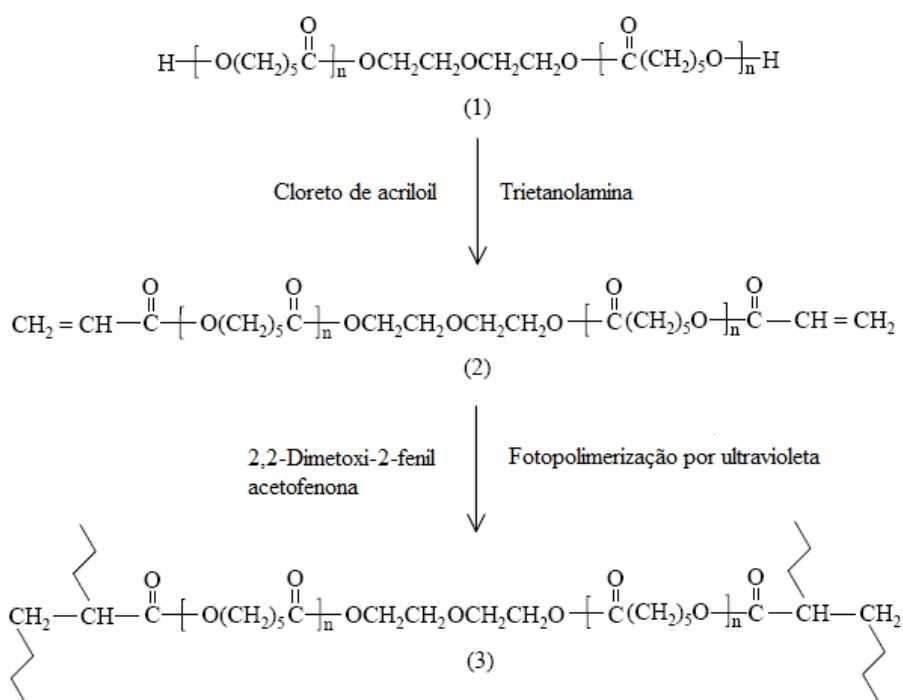


Figura 3.22 – Síntese do macrômero de PCL (2) e de PCL ramificado (3) a partir de uma molécula de PCL diol (1) [23].

A incorporação de grupos acrílicos na molécula de PCL faz com que o polímero ramificado resultante apresente uma cinética de degradação mais rápida do que da PCL linear, devido à sua menor cristalinidade e maior hidrofilicidade [23].

Materiais biocerâmicos como fosfatos de cálcio (CaP), fosfato tricálcio (TCP), hidroxiapatita (HA) podem ser combinados a polímeros biodegradáveis como o PCL para produzir substitutos ósseos devido à estrutura similar a fase mineral do osso, propriedades osteocondutoras e de ligação óssea das biocerâmicas [29]. Estes compósitos também aumentam a estabilidade mecânica do suporte e melhoram a interação com o tecido [20]. Mondrinos e colaboradores [28] citado por Jansen J. A. [29] demonstrou que a força de compressão de um suporte poroso de PCL/CaP 10%/20% apresentou valor maior quando comparado com o PCL puro. Células mesenquimais embrionárias de palato humano quando adicionadas a este suporte apresentaram um aumento de 20% na sua proliferação.

Marra e colaboradores [30] citado por Kweon, Yoo e colaboradores [23] relatam que o poli (ϵ -caprolactona) (PCL) é um substrato comparável a um suporte para o crescimento de células resultante de uma cultura de células da medula óssea. Um disco de PCL/PLA incorporado com hidroxiapatita (HA) pode ser utilizado como suporte para regeneração do tecido ósseo. Heath e colaboradores [31] também citado por Kweon, Yoo e colaboradores [23] avaliou o uso da enzima transglutaminase tecidual como revestimento da superfície do PCL para aumentar a biocompatibilidade deste poliéster. A transglutaminase tecidual é uma proteína que se liga fortemente a fibronectina na matriz pericelular, aumentando a adesão do PCL e assim a sua biocompatibilidade. A fibronectina tecidual é sintetizada pelos fibroblastos e células endoteliais e está relacionada com a adesão, migração, diferenciação e crescimento celular.

3.4.1 PCL com topologia do tipo estrela (PCL*)

Embora o PCL linear, suas blendas e copolímeros sejam muito estudados para aplicações farmacológicas e biomédicas, sua aplicação em sistemas de liberação de drogas e suportes para a engenharia de tecidos apresenta degradação *in vitro* e *in vivo* lenta, devido a sua alta cristalinidade e hidrofobicidade do polímero. Na tentativa de solucionar tais problemas pode-se, por exemplo, ajustar o balanço hidrofílico/hidrofóbico do polímero, efetuar misturas de polímeros ou copolímeros com polilactatos e polilactonas, e controlar a arquitetura macromolecular da cadeia polimérica [18].

Nas últimas décadas, polímeros com topologia estrela, polímeros ramificados e dendrímeros têm atraído muita atenção por causa de suas propriedades mecânicas e reológicas

e pela facilidade do controle funcional de sua superfície, o que não é acessível na maior parte dos polímeros lineares [18]. A principal característica dos polímeros estrela que diferem de seus análogos lineares de mesma massa molar (M_n), é sua estrutura compacta (menor volume hidrodinâmico e raio de rotação, e consequentemente menor viscosidade) e a multifuncionalidade que é útil em muitas de suas aplicações [43].

Poliésteres com microestrutura bem definida como polímeros com forma de estrela e dendrímeros são de grande interesse, pois sua arquitetura e funcionalidade influenciam nas suas propriedades físico-químicas [13]. Um polímero estrela constitui-se de um núcleo central acoplado com três ou mais ramificações de mesmo peso molecular [33]. Assim, aumentando o número de ramificações aumenta o peso molecular do material, porém o volume hidrodinâmico não sofre mudanças consideráveis. Consequentemente, a viscosidade destes polímeros permanece praticamente constante.

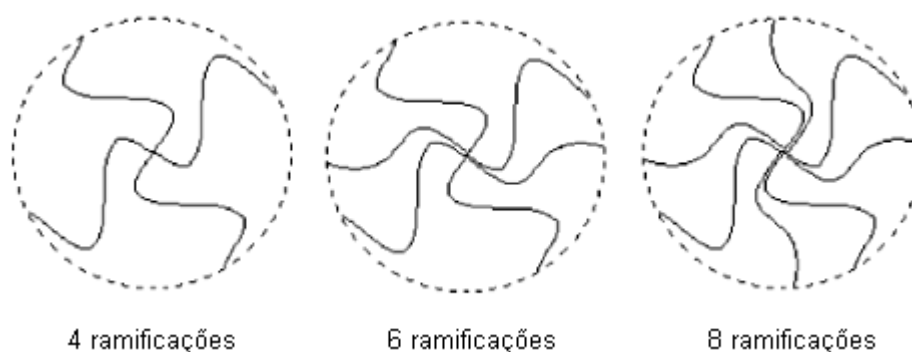


Figura 3.23 – Representação esquemática de polímeros do tipo estrela com ramificações de mesmo peso molecular e com número de ramificações diferentes.

Um polímero ramificado pode ser perfeitamente caracterizado através de medidas de viscosidade intrínseca $[\eta]$. Portanto, a viscosidade intrínseca de um polímero em solução é um parâmetro que depende diretamente das dimensões moleculares da macromolécula [34].

Devido às inúmeras conformações que a cadeia polimérica pode assumir, a melhor representação da morfologia de uma partícula polimérica é a de um “novelo aleatório”. A dependência de $[\eta]$ com o formato molecular se deve ao movimento de rotação da molécula, ou seja, do coeficiente de fricção que cada segmento do polímero exerce ao centro de massa da partícula exercido pelo processo de fluência do solvente [34].

Sendo expressa em unidade de volume por unidade de massa, a $[\eta]$ está diretamente relacionada ao volume hidrodinâmico da partícula. Quanto maior for o volume hidrodinâmico, maior será $[\eta]$. Portanto, $[\eta]$ depende da massa molecular e da interação entre

os segmentos do polímero e das moléculas do solvente. Quanto maior for esta interação, tanto maior (mais inchado) será o novelo polimérico [34, 45] (Figura 3.24):

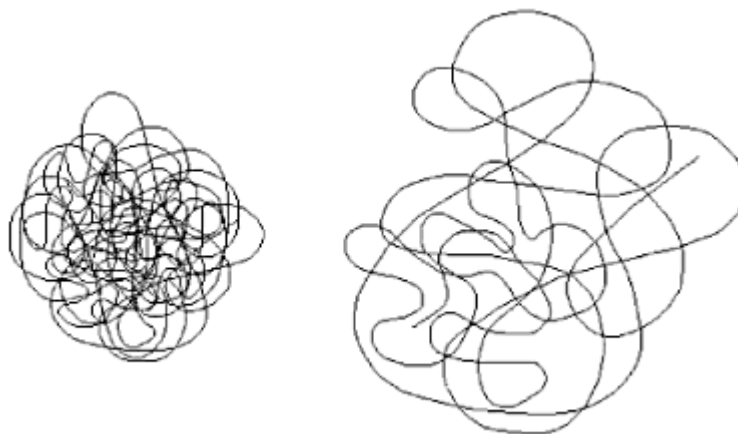


Figura 3.24 – Ilustração do comportamento do novelo polimérico em diferentes solventes: (a) encolhido (mau solvente) (b) expandido (bom solvente)

Quando as interações entre polímero e solvente são mínimas ou nulas, a partícula adquire uma morfologia aproximadamente de uma esfera rígida. Nesta condição o volume hidrodinâmico da partícula é mínimo. Esta condição é denominada de “estado θ ”, e a solução tem um comportamento ideal em baixas concentrações. No estado θ define-se que a partícula hidrodinâmica tem dimensões não-pertubadas.

Considerando o caso de polímeros com topologia estrela, a ramificação tem um efeito de aumentar a densidade do novelo polimérico. Portanto, um polímero ramificado ocupa um volume menor do que um polímero linear de mesmo tamanho, consequentemente apresenta uma viscosidade intrínseca menor. O grau de ramificação é caracterizado em termos de fator de ramificação (g'):

$$g' = \left(\frac{[\eta]_{\theta, ramif}}{[\eta]_{\theta, lin}} \right)_M \quad (3.1)$$

A relação entre o parâmetro g' com o número de ramificações, f , de um polímero estrela é caracterizado pelos modelos de Stockmayer/Fixman e o modelo de Zimm e Kilb. O modelo de Stockmayer-Fixman é caracterizado pela equação [35, 36, 37, 38]:

$$g' = f^{3/2} \left[2 - f + 2^{1/2(f-1)} \right]^{-3} \quad (3.2)$$

sendo f o número de ramificações de um polímero estrela.

A relação entre o parâmetro g' com o número de ramificações no modelo de Zimm e Kilb é dado por [39]:

$$g' = \frac{\left(\frac{2}{f} \right)^{3/2 [0,39(f-1)+0,196]}}{0,586} \quad (3.3)$$

A síntese do dendrímero PCL estrela utilizando como núcleo o pentaeritritol e trimetilolpropano já foi demonstrada por vários autores como Qiu e colaboradores [40], citado por Yanjun Cui e colaboradores [13], que relatou a síntese de PCL estrela de três braços e quatro braços via polimerização por abertura do anel lactônico do monômero ϵ -caprolactona (ϵ -CL).

Trabalhos da literatura relatam a síntese de PCL estrela com seis braços usando como precursor o ciclofosfazano, $N_3P_3(p\text{-O-C}_6\text{H}_4\text{-CHO})_6$, e catalisada por octanoato estano, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, obtendo-se polímeros com diferentes pesos moleculares, devido a variação da razão molar entre o monômero ϵ -CL e o iniciador, conforme ilustrado na Figura 3.25.

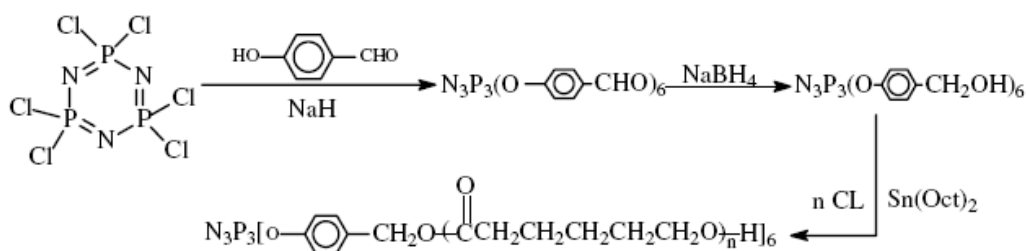


Figura 3.25 – Síntese do poli(ϵ -caprolactona) com topologia do tipo estrela de seis braços.

Neste caso, a análise por DSC do PCL estrela demonstrou que o aumento do seu peso molecular provoca um aumento no seu ponto de fusão, fazendo com que o rearranjo de cristalização do PCL estrela (com braços) seja interrompido pela arquitetura altamente ramificada das cadeias laterais destes polímeros.

Jing-Liang Wang e Chang-Ming Dong [18] investigaram as propriedades físicas, a cinética de cristalização, o crescimento esferulítico e a morfologia do PCL sintetizado com diferentes braços (PCL estrela com 4 e 6 braços, PCL linear com 1 e 2 braços), conforme ilustrado na Figura 3.26. A polimerização foi realizada a 120°C por 24 horas. O peso molecular dos polímeros de PCL obtidos é controlado pela razão molar entre monômero (ϵ -CL) e o iniciador (álcool primário). Os iniciadores utilizados na polimerização foram: álcool benzílico para obtenção do LPCL (PCL linear com 1 braço), 1,6-hexanol para a obtenção do 2LPCL (PCL linear com 2 braços), pentaeritritol para obtenção do 4_sPCL (PCL estrela com 4 braços) e éter do pentaeritritol para obtenção do 6_sPCL (PCL estrela com 6 braços).

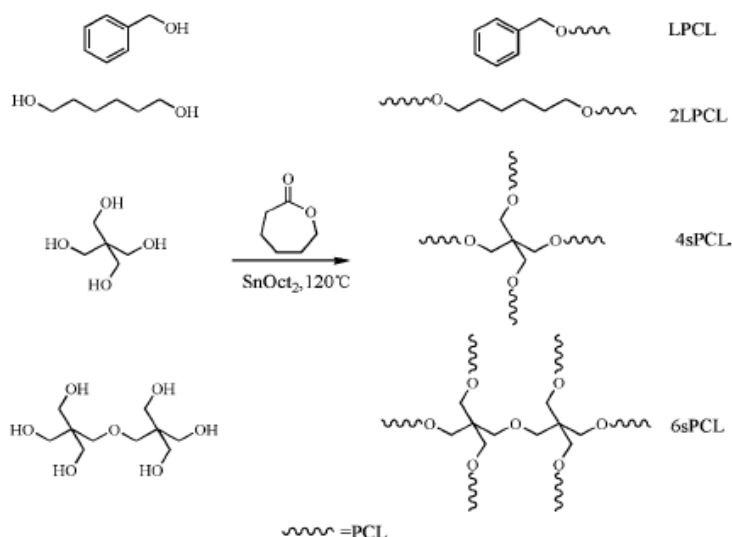


Figura 3.26 – Síntese por polimerização em massa do PCL com diferentes braços usando álcools como iniciadores e SnOct_2 como catalisador da reação.

A análise de DSC mostrou que todos os polímeros obtidos têm um ponto de fusão monomodal com temperatura entre 48,6 – 59,1°C no primeiro ciclo de aquecimento, a temperatura de cristalização obtida no ciclo de resfriamento está entre 20,1 – 35,4°C, e um pico de fusão endotérmico monomodal foi obtido no segundo ciclo de aquecimento com temperaturas de fusão entre 42,9 – 58,0°C [18]. Estes resultados indicam que possivelmente não existe uma cristalização secundária nos polímeros com estrutura bem definida, pois todos têm muito tempo para se rearranjar e cristalizar durante os ciclos de aquecimento e resfriamento devido à sua baixa temperatura de transição vítrea (- 60°C) e à sua regularidade molecular [18].

A temperatura máxima de fusão (T_m) e a temperatura de cristalização (T_c) diminuem com o aumento do número de braços no PCL estrela, na seguinte ordem LPCL > 2LPCL > 4_sPCL >

6_sPCL [18]. Isto ocorre devido ao decréscimo do peso molecular de cada braço de PCL ligado ao núcleo iniciador funcional, que leva a um aumento na densidade do braço de PCL (número de braços ou ramos por unidade de massa). Além do mais, a T_m aumenta com o aumento do peso molecular do polímero.

O grau de cristalinidade (X_c) dos polímeros obtidos decresce com o aumento do número de braços (ou ramos) do polímero, na seguinte ordem $X_{c, LPCL} > X_{c, 2LPCL} > X_{c, 4sPCL} > X_{c, 6sPCL}$, e eles possuem estrutura cristalina similar [18]. A razão de cristalização (K) isotérmica e não isotérmica obtida para os polímeros foi a seguinte $K_{2LPCL} > K_{LPCL} > K_{4sPCL} > K_{6sPCL}$. A constante de cristalização (K) para o PCL linear diminui com o aumento do peso molecular do polímero enquanto que para a PCL estrela, K aumenta [18].

O PCL linear (LPCL e 2LPC) apresentou uma boa morfologia esferulítica no tempo de cristalização de 80 segundos enquanto o PCL estrela (4_sPCL e 6_sPCL) mostrou esferulitos irregulares com morfologia pobre até o tempo de cristalização de 600 segundos. Isto mostra que a arquitetura em forma de estrela tem um efeito aparente na morfologia de formação dos esferulitos. Com o aumento do peso molecular do polímero, o PCL estrela (4_sPCL e 6_sPCL) tem a morfologia esferulítica melhorada no tempo de cristalização de 90 segundos, similar ao observado para o PCL linear. Tanto o PCL estrela e linear com alto peso molecular apresentaram boa morfologia esferulítica. Em ambos, o número de braços (ou ramos) e o peso molecular destes polímeros controlaram a razão de cristalização isotérmica e não isotérmica, a morfologia e o crescimento esferulítico [18].

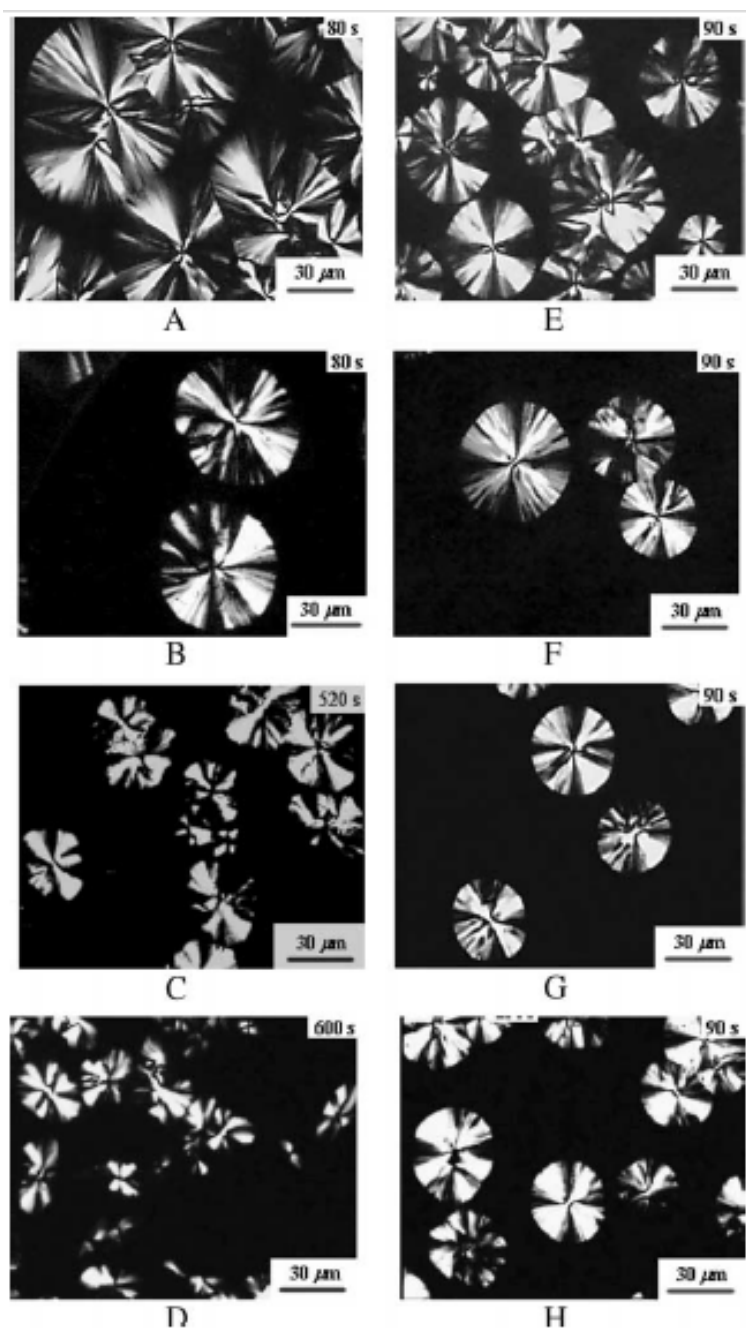


Figura 3.27 – Fotomicrografia obtida por Microscopia Ótica Polarizada do PCL cristalizado a 38°C: (A) LPCL1, 80s; (B) 2LPCL1, 80 s; (C) 4sPCL1, 520 s; (D) 6sPCL1, 620 s; (E) LPCL4, 90 s; (F) 2LPCL4, 90 s; (G)4sPCL4, 90 s; (H) 6sPCL4, 90 s [18].

Nos últimos anos o número de publicações sobre a utilização do polímero PCL* para aplicações na área biomédica vem crescendo significativamente conforme ilustrado na Figura 3.28.

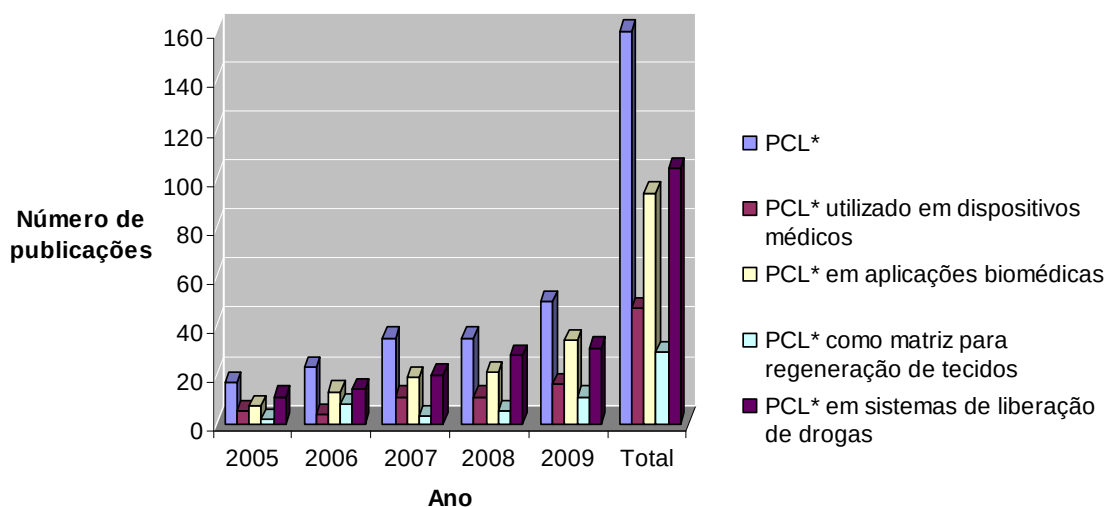


Figura 3.28 – Publicações sobre o uso do PCL* na área biomédica [53].

3.5 Referências Bibliográficas

- 1 – JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 8, p. 136 a 153.
- 2 – STEVENS M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. **Materials today**, 11 (5): 18-25, 2008.
- 3 – M. FINI; G. GIAVARESI; P. TORRICELLI; V. BORSARI; R. GIARDINO; A. NICOLINI; A. CARPI. Osteoporosis and biomaterial osteointegration. **Biom. Pharm.**, 58: 487 - 493, 2004.
- 4 – LIESBET GERIS; ALF GERISCH; JOS VANDER SLOTEN; RU" DIGER WEINER; HANS VAN OOSTERWYCK. Angiogenesis in bone fracture healing: A bioregulatory model. **J. Theor. Biotech.**, 251: 137–158, 2008.
- 5 – WOZNEY J. M.; SEEHERMAN H. J. Protein-based tissue engeneering in bone and cartilage repair. **Current Op. Biotech.**, 15: 392–398, 2004.
- 6 – MARTINEAU E. L.; GAGNON G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: Kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. **Biomaterials.**, 25: 4489–4502, 2004.
- 7 – SOO-HONG LEE; SHIN H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 59: 339–359, 2007.
- 8 – SANTOS A. A. DOS; MIRANDA C. D. O; ALVES M. T. DE S.; FALOPPA F. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. **Acta Ortop. Bras.**, 13 (4): 194-195, 2005.

- 9 – TESSMAR J. K; GÖPFERICH A. M. Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering. **Adv. Drug Del. Rev.**, 59: 274–291, 2007.
- 10 – KOFRON D. M.; LAURENCIN T. C. Bone tissue engineering by gene delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 58 (4): 555–576, 2006.
- 11 – OREFFO R. O. C.; KANCZLER J. M.; GINTY P. J.; JOHN J.A. BARRY; CLARKE N. M. P.; HOWDLE S. M; SHAKESHEFF K. M. The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. **Biomaterials.**, 29: 1892–1900, 2008.
- 12 – CHANG H. I.; PERRIE Y.; COOMBES A. G. A. Delivery of the antibiotic gentamicin sulphate from precipitation cast matrices of polycaprolactone. **J. Control. Rel.**, 110 (2): 414-421, 2006.
- 13 – YANJUN CUI; XIAOMEI MA; XIAOZHEN TANG; YINPEI LUO. Synthesis, characterization, and thermal stability of star-shaped poly(ϵ -caprolactone) with phosphazene core. **Eur. Polym. J.**, 40 (2): 299-305, 2004.
- 14 – OLIVIER COULEMBIER O.; DEGÉE P.; HEDRICK J. L.; DUBOIS P. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: Especially poly (β -malic acid) derivatives. **Prog. Polym. Sci.**, 31(8): 723-747, 2006.
- 15 – NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Prog. Polym Sci.**, 32 (8-9): 762-798, 2008.
- 16 – DE QUEIROZ A. A. A.; FRANÇA E. J.; ABRAHAM G. A; ROMAN, J. S. Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone by Iodine Charge-Transfer Complex. **J. Polym. Sci.**, 40: 714-722, 2002.
- 17 – GUNATILLAKE P. A.; ADHIKARI R. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. **Eur. Cells Mat.**, 5: 1-16, 2003.
- 18 – WANG J.-L.; DONG C.-M. Physical properties, crystallization kinetics, and spherulitic growth of well-defined poly(ϵ -caprolactone)s with different arms. *Polymer*, 47 (9): 3218-3228, 2006.
- 19 – COOMBES A. G. A.; RIZZI S. C.; WILLIAMSON M.; BARRALET J.E.; DOWNES S.; W.A. WALLACE W. A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. *Biomaterials*, 25 (2): 315-325, 2004.
- 20 – REZWAN K.; CHEN Q. Z.; BLAKER J. J.; BOCCACCINI A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, 27 (18): 3413-3431, 2006.
- 21 - TOKIWA Y.; CALABIA B. P. Biodegradability and biodegradation of polyesters. **J. Polym. Environm.**, 15 (4): 259-267, 2007.
- 22 – WILLIAMS J. M.; ADEWUNMI A.; SCHEKA R. M.; FLANAGANA C. L.; KREBSBACHA P. H.; FEINBERGD S. E.; HOLLISTERA S. J.; DASB S. Bone tissue

engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering. **Biomaterials.**, 26 (23): 4817- 4827, 2005.

23 – KWEON H. Y.; YOO M. K.; PARK I. K.; KIM T. H.; LEE H. C.; LEE H.-S.; OHC J.-S.; AKAIKED T.; CHO C.-S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**, 24 (5): 801- 808, 2003.

24 – ELZEIN T.; AWADA H.; NASSER-EDDINE M.; DELAITE C.; BROGLY M. A model of chain folding in Polycaprolactone-b-Polymethyl Methacrylate diblock copolymers. **Thin Solid Films**, 483 (1-2): 388- 395, 2005.

25 – MA P. X. Biomimetic materials for tissue Engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 60: 184-198, 2008.

26 – SABINO M. A. Oxidation of polycaprolactone to induce compatibility with other degradable polyesters. **Polym. Degrad. Stab.**, 92 (6): 986-996, 2007.

27 – SARASAM A.; MADIHALLY S. V. Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. **Biomaterials**, 26 (27): 5500 - 5508, 2005.

28 – MONDRINOS M. J.; DEMBZYNSKI R.; LU L.; BYRAPOGU V.K.C.; WOOTTON D.M.; LELKES P.I.; ZHOU J. Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone–calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, 27: 4399–4408, 2006.

29 – HABRAKEN W. J. E. M.; WOLKE J. G. C.; JANSEN J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 59 (4-5): 234 - 248, 2007.

30 – MARRA KG; SZEM JW; KUMTA PN; DIMILLA PA; WEISS LE. In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. **J. Biomed Mater Res.**, 47: 324–335, 1999.

31 – HEATH DJ; CHRISTIAN P; GRIFFIN M. Involvement of tissue transglutaminase in the stabilization of biomaterial/tissue interfaces important in medical devices. **Biomaterials**, 23: 1519–1526, 2002.

32 – Biomet Orthopedics Inc. Mesofol® Surgical Sheet, Description Device.

33 – NÚÑEZ E.; FERRANDO C.; MALMSTROM E.; CLAESSON H.; WERNER P.-E.; GEDDE U.W. Crystal structure, melting behaviour and equilibrium melting point of star polyesters with crystallisable poly ϵ -caprolactone) arms. **Polymer**, 45 (15): 5251- 5263, 2004.

34 – LUCAS E. F.; SOARES B. G.; MONTEIRO E. E. C. **Caracterização de Polímeros. Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica.** 1 ed. Rio de Janeiro: e-papers, 2001.

35 – W. H. STOCKMAYER; M. FIXMAN. Dilute Solutions of Branched Polymer. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 57, 334 - 352, 1953.

36 – M. FIXMAN; B. ZIMM, W. H. STOCKMAYER. Excluded Volume in Polymer Chains. **J. Chem. Phys.**, 21, 1716, 1953.

- 37 – M. FIXMAN; W. H. STOCKMAYER; L. D. MOORE; JR. B. N. EPSTEIN. Copolymers in Dilute Solution. **J. Polym. Sci.**, 16, 517, 1955.
- 38 – M. FIXMAN. Excluded Volume in Polymer Chains. **J. Chem. Phys.** 23, 1656 (1955); 24, 174 (1956).
- 39 – BRUNO H. ZIMM; RALPH W. KILB. Dynamics of branched polymer molecules in dilute solution. **J. Polym. Sci.**, 37 (131): 19 - 42, 1959.
- 40 – DONG CM; QIU KY; GU ZW; FENG XD. **Macromolecules**, 34: 4691, 2001.
- 41 – ALBERTSSON A-C.; VARMA I. K. Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications. **Biomacromolecules**, 4: 1466 - 1486, 2003.
- 42 – RYNER M.; STRIDSBERG K.; ALBERTSSON A. C.; VON SCHENCK H. SVENSSON; M. Mechanism of ring-opening polymerization of 1,5-dioxepan-2-one and l-lactide with stannous 2-ethylhexanoate. A theoretical study. **Macromolecules**, 34: 3877-3881, 2001.
- 43 – LAPIENIS G. Star-shaped polymers having PEO arms. **Prog. Polym. Sci.**, 2008, doi: 10.1016.
- 44 – KRICHELDORF H. R. Syntheses and application of polilactide. **Chemosphere**, 43: 49 - 54, 2001.
- 45 – FLORY P. J. **Principles of Polymer Chemistry**, Cornell University, New York, 1953.
- 46 – Disponível em <www.virtual.epm.br/.../histo/fig2829.htm>. Acesso em 07 abril 2009.
- 47 – Disponível em <<http://biologiainterativa.wordpress.com/2009/05/23/fascinantes-imagens-do-corpo-humano>> Acesso em 07 abril 2009.
- 48 – Disponível em <www.curlygirl.no.sapo.pt/tecidosa.htm>. Acesso em 07 abril 2009.
- 49 – Disponível em <www.afh.bio.br/sustenta/Sustenta2.asp>. Acesso em 07 abril 2009.
- 50 – Disponível em <www.aparelholocomotor.blogspot.com>. Acesso em 07 abril 2009.
- 51 – Disponível em <www.anatpat.unicamp.br/biossifmembranosa.html>. Acesso em 07 abril 2009.
- 52 – Disponível em <www.efoa.br/.../CB/Histologia/Tosseo.htm>. Acesso em 07 abril 2009.
- 53 – Brasil. Ministério da Educação. Periódicos Capes. Disponível em <www.periodicos.capes.gov.br> Acesso em 25 setembro 2009.

4. Objetivos

O polímero poli (ϵ - caprolactona) é muito utilizado para a produção de *scaffolds* na engenharia tecidual, devido a sua biocompatibilidade e sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA). Considerando a extensão do uso mais freqüente da poli(ϵ - caprolactona), um polímero biorreabsorvível, para restaurar partes do corpo humano através do desenvolvimento de dispositivos temporários usados em osteossíntese, deve-se ressaltar que não é bem conhecido ainda qual tipo de arquitetura de PCL, linear ou estrela pode gerar uma matriz com uma hemocompatibilidade mais adequada para o projeto de suportes para a engenharia de tecidos biológicos.

Com relação à obtenção do polímero poli(ϵ -caprolactona) com topologia do tipo estrela de três braços (PCL*), verificou-se que existem alguns pontos que não foram suficientemente explorados na literatura, a saber:

- a) O processo de polimerização para obtenção de poli (ϵ -caprolactona) com arquitetura do tipo estrela tem sido feito a partir de um núcleo de pentaeritritol, porém pouca ênfase tem sido dada ao glicerol (1,2,3-propanotriol) como núcleo iniciador.
- b) A arquitetura do tipo PCL estrela mais estudada é a com quatro braços, podendo-se, portanto examinar-se a arquitetura de PCL* com três braços e discutir-se uma relação estrutura/hemocompatibilidade mais apropriada.
- c) Devido à produção do biodiesel, existe um excesso de glicerina no Brasil. Hoje a demanda nacional de glicerina é estimada em 23 mil toneladas por ano, mas a produção ultrapassa as 120 mil toneladas/ano, o que tem causado um acúmulo desta substância nas usinas produtoras de biodiesel. Neste sentido, este trabalho vem contribuir diretamente para o desenvolvimento sustentável de novas tecnologias e métodos para o aproveitamento da glicerina, hoje considerado quase que como um resíduo dado à capacidade limitada de absorção deste material pelos mercados tradicionais.

Quanto ao estudo da propriedade hemocompatível do poli (ϵ -caprolactona) com arquitetura do tipo linear (PCL) e estrela (PCL*) pode-se dizer que os fenômenos de adsorção protéica, adesão plaquetária e formação de trombos não foram relacionados substancialmente à arquitetura molecular destes materiais.

4.1- Objetivos

Este trabalho teve por objetivo a síntese, caracterização e a investigação das propriedades hemocompatíveis do polímero PCL* relativamente ao seu homólogo PCL linear. Neste trabalho, os “braços” do PCL* foram estendidos a partir de um núcleo do glicerol (1,2,3-propanotriol).

O polímero PCL* sintetizado foi caracterizado quanto à sua microestrutura utilizando-se técnicas instrumentais: i) calorimetria exploratória diferencial (DSC), ii) cromatografia de permeação em gel (GPC), iii) espectroscopia na região do infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR) e, iv) ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -NMR) e carbono (^{13}C -NMR).

As propriedades biocompatíveis investigadas do PCL* relativamente ao PCL linear foram: a) estudo radioisotópico do processo de adsorção das proteínas séricas albumina de soro humano (HSA), gama-globulina (γ -Glb) e fibrinogênio (HFb), b) morfologia dos filmes protéicos aderidos por microscopia de força atômica, c) Estudo pelas técnicas de microscopia de epifluorescência (EPF) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) das plaquetas aderidas e trombos formados.

5. Experimental

5.0 SÍNTESE DO POLÍMERO POLI(ε-CAPROLACTONA) COM ARQUITETURA DO TIPO ESTRELA (PCL*)

O polímero PCL* com arquitetura tipo estrela de três braços foi obtido após polimerização por abertura do anel lactônico via complexo de transferência de carga do monômero ε-caprolactona (ε-CL). Dependendo do iniciador da polimerização via abertura do anel lactônico, podem-se obter poliésteres lineares com uma ou duas extremidades com grupos hidroxilas, ou polímeros do tipo estrela com três ou mais cadeias terminais de grupos hidroxilas.

A reação de polimerização ocorreu sob agitação do monômero ε-caprolactona, glicerol e 2-etilhexanoato de estanho como catalisador, durante 24 horas em atmosfera inerte de nitrogênio.

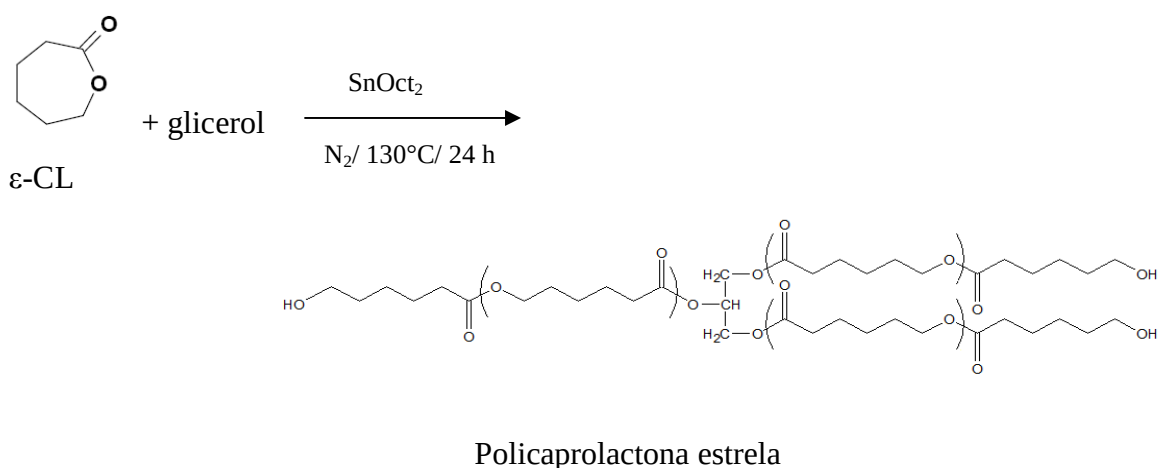


Figura 5.1 – Síntese do polímero poli (ε-caprolactona) estrela

A Figura 5.2 ilustra o reator utilizado neste trabalho para a reação de abertura de anel da ε-caprolactona e produção do polímero poli (ε-caprolactona) com arquitetura do tipo estrela.

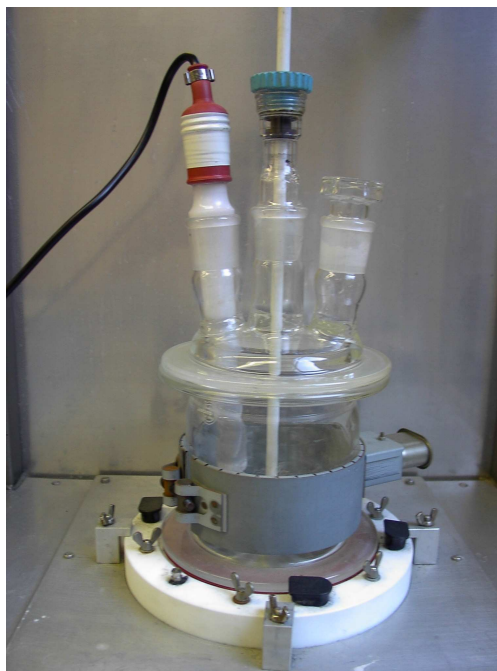


Figura 5.2 – Reator de polimerização utilizado para a polimerização por abertura de anel do monômero ϵ -CL e produção do PCL* com arquitetura estrela de três braços.

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PCL*

O polímero PCL* foi caracterizado por cromatografia de permeação em gel (GPC), ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN), espectroscopia de infravermelho utilizando transformada de Fourier (FT-IR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

5.1.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel (GPC) ou cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) é uma técnica que tem sido destacada como fundamental para a ciência macromolecular. É uma técnica rápida e segura utilizada para a determinação da distribuição de pesos moleculares de polímeros. É uma técnica de fracionamento das cadeias poliméricas de um polímero, com relação ao volume hidrodinâmico que cada uma delas ocupa em solução [1]. As propriedades mecânicas e o comportamento do polímero durante o processamento são altamente dependentes do tamanho médio e da distribuição das cadeias de polímero. Ainda que a estrutura do polímero seja igual, pesos moleculares diferentes podem mudar completamente as propriedades do polímero (propriedades físicas, mecânicas, térmicas, reológicas, de processamento e outras), e por esta razão, os polímeros são caracterizados principalmente por seu peso molecular [1].

A técnica de GPC utiliza colunas empacotadas com géis de poliestireno ou polietileno glicóis reticulados de diferentes porosidades constituindo a fase estacionária. O polímero dissolvido em solvente apropriado é separado de acordo com seu volume hidrodinâmico, ou seja, moléculas pequenas tendem a permanecer na fase estacionária, enquanto moléculas grandes são excluídas preferencialmente da fase estacionária. Ao penetrarem nos poros, as cadeias menores percorrem um caminho maior que as cadeias maiores. Ao final da coluna de separação cadeias de massa molecular maior serão eluídas primeiro, sendo seguidas pelas cadeias menores. Os detectores devem ter sensibilidade suficiente para determinação quantitativa das cadeias poliméricas. Eles podem ser do tipo refratométricos (IR) e espectrômetro de ultravioleta-visível (UV-VIS). Detectores refratométricos têm alta sensibilidade a variações de índice de refração, detectando a presença de cadeias poliméricas no fluxo mesmo quando estas estão muito diluídas. Apresentam como desvantagem a alta sensibilidade a variações na composição do solvente. O espectrômetro UV-VIS tem alta sensibilidade à presença de anéis benzênicos, ou seja, a cadeias poliméricas que possuem este anel em sua estrutura química. Este método é insensível a variações na composição do solvente [2].

A análise por GPC do polímero policaprolactona permitiu determinar os valores médios do peso molecular médio numérico ($\overline{M}_n$), do peso molecular médio ponderal ($\overline{M}_w$) e a distribuição de pesos moleculares ou polidispersividade ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$).

O peso molecular médio numérico ($\overline{M}_n$) é baseado no número de moléculas (N_i) da espécie i e do seu peso molecular (M_i).

O peso molecular médio ponderal baseia-se na fração em peso (w_i) das moléculas de um determinado peso molecular.

Os testes realizaram-se no Cromatógrafo Waters 244, equipado com detector de índice de refração, da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Nacional de Buenos Aires. Na análise de GPC, o solvente tetrahidrofurano (THF) foi utilizado como eluente. O volume de injeção da amostra foi de 50 μ L e velocidade de fluxo 1 mL/min. Foram utilizadas colunas Waters Ultrastyrigel 10³ Å (200 – 3000) – Waters Ultrastyrigel HR-1 100 Å (10 – 5000) colocadas em série. A curva de calibração foi determinada com padrões de poliestireno de massas molares 785, 1950, 5000 e 9075 g/mol.

Os pesos moleculares numérico ($\overline{M}_n$) e ponderal ($\overline{M}_w$) foram calculados por:

$$M_n = \frac{\sum h_i}{\sum \frac{h_i}{s(Mp/s)_i^t}} \quad M_w = \frac{E \sum h_i s(Mp/s)_i^t}{\sum h_i} \quad (5.1)$$

O termo $(M.p/s)_i$ representa o peso molecular do polímero padrão utilizado para a construção da curva de calibração. A altura do pico no cromatograma do polímero fracionado e o volume de eluição são representados por h_i e i , respectivamente. Os termos s e t são constantes experimentais, características do equipamento utilizado [3, 4, 5]. O índice de polidispersão (IP) é definido como:

$$IP = \frac{M_w}{M_n} \quad (5.2)$$

5.1.2 Ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN) e carbono ^{13}C -RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica que permite determinar propriedades de uma substância através do correlacionamento da energia absorvida contra a frequência, na região de radiofrequência (rf) do espectro eletromagnético. A frequência é regida pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um espectro de RMN é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades [6].

A ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN) foi efetuada em um espectrômetro Bruker AM-500 da Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Nacional de Buenos Aires. Uma alíquota da amostra do PCL* foi dissolvida em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e os grupos hidroxilas terminais foram esterificados com anidrido tricloroacético.

5.1.3 Análise térmica

As propriedades térmicas do polímero PCL* foi investigada utilizando-se a calorimetria exploratória diferencial (DSC). A técnica DSC é uma técnica de análise térmica na qual se mede a diferença de energia fornecida ou liberada por uma substância em relação a um material de referência, em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Quando as substâncias são aquecidas, ou resfriadas, várias transformações físicas ou químicas envolvendo absorção (processo endotérmico) ou

evolução de calor (processo exotérmico) podem ocorrer [1]. A forma, a posição e o número de picos endotérmicos e exotérmicos em função da temperatura, obtidos nas curvas de DSC podem ser utilizados para identificar uma substância, bem como verificar seu comportamento térmico em relação a amostras de mesma natureza. A técnica de DSC pode ser utilizada para determinação quantitativa da substância presente, pois o calor de reação é proporcional à quantidade de amostra. A técnica de DSC é utilizada para investigar propriedades térmicas de uma variedade de materiais, tais como materiais orgânicos, inorgânicos, biológicos e poliméricos. Dentre as aplicações pode-se citar: determinação qualitativa e quantitativa de transições de fase, por exemplo, transição vítrea, fusão de cristalização, estudo da cinética de polimerização, de decomposição e de cura [7].

A análise de DSC do polímero policaprolactona permitiu determinar as temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m) e o calor ou entalpia de fusão (ΔH_m). A amostra foi analisada sob atmosfera de nitrogênio (50 mL.min^{-1}), com velocidade de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ em um equipamento Perkin Elmer DSC 60, previamente calibrado com padrões de índio com cadinho de alumínio e tampa não hermética, alocado no laboratório de Tecnologia de Materiales do INTEMA/Mar Del Plata. O intervalo de temperaturas explorado foi de -120°C a 80°C . A amostra foi aquecida de -120°C até 80°C e em seguida resfriada rapidamente até -120°C . Atingido o equilíbrio térmico, a amostra foi submetida a novo aquecimento nas mesmas condições e novamente resfriada a -120°C . A temperatura de fusão (T_m) e calor ou entalpia de fusão (ΔH_m) foram determinadas no primeiro ciclo de aquecimento. A temperatura de transição vítrea (T_g) foi determinada somente no segundo aquecimento onde sua visualização foi mais clara. A temperatura de cristalização (T_c) e a entalpia de cristalização (ΔH_c) foram obtidas durante o resfriamento.

5.1.4 Espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR)

Átomos covalentemente ligados formando uma molécula não permanecem fixos um em relação ao outro, mas vibram ao redor de uma distância interatômica média. A energia absorvida, resultante da interação de um polímero com radiação eletromagnética de determinada energia, pode ser convertida em movimentos vibracionais e rotacionais, o que leva a variações nas distâncias interatômicas e nos ângulos das moléculas. A energia absorvida, associada com as vibrações de uma molécula ligada covalentemente pode ser descrita em termos de níveis de energia vibracionais discretos, sendo os diferentes níveis de energia vibracional dados por:

$$E = (n+1/2).h\nu \quad (5.3)$$

Os comprimentos de onda de radiação ($\lambda=c/\nu$) capazes de excitar uma molécula de um nível vibracional a outro incluem a região do infravermelho. As vibrações moleculares podem causar uma variação no momento de dipolo, se a absorção da radiação eletromagnética dentro da região do infravermelho está para ocorrer. Esta condição é conhecida como regra de seleção. A banda IR resultante é uma banda vibracional fundamental com uma intensidade proporcional ao quadrado da variação no momento de dipolo [8].

Na espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier (FT-IR), utiliza-se um interferômetro para coletar os dados, ao invés do monocromador usado nos espectrômetros dispersivos convencionais. As vantagens do espectrômetro FT-IR sobre os convencionais são uma melhora na razão sinal/ruído por unidade de tempo, um maior ganho de energia, maior velocidade e precisão no espectro obtido. A desvantagem é a necessidade de um computador para a análise do interferograma obtido.

Neste trabalho, a análise por FT-IR permitiu a análise da presença de grupos funcionais característicos do polímero PCL*. As análises dos filmes de PCL* realizaram-se no equipamento Perkin Elmer 1000 (FTIR) do laboratório de Materiais Cerâmicos da Escola de Engenharia – Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A faixa de análise foi de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , intervalo de 2 cm^{-1} .

5.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

5.2.1 Produção dos filmes de PCL*

Filmes de poli(ϵ -caprolactona) com arquitetura tipo estrela (PCL*) foram preparados pelo método *casting*, que consiste na evaporação do solvente de uma solução filmogênica aplicada sobre um suporte (Figura 5.3). O polímero foi solubilizado em clorofórmio (2 g/100 mL) e a solução resultante foi distribuída em placas de petri previamente siliconizadas, seguido da evaporação do solvente à temperatura de 25 °C e 1 MPa. A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro manual (Mitutoyo - São Paulo - SP). A espessura final foi fixada como sendo a média aritmética de cerca de 10 medidas aleatórias sobre a área do filme. Os filmes obtidos apresentaram espessura média igual a $32,8 \pm 1,5 \mu\text{m}$.

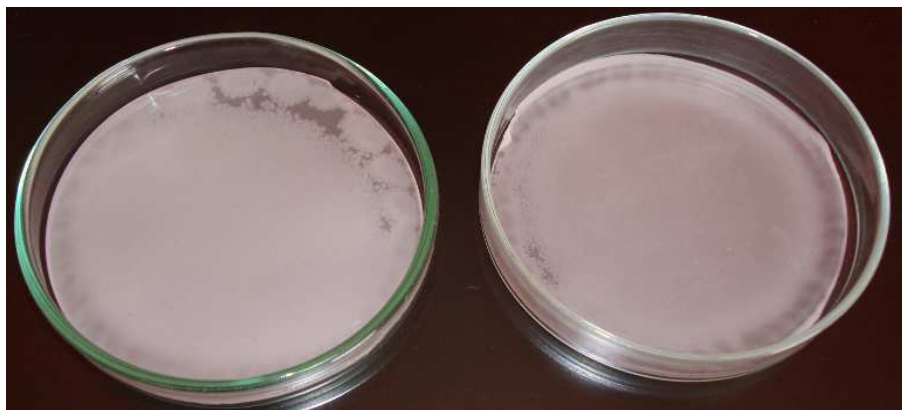


Figura 5.3 – Filmes de PCL* depositados sobre placa de Petri

5.2.2 Adsorção de proteínas séricas

As proteínas albumina de soro humano (HSA), fibrinogênio (HFb) e γ -globulina (γ -Glb) foram marcadas radioisotopicamente com ^{125}I no laboratório de radioisótopos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), conforme o método de Hunter-Grenwood modificado por Biscayart [9, 10]. Empregou-se 0,5-0,7 mCi (18,5-25,9 MBq) de radioisótopo, 20 μg de proteína em 30 μL de tampão fosfato (PBS) 0,05 M. A purificação da proteína marcada foi feita por filtração em gel Sephadex G-100 para o HSA e G 250 para o fibrinogênio. O coeficiente de distribuição de picos radioativos (K_D) permitiu a comprovação da pureza e identidade do marcado.

O estudo da adsorção de proteínas ocorreu após o contato das superfícies sintéticas com as proteínas marcadas radioisotopicamente em cubetas de PTFE. As superfícies sintéticas foram incubadas com as proteínas marcadas ($2,0 \times 10^{80}$ cpm.mL $^{-1}$) em solução PBS pH 7,4 a 37°C. A radioatividade das superfícies do PCL foram avaliadas em um contador gama (Beckman) para a determinação da concentração das proteínas adsorvidas em função do tempo.

5.2.3 Estudo da morfologia de filmes protéicos adsorvidos sobre PCL* por microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) é um tipo de técnica de microscopia de varredura muito usada para avaliar a superfície de biomateriais poliméricos [11] e macromoléculas biológicas [12].

A microscopia de força atômica (AFM) foi desenvolvida em 1986 por Binnig, Quate e Gebber, a partir de técnicas desenvolvidas e utilizadas na microscopia de tunelamento de elétrons (MTS) [13].

A AFM possibilita uma resolução tridimensional similar a MTS, porém pode ser utilizada diretamente em amostras de materiais eletricamente isolantes ou condutores.

A AFM tem despertado grande interesse nos últimos anos, devido às vantagens que possui quando comparada às microscopias eletrônicas de transmissão (MET) e varredura (MEV) [1]. Uma imagem tridimensional da superfície do biomaterial é gerada através da medida de forças de atração e repulsão entre a superfície da amostra e a ponta do cantilever que percorre a amostra. Obtêm-se uma alta resolução da topografia da superfície, com dimensões em escala nanométrica. As propriedades e dimensões do cantilever e da ponta, assim como o modo de operação selecionado são importantes na determinação da sensibilidade e resolução da imagem obtida. Uma grande vantagem da AFM quando comparada às microscopias eletrônicas é que os valores de rugosidade e a topografia da amostra são obtidos sem a necessidade de tratamento ou revestimento da amostra que podem danificar sua superfície, além de ser obtidas imagens em meio líquido, ar ou sob vácuo [14]. O ambiente de utilização do microscópio de força atômica deve ser protegido contra interferências de ruídos elétricos e vibrações mecânicas.

O princípio básico de funcionamento do microscópio de força atômica (AFM) é ilustrado na Figura 5.4.

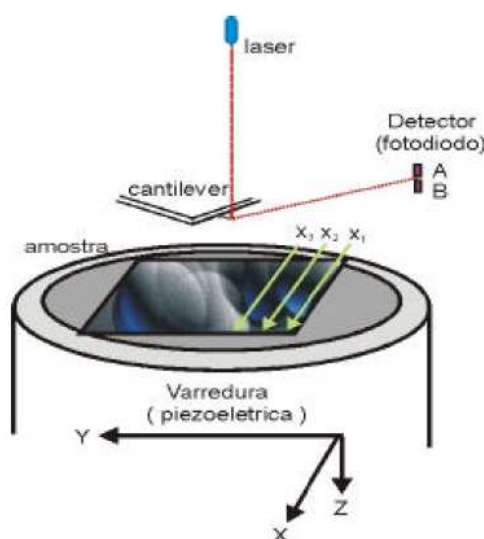


Figura 5.4 – Esquema básico do posicionamento da ponta de prova e de sua varredura sobre a superfície da amostra para a coleta de dados ponta a ponta da superfície.

O princípio de funcionamento da AFM consiste na varredura de uma ponta cristalina, de forma pontiaguda, sobre a amostra. Este cristal é ligado no vértice de uma micro-viga com

balanço em forma de “V”. A micro-viga possui uma constante elástica conhecida, e é flexionada pelas forças de atração e repulsão entre a amostra e a ponta, devido à variação vertical da superfície da amostra. A varredura é comandada através de um sistema piezoelétrico, com deslocamento nas posições x, y, z, com precisão de Angstrom, o que ocorre através da variação da tensão aplicada no mesmo. O deslocamento é controlado por um circuito de retroalimentação cuja função é manter a força constante (para obter informação da altura) ou altura constante (para obter a informação da força) acompanhando a superfície da amostra. Sobre o cristal é colocado um sensor de deflexão para registrar a variação vertical da superfície da amostra, que ocorre durante a varredura. As forças envolvidas são da ordem de grandeza de forças interatômicas (10^{-12} Newton). Com os dados da deflexão do cantilever nos eixos x, y e z, a imagem é construída por meio de um programa computacional adequado. A força estabelecida entre a ponta do cantilever e a amostra deve ser suficientemente pequena para não ocorrer danos à superfície da amostra durante o processo de varredura.

O microscópio de força atômica pode utilizar os modos de operação de contato, sem contato e vibracional. No modo de operação de contato a ponta do cantilever faz a varredura em contato com a superfície da amostra. A força na ponta do cantilever é repulsiva e tem valores médios em torno de 10^{-9} N. Esta força é ajustada empurrando a micro-viga de encontro à superfície da amostra através da cerâmica piezoelétrica. A deflexão da micro-viga é detectada e comparada pelo amplificador de retroalimentação DC a um valor de deflexão. Quando a deflexão medida é diferente do valor especificado, o amplificador de retroalimentação aplica uma tensão à cerâmica piezoelétrica, fazendo com que a amostra abaixe ou suba em relação à micro-viga, para restaurar o valor desejado da deflexão. Os maiores problemas no modo de operação contato são ocasionados pelas forças excessivas aplicadas pela ponta do cantilever na amostra. Dependendo da intensidade da força pode ocorrer a deformação da amostra, quebra da ponta do cantilever ou distorção dos resultados. Para minimizar estes problemas é utilizado o modo de operação sem contato. O modo de operação sem contato é usado em situações onde o contato da ponta do cantilever pode alterar a amostra. A ponta do cantilever é localizada em torno de 50 a 150 Å acima da superfície da amostra. Devido às forças de van der Waals a ponta do cantilever e a amostra sofrem interações e a imagem da superfície da amostra é construída sem o contato da ponta do cantilever com a superfície.

No modo de operação dinâmico ou vibracional a amplitude de oscilação da micro-viga é mantida constante pelo circuito de realimentação, de modo a não haver contato direto entre a ponta do cantilever e a amostra. A imagem é obtida através das variações de amortecimento

da vibração, induzidas pela interação da ponta e da amostra. O modo de operação vibracional tem mostrado ser de grande sucesso na caracterização de biomateriais poliméricos.

A camada protéica adsorvida ao filme de policaprolactona foi analisada por microscopia de força atômica (AFM), no equipamento Scanning Probe Microscope modelo SPM-9500 J3 – Shimadzu, do laboratório de Materiais Cerâmicos da Escola de Engenharia – Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da UFMG. As imagens foram obtidas no modo dinâmico, à temperatura ambiente. Utilizou-se cantilever de Silício, com constante elástica de mola de 22,5 – 37,1 N/m e frequência de ressonância de aproximadamente 300 KHz. A velocidade de varredura durante a leitura foi de 1 Hz.

As proteínas séricas albumina humana (HSA) e γ -globulina humana (γ -Glb) foram pesadas e solubilizadas em soro fisiológico (NaCl 0,9% (m/v), PBS pH 7,4) nas concentrações de 0,11 mM a 0,99 mM de HSA e 0,018 mM a 0,16 mM de γ -Glb.

A adsorção protéica foi efetuada após a imersão dos filmes (1 cm²) de PCL* obtidos nas respectivas soluções protéicas por 24 horas a 37°C. A proteína não adsorvida foi removida por lavagem com solução NaCl/ PBS pH 7,4. Em seguida, os filmes foram secos sob vácuo por 24 horas a 25°C.

5.2.4 Adesão de plaquetas

Os filmes de PCL* foram colocados separadamente nos poços da placa de Elisa e o ensaio de adesão plaquetária foi efetuado após o contato das superfícies dos filmes com plaquetas marcadas com ⁵¹Cr.

Para o ensaio de adesão plaquetária, os poços das placas de Elisa foram preenchidos com 300 μ L tampão de Hepes-Tyrode por 1 hora à 37°C. Após a remoção do tampão, o PRP, contendo as plaquetas marcadas com ⁵¹Cr foi adicionado através de uma bomba peristáltica e mantido em condições de fluxo por até 4 horas. Os poços da placa de Elisa foram lavados em seguida com a solução tampão de Hepes-Tyrode contendo solução MgCl₂, 1mM. A radioatividade das placas foi medida em um contador gama. Os resultados foram expressos como a média de 5 experimentos.

Para observação do processo de adesão e agregação plaquetária nas superfícies dos filmes de PCL* após contato com o PRP, os filmes foram desidratados em etanol e secos em atmosfera de CO₂ (ponto crítico) e após revestimento com ouro, foram observados ao microscópio eletrônico de varredura (MEV Phillips XL30).

5.2.5 Formação de trombos

A formação de trombos nas superfícies dos filmes do PCL* foi estudada de acordo com a técnica desenvolvida inicialmente por Imae e Nose [15]. Sangue humano fresco (4 ml) com anticoagulante foi preparado com 1 ml de solução de ACD (Citrato/Dextrose-anticoagulante que impede a hemólise dos glóbulos vermelhos) e mantido refrigerado no decorrer do ensaio. Os filmes de PCL* foram colocados em uma placa de petri tampada, contendo no interior um papel de filtro umedecido e, mantida em estufa a 37°C por 15 minutos. Após este tempo, 15 μL do sangue preparado com a solução de ACD foi colocado sobre toda a área do filme (4 cm^2) e a reação de coagulação foi iniciada pela adição de 20 μL de CaCl_2 a 3,8%. A mistura do sangue e CaCl_2 foi feita no momento da adição deste com a própria micropipeta. Após um determinado intervalo de tempo, a reação foi interrompida com a adição de água destilada (5-10 μL). As superfícies testadas foram mantidas por 5 minutos em solução de formaldeído a 37% para a fixação dos trombos. O sistema membrana polimérica/trombos foi seco sob vácuo à temperatura ambiente (27 °C) até peso constante. A quantidade de trombos formado na superfície foi avaliada gravimetricamente através da equação:

$$\text{Trombos (\%)} = \frac{W_t}{W} \cdot 100 \quad (5.4)$$

sendo W_t o peso do trombos formados no vidro após 60 minutos (referência da coagulação total) e W representa o peso dos trombos formados nos filmes poliméricos após um certo tempo de reação.

5.2.6 Citotoxicidade

Ensaio de toxicidade celular sempre foram entre os métodos de bioensaio os primeiros a serem realizados para prever a toxicidade de substâncias a vários tecidos. A sua principal vantagem em relação aos ensaios tradicionais de toxicidade *in vivo* em camundongos, é uma resposta mais simples, sensível, econômica e homogênea.

O ensaio fundamenta-se no procedimento originalmente desenvolvido por Borefreund e Puerner (1984) para a triagem de agentes citotóxicos, em geral, sobre uma monocamada de células. O método é baseado na avaliação quantitativa de células viáveis após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital do composto tetrazólio MTS e um agente acoplador de elétrons PMS. O MTS é biorreduzido pelas células ao produto formazan que é solúvel no meio de cultura e então é efetuada uma análise colorimétrica da coloração

incorporada (Figura 5.5). A quantidade de MTS, o marcador da viabilidade celular, incorporada pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. A amostra testada que induz a toxicidade celular é medida em um intervalo de concentrações do extrato do biomaterial, e a concentração que produzir uma redução de 50% na absorção de MTS é tomado como o parâmetro de citotoxicidade.

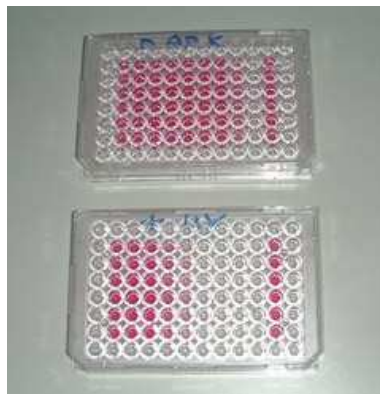


Figura 5.5 – Placas de Elisa ilustrando o ensaio de citotoxicidade. A intensidade da cor é proporcional ao número de células viáveis.

O ensaio de citotoxicidade de biomateriais é efetuado conforme a ISO 10.993- parte 5 que recomenda uma linhagem celular estabelecida de mamíferos que é obtida de um repositório reconhecido como: American Type Culture Collection (ATCC). É utilizada nesse ensaio uma cultura de células de ovário de hamster chinês (ATCC CHO K1).

Neste trabalho, uma cultura de CHO em monocamada é separada por tripsinização. A suspensão celular é centrifugada e o precipitado ressuspensionado em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), após lavagem com PBS estéril. Uma microplaca de cultura celular de 96 poços é preparada a partir da adição de diluições crescentes do extrato do biomaterial (50µL/poço, 4 poços/diluição), em seguida, a placa é equilibrada a 37° C numa atmosfera úmida de 5% de CO₂, enquanto se efetua a tripsinização das células para o ensaio. Em seguida, pipeta-se 50µL da suspensão celular (~3000 células) nos poços. O volume total em cada poço deve ser de 100µL. Colunas controle de 4 poços são preparadas com o meio sem a colocação das células (branco) e meio, ao invés de extrato, com as células (controle negativo=100%). Posteriormente, a microplaca é incubada sob atmosfera úmida de CO₂. Após 72 h, 20 µL de uma mistura (20:1) de MTS a 0,2% e PMS a 0,09% em PBS é adicionada aos poços teste e deixa-se incubando por 2 horas. A incorporação do corante será medida por meio de um leitor de microplacas a 490 nm contra o branco. A citotoxicidade (IC_{50%}) é estimada pela curva de interpolação, como a concentração do extrato do biomaterial resultante

da inibição de 50% da incorporação do MTS, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação à concentração dos extratos a partir do gráfico [21, 22].

5.2.7 Estudo da degradação enzimática de filmes de PCL*

O polímero policaprolactona (PCL) passa por dois estágios de degradação: a clivagem hidrolítica da porção éster da molécula e a perda de massa através da difusão de espécies oligoméricas [16, 17]. Após exposição aos fluidos aquosos corporais, ocorre a hidratação das moléculas de PCL e inicia-se a hidrólise das ligações ésteres originando produtos na forma de oligômeros. A degradação prossegue por processos biologicamente ativos ou pela clivagem hidrolítica passiva [17, 18].

O PCL e outros poliésteres podem ser degradados por hidrólise enzimática e/ou química. Diferentemente de outros poliésteres, a massa molar do PCL diminui rapidamente durante a degradação. Esta diminuição é acompanhada cromatograficamente por um alargamento na distribuição da massa molar e pelo aparecimento de picos de baixa massa molar [19].

Neste trabalho foi realizado o ensaio de biodegradação enzimática após incubação do PCL em solução fisiológica contendo as hidrolases lipase de *Pseudomonas cepacia* (E.C. 3.1.1.3, 50 U/mg, *Sigma-Aldrich*) e colesterol esterase de *Pseudomonas fluorescens* (E.C. 3.1.1.1, 200.000 U/g, *Sigma-Aldrich*). A biodegradação enzimática do PCL* foi monitorada turbidimetricamente a partir das emulsões não-iônicas obtidas a partir do PCL e PCL*. As duas formulações foram preparadas em triplicata, e suas composições estão descritas na Tabela 5.1.

Inicialmente 2 g de PCL* (ou PCL) foram dissolvidos em 50 mL de clorofórmio sendo esta fase denominada de fase oleosa. A 50 mL de água destilada foi adicionado 1,0 g de um éster fosfórico sintetizado em nossos laboratórios a partir do óleo de soja epoxidado. Esta segunda fase foi denominada de fase aquosa. Uma micro-emulsão com tamanho de partículas de PCL* inferior a 1 micron foi preparada utilizando-se o processo de emulsificação ultrasônica (Hielscher UP 50H) após verter-se a fase oleosa sob a fase aquosa. A micro-emulsão obtida foi mantida sob agitação a 1200 rpm por 6 h até total evaporação do clorofórmio. Adicionou-se em seguida as enzimas à micro-emulsão nas proporções Lipase PS/PCL* = 0,3 e Colesterol Esterase/PCL*=0,5.

A densidades óticas das micro-emulsões foram monitoradas a 37°C em cubeta de 1 mL em espectrofotômetro UV/Vis Varian Cary 50 utilizando o comprimento de onda de 650 nm [20]. As micro-emulsões foram continuamente agitadas a 100 rpm e mantidas a 37 °C durante

todo o experimento. A densidade ótica é definida pelo logaritmo decimal do quociente entre a intensidade da luz incidente e a intensidade da luz emergente.

Tabela 5.1 – Componentes das formulações das emulsões de PCL e PCL*

Componentes	Emulsão PCL (p/v)	Emulsão PCL* (p/v)
PCL	2,0	---
PCL*	---	2,0
Éster fosfórico não iônico	1,0	1,0
Clorofórmio	50	50
Água destilada q.s.p	100	100

5.3 Referências Bibliográficas

- 1 – CANEVAROLO JR. S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 1 ed. São Paulo: Artliber, 2004. 448 p.
- 2 – CANEVAROLO JR. S. V. **Ciência dos Polímeros**. 1 ed. São Paulo: Artliber, 2002. 183 p.
- 3 – DE ALMEIDA K. A., QUEIROZ A. A. A. **Key Engin. Mat.**, v. 16, p. 589 – 592, 2004.
- 4 – GILCHRIST, T. L. **Heterocyclic Chemistry**, 2nd Ed., Longman Scientific: London, 1992, p. 22.
- 5 – CIAPETTI G.; AMBROSIO L.; SAVARINO L.; GRANCHI D.; CENNI E.; BALDINI N.; PAGANI S.; GUIZARDI S.; CAUSA F.; GIUNTI A. **Biomat.**, v. 24, p. 3815 - 3824, 2003.
- 6 – SILVERSTEIN R. M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE D. J. Tradução Alencastro R. B. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.
- 7 – Disponível em <<http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/2/7070.pdf>>. Acesso em 04 agosto 2008.
- 8 – HAGNANI A. Surface infrared spectroscopy (ATR/FT-IR) of biomaterials. In: 5th European School on Biomaterials. Proceedings of the final research co-ordination meeting on held in Siena, 20th-23rd April, 1993. Siena, 1993.
- 9 – MOROI M.; OKUMA M.; JUNG SM. Platelet adhesion to collagen-coated wells: Analysis of this complex process and a comparison with the adhesion to matrigel-coated wells. **Biochim. Biophys. Acta**, 1137(1): 1- 9, 1992.
- 10 – BARTOLI P. **Efeitos da radiação sobre as atividades biológica, imunológica, de ligação a receptores e propriedades físico-químicas do hormônio de crescimento**

humano. Tese de doutorado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 1984.

11 – MERRETT K.; CORNELIUS R. M.; MCCLUNG W. G.; UNSWORTH L. D.; SHEARDOWN H. Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials. **J. Biom. Sci. Polymer Edn.**, 13 (6): 593 – 621, 2002.

12 – KIENBERGER F.; L. T. COSTA; ZHU R.; KADA G.; REITHMAYER M.; CHTCHEGLOVA L.; RANKL C.; PACHECO A. B. F.; THALHAMMER S.; PASTUSHENKO V.; HECKL W. M.; BLAAS D.; HINTERDORFER P. Dynamic force microscopy imaging of plasmid DNA and viral RNA. **Biomaterials**, 28 (15): 2403 - 2411, 2007.

13 – BINNIG G.; QUATE C. F.; GERBER C. H. Atomic force microscope. **Phys. Rev. Lett.**, v.56, p. 930, 1986.

14 – MISSIRLIS Y. F.; TSAPIKOUNI T. S. Protein-material interactions: From micro-to-nano scale. **Materials Sci. Engin.**, p. 1- 6, 2008.

15 – IMAI Y., NOSE Y. A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials. **J. Biomed. Mater.Res.**, 6: 165 - 172, 1972.

16 – KWEON H. Y.; YOO M. K.; PARK I. K.; KIM T. H.; LEE H. C.; LEE H-S; OH J-S; AKAIKE T.; CHO C-S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**, 24 (5): 801 - 808, 2003.

17 – REZWAN K.; CHEN Q. Z.; BLAKER J. J.; BOCCACCINI A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, 27 (18): 3413 -3431, 2006.

18 – BARBANTI S. H.; ZAVAGLIA C. A. C.; DUEK E. A. R. Bioresorbable Polymers in Tissue Engineering. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 15 (1): 13 - 21, 2005.

19 – ELDSATER C.; A. C. KARLSSON et al. The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly (ϵ -caprolactone). **Polymer**, 41: 1297-1304, 2000.

20 – JAGER K-E; STEINBUCHER A; JENDROSSEK D. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61: 3113 – 3118, 1995.

21 – DA SILVA, A. R. P. **Estudo das propriedades bioquímicas de sistemas poliméricos arborescentes PGDL-AAS para o tratamento do câncer.** 2008.142 f. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2008.

22 – ISO 10993: 1992, **Biological, evaluation of medical devices - Part 5 - Tests for cytotoxicity: in vitro methods.**

6. Resultados e Discussões

6.0 Caracterização Físico-Química

6.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Nos últimos anos, o polímero biorreabsorvível poli (ϵ -caprolactona) (PCL) ganhou uma importância significativa na medicina, sendo utilizado em um vasto campo de aplicações clínicas. A grande vantagem desse polímero está na sua forma de degradação, que ocorre por hidrólise de suas ligações ésteres, sendo os produtos gerados completamente absorvidos pelo organismo.

Entre os métodos modernos para a caracterização de polímeros, a cromatografia de permeação em Gel (GPC) ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade para determinar as massas molares médias e a distribuição de massas molares. Várias propriedades dos polímeros que são importantes em termos de sua processabilidade e aplicações estão diretamente relacionadas com os pesos moleculares específicos. Isto ocorre porque as propriedades mecânicas, químicas e de biorreabsorção e biodegradabilidade são drasticamente afetadas pelo peso molecular do polímero.

A Figura 6.1 ilustra a análise por GPC do polímero PCL*. De acordo com os valores de peso molecular médio numérico ($\bar{M}_n$) e o peso molecular médio ponderal ($\bar{M}_w$), observa-se que o PCL* apresenta uma faixa de distribuição unimodal, ou seja, um pico de distribuição de pesos moleculares, com índice de polidispersão ($IP = \bar{M}_w / \bar{M}_n$) igual a 1,53. O peso molecular médio numérico ($\bar{M}_n$) foi de 5430 g/mol e o peso molecular médio ponderal ($\bar{M}_w$) foi de 8280 g/mol; levando-se em consideração a curva de calibração. Como pode ser observado, os valores de massa molar, para as sínteses de PCL* foram da ordem de 10^3 g/mol, o que o caracteriza como um polímero de baixo peso molecular.

Polímeros de baixo peso molecular são particularmente atraentes para a indústria farmacêutica uma vez que podem ser utilizados no projeto de sistemas transportadores de fármacos. No caso de polímeros hidrofóbicos a exemplo do PCL*, o baixo peso molecular deverá propiciar uma maior cinética de biodegradação relativamente ao polímero PCL linear e de peso molecular mais elevado. Esta propriedade poderá ser interessante para o projeto de novos sistemas para a liberação controlada de fármacos ou matriz com elevada cinética de biodegradação para a engenharia de tecidos biológicos.

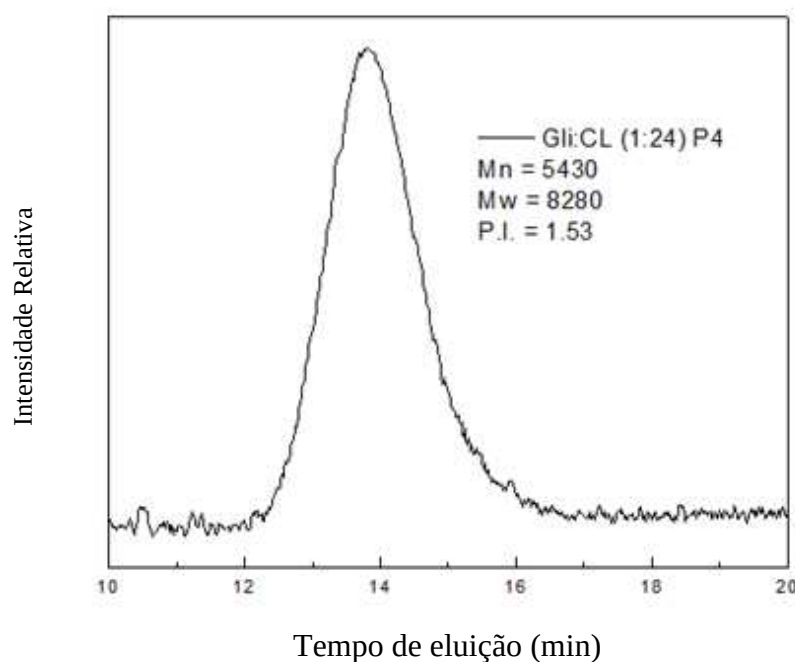


Figura 6.1 – Análise de GPC do polímero PCL*

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual pode contribuir significativamente para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação, freqüentemente descritos na literatura como “drug delivery systems”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional tais como: a) maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz; b) diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação sanguínea; c) natureza e composição dos veículos variada não havendo predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco; d) administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses) e e) vetorização a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas.

As novas estratégias para o preparo de sistemas de liberação controlada para usos clínicos incluem aplicações importantes da ciência de polímeros, nas suas mais variadas formas (emulsões múltiplas e inversas, micro e nanoesferas, lipossomas, micro e nanopartículas biodegradáveis, micro e nanocápsulas).

No caso do PCL (linear), várias aplicações têm sido desenvolvidas para o preparo de sistemas de liberação prolongada baseadas em micro e nanoesferas [1, 2, 3], membranas [4] e mais recentemente nanofibras [5, 6, 11]. As aplicações incluem desde o desenvolvimento de

sistemas de liberação controlada para o tratamento do câncer [7, 12] até materiais biodegradáveis utilizados no projeto de sistemas para utilização na engenharia de tecidos biológicos [8].

Na engenharia de tecidos biológicos polímeros biodegradáveis são utilizados como suportes para o crescimento de células, proporcionando assim a reparação de um tecido ou órgão lesado [9]. Polímeros biodegradáveis utilizados na confecção de implantes devem ser bioinertes, apresentar boas características mecânicas, inocuidade, biocompatibilidade, estabilidade, facilidade de processamento e cinética de biodegradação adequada. Os subprodutos de degradação destes polímeros devem ser toxicologicamente seguros, sendo eliminados por alguma via metabólica [8, 10, 11].

A degradação dos polímeros biorreabsorvíveis é dependente de fatores como o peso molecular, cristalinidade, composição química, solitação mecânica, morfologia (porosidade e geometria do suporte polimérico) e a rugosidade da superfície [13, 14].

6.2 Ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN)

A Figura 6.2 apresenta a estrutura do PCL* contendo 3 braços (PCL triol). Os grupos metilenos da caprolactona adjacentes à hidroxila esterificada com anidrido trifluoroacético foram chamados de **c'**. Os grupos metilenos adjacentes ao grupo éster do monômero foram designados pela letra **c**. Os grupos metilenos do glicerol correspondem à letra **b** e o grupo metino do glicerol corresponde à letra **a**.

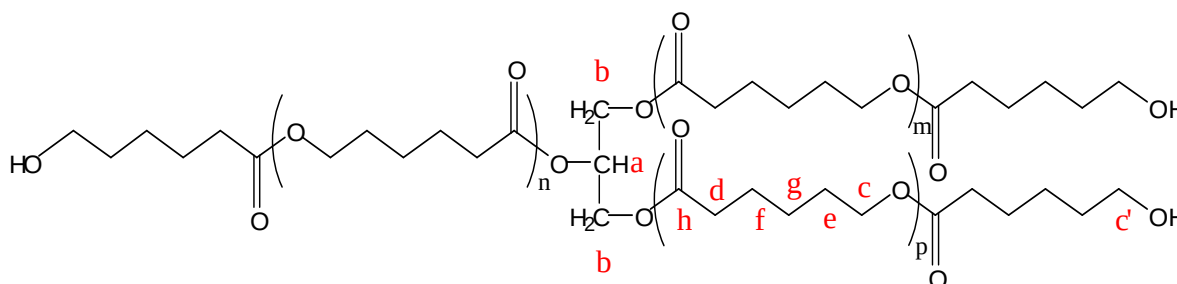
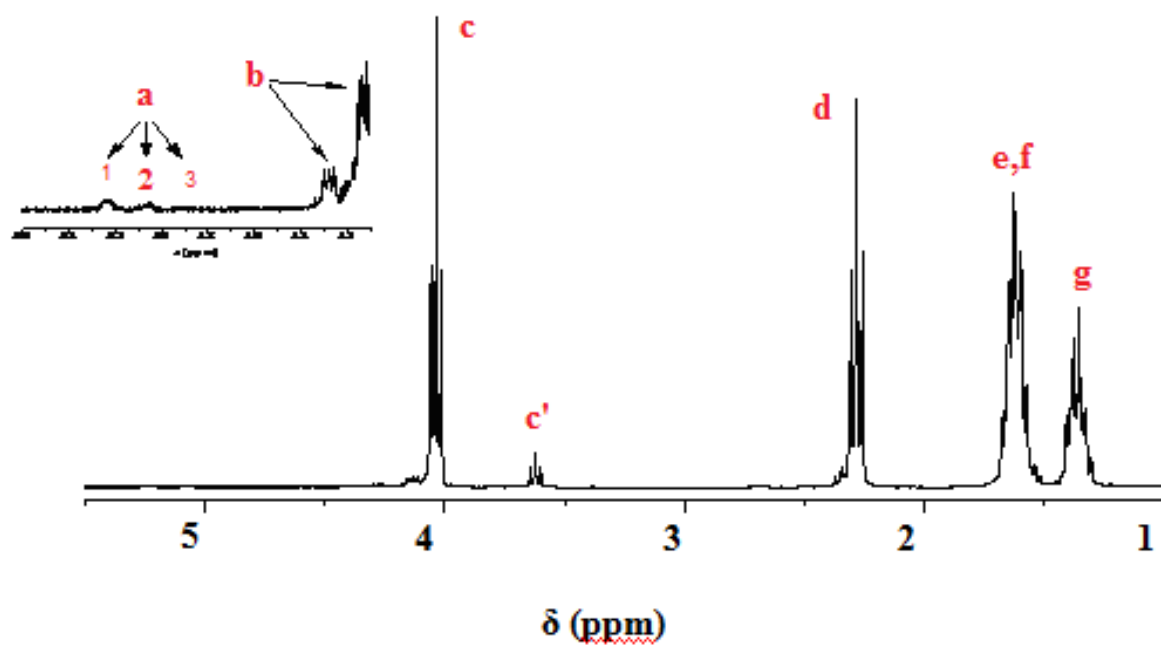


Figura 6.2 – Estrutura do PCL triol

As Figuras 6.3A, 6.3B e 6.4 apresentam os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C para o poliéster esterificado com anidrido trifluoroacético e seus sinais correspondentes. As Figuras 6.3A e B mostram os sinais de ^1H -RMN e as atribuições dos hidrogênios da ligação do

glicerol aos monômeros do PCL. O pico **a** representa um tripleto referente à ligação da hidroxila do grupo metino do glicerol ao grupo éster do monômero ϵ -CL e o sinal **b** representa um duplo dubleto referente à ligação da hidroxila dos grupos metilenos do glicerol ao grupo éster do monômero ϵ -CL, confirmando assim a estrutura com topologia estrela do polímero obtido. O sinal **c'** é um tripleto correspondente aos hidrogênios dos grupos metilenos vizinhos às hidroxilas esterificadas com anidrido trifluoroacético. O sinal **c** é um tripleto referente aos hidrogênios dos grupos metilenos adjacentes aos oxigênios do grupo éster. Os picos **e** e **f** são equivalentes e estão sobrepostos, são quartetos e representam os hidrogênios dos grupos metilenos vizinhos aos hidrogênios de dois grupos metilenos. O pico **d** é um tripleto e representa os hidrogênios do grupo metileno vizinhos aos hidrogênios de outro grupo metileno. O sinal dos hidrogênios **g** é de um grupo metileno vizinho aos hidrogênios de dois grupos metilenos sendo um quarteto.

(A)



(B)

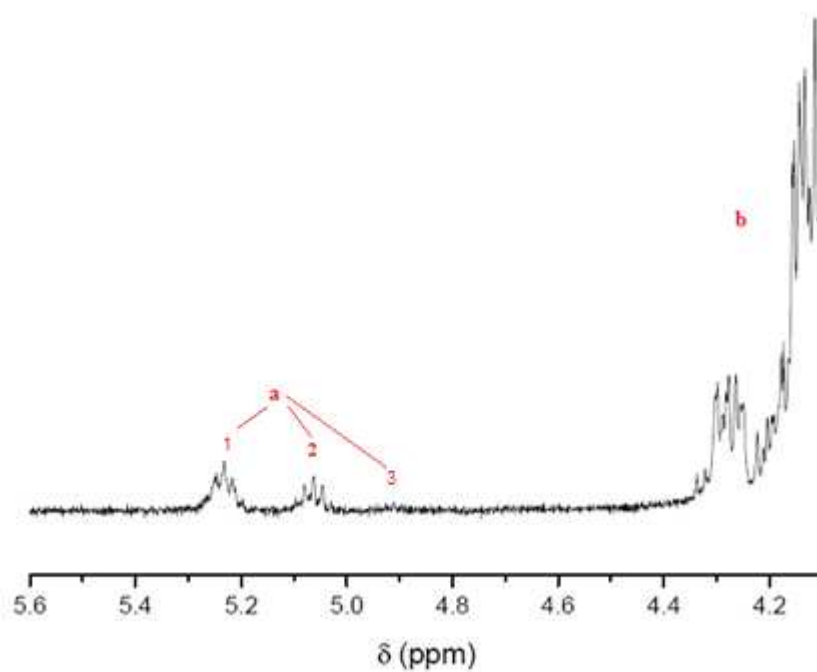


Figura 6.3 – Espectro de ^1H -RMN (A) e sinais a e b (B) de PCL*

A Figura 6.4 apresenta o espectro de ^{13}C -RMN do PCL e as atribuições dos carbonos da cadeia polimérica. O sinal **h** em 175 ppm corresponde a carbonila do grupo éster do monômero ε -CL. Os picos **a** e **b** correspondem aos carbonos do glicerol que fazem a ligação com o grupo éster do monômero. O pico **c** corresponde ao carbono do grupo metileno que se liga ao oxigênio na cadeia do monômero. O pico **d** representa o carbono do grupo metileno do monômero que está ligado ao oxigênio do grupo éster. Os picos **e**, **f**, **g** são carbonos dos grupos metilenos da cadeia do monômero.

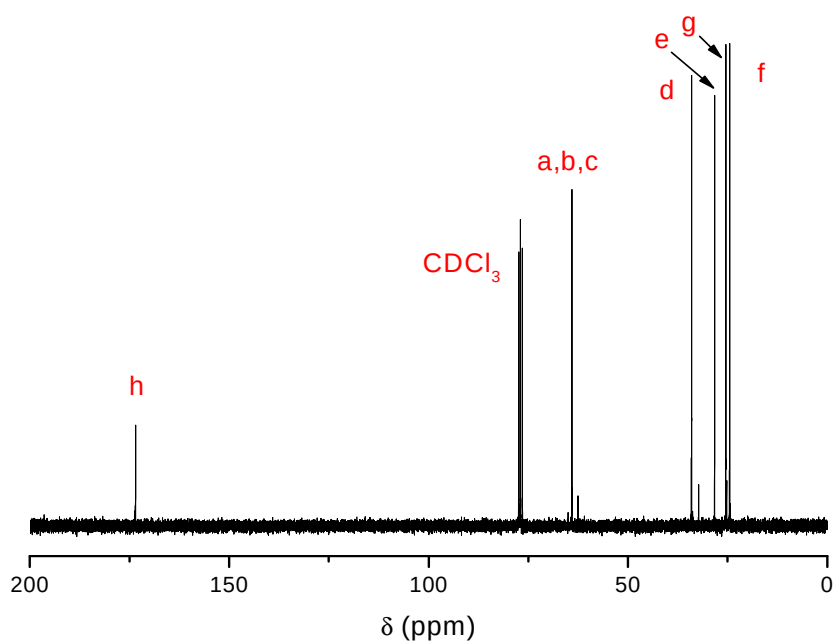


Figura 6.4 – Espectro de ^{13}C -RMN do PCL*

Os sinais de ^1H -RMN dos hidrogênios Ha e Hb são fortemente afetados pelo peso molecular médio numérico (Mn), isto é, pela relação entre ε -CL:glicerol. A partir dos sinais de Ha pode-se determinar o grau de substituição do glicerol:

Tabela 6.1 – Grau de substituição do glicerol a partir do peso molecular médio numérico:

Pico	De (ppm)	Até (ppm)	Valor da integração	Porcentagem da substituição
1	5,32	5,16	2258086	68,80
2	5,14	5,02	1023912	31,20
3	4,96	4,86	0	0

Para obter as porcentagens de glicerol tri, di e monossustituído divide-se o valor da integração de cada pico pela soma das integrações dos três picos:

$$\text{Glicerol trissustituído (\%)} = \frac{1}{1+2+3} \times 100 = \frac{2258086}{3281998} \times 100 = 68,80\%$$

$$\text{Glicerol 1,3 dissustituído (\%)} = \frac{2}{1+2+3} \times 100 = \frac{1023912}{3281998} \times 100 = 31,20\%$$

$$\text{Glicerol monossustituído (\%)} = \frac{3}{1+2+3} \times 100 = \frac{0}{3281998} \times 100 = 0\%$$

O resultado indica que 68,80% do glicerol encontra-se trissustituído, 31,20% dissustituído, enquanto não existem espécies monossustituídas. A partir deste valor pode-se calcular a funcionalidade efetiva (f) do glicerol:

$$f = \text{funcionalidade efetiva} = 3 \times 0,6880 + 2 \times 0,3120 = 2,7$$

Assim, pode-se dizer que 89,60% dos grupos hidroxila do glicerol reagiram com o monômero ϵ -CL.

Considerando os sinais dos hidrogênios Hc e Hc' obtém-se um valor médio de unidades de caprolactona (ϵ -CL) por braço da cadeia polimérica:

Tabela 6.2 – Valor médio de unidades de caprolactona (ϵ -CL) por braço da cadeia polimérica

Pico	De (ppm)	Até (ppm)	Valor da integração
c	4,12	4,01	448457024
c'	3,70	3,60	37007688

O comprimento médio (Ln) da cadeia de PCL pode ser calculado da seguinte maneira:

$$Ln = \frac{c + c'}{c'} = 13,1$$

Assim, há uma média de 13,1 unidades de ϵ -CL por cadeia.

O valor do peso molecular médio numérico (M_n) do PCL pode ser obtido a partir de:

$$M_n = MM_{\text{glicerol}} + f \times L_n \times MM_{\varepsilon\text{-CL}}$$

$$M_n = 92 \text{ g/mol} + (2,7 \times 13,1 \times 114 \text{ g/mol}) = 4.124,18 \text{ g/mol}$$

O valor de L_n também pode ser determinado a partir do espectro de ^{13}C -RMN:

$$L_n = \frac{c + c'}{c'} = 17,1$$

Tabela 6.3 – Cálculo do valor de L_n

Pico	De (ppm)	Até (ppm)	Valor da integração
c	173,60	173,49	1594825984
c'	173,73	173,70	99292760

A partir das análises anteriores se determina que o comprimento médio é 17,1. Contudo, o erro cometido nesta análise não pode ser desprezado, devido à baixa intensidade dos picos integrados no espectro de ^{13}C -RMN. Logo:

$$M_n = 92 \text{ g/mol} + (2,7 \times 17,1 \times 114 \text{ g/mol}) = 5.355,38 \text{ g/mol}$$

Na Tabela 6.4 são mostradas as condições de reação, relação molar, solvente utilizado, rendimento, funcionalidade teórica e efetiva, comprimento médio da cadeia de PCL triol. A funcionalidade efetiva do iniciador da reação e o comprimento médio da cadeia de PCL triol foram determinados por ^1H -RMN.

Tabela 6.4 – Condições de reação para obtenção do PCL triol

Reagentes	f ^a	Relação (ε-CL:OH)	Rendimento	f ^b	Ln _{PCL} ^c
ε-CL + glicerol	3	8:1	90,84%	2,7	13,1

^a Funcionalidade teórica conforme número de grupos hidroxila do iniciador. ^b Funcionalidade efetiva determinada por ¹H-RMN. ^c Comprimento médio da cadeia de PCL determinada por ¹H-RMN (comparando as integrações 4.1 e 3.6 ppm).

Através das caracterizações por ¹H-RMN e ¹³C-RMN, pode-se afirmar que a síntese do PCL* foi bem sucedida e que o polímero obtido apresenta estrutura do tipo estrela.

6.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Considerando o projeto de sistemas transportadores de substâncias bioativas, a farmacotécnica exige que muitos processos de produção como a granulação via extrusão por fusão a quente (onde o polímero é fundido e funciona como um ligante e/ou agente retardador da liberação do fármaco), os polímeros que serão selecionados devem possibilitar o processo em temperaturas relativamente baixas em virtude da sensibilidade térmica de muitos fármacos. Isso significa que o polímero utilizado deve apresentar uma baixa temperatura de transição vítrea.

A transição vítrea (T_g) é um importante efeito térmico que pode ser utilizado para a caracterização de polímeros amorfos ou semicristalinos. A T_g é a propriedade do material onde se pode obter a temperatura da passagem do estado vítreo para um estado “maleável” ou “borrachoso”, sem ocorrência de uma mudança estrutural. A parte amorfa do material (parte onde as cadeias moleculares estão desordenadas) é a responsável pela caracterização da temperatura de transição vítrea. Abaixo da T_g , o material não tem energia interna suficiente para permitir deslocamento de uma cadeia com relação à outra por mudanças conformacionais. Portanto, quanto mais cristalino for o polímero, menor será a representatividade da T_g . Na temperatura de transição vítrea, em um resfriamento, o polímero passa de um líquido super-resfriado ou um estado “borrachoso” para um estado sólido. A T_g também ocorre no sentido inverso, no aquecimento. No estado líquido, as moléculas podem se mover umas em relação às outras, ocorrendo então os chamados rearranjos cooperativos.

No estado vítreo, os arranjos cooperativos estão “congelados” e acontecem a uma determinada taxa e, por esta razão, têm uma frequência característica. As frequências dos rearranjos é função da temperatura, sendo baixa às temperaturas mais baixas, isto é, os

rearranjos ocorrem mais lentamente. A T_g será maior quando todo e qualquer fator possa levar a um aumento das forças intermoleculares secundárias e à rigidez da cadeia. A Figura 6.5 ilustra o significado físico da T_g .

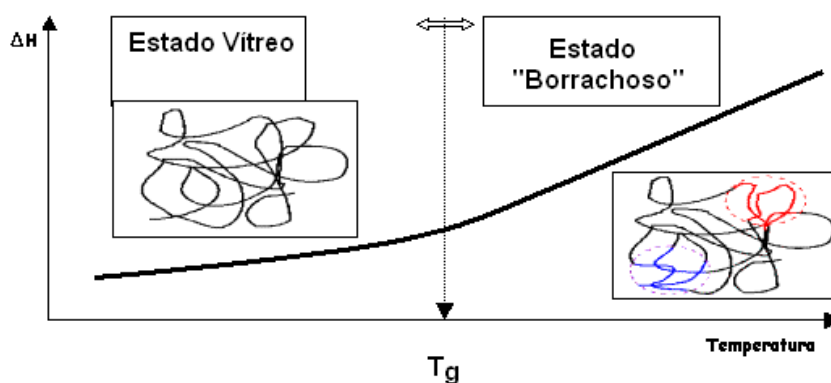


Figura 6.5 – Ilustração do significado físico da temperatura de transição vítrea (T_g)

Considerando a estrutura do polímero, alguns dos fatores que exercem influência na T_g são a rigidez e a flexibilidade da cadeia principal, a presença de grupos polares, existência de grupos laterais, simetria, peso molecular, e a existência de ramificações [14]. A transição vítrea é um fenômeno complexo apesar de estar sendo estudada desde a década de 30. Estes estudos se baseiam em teorias diferentes, em muitos casos antagônicos, sendo que o fenômeno ainda não é completamente entendido do ponto de vista teórico [15].

A transição vítrea se reflete macroscopicamente através de mudanças em vários tipos de propriedades, como por exemplo, capacidade calorífica, coeficiente de expansividade térmica, resposta a forças de compressão ou expansão entre outras. Neste caso, métodos termoanalíticos como a calorimetria exploratória diferencial (DSC) fornece informações sobre os efeitos térmicos que são caracterizados por uma mudança no calor específico (ou entálpico) em função da temperatura tais como o comportamento de fusão, cristalização, transições sólido-sólido e consequentemente a temperatura de transição vítrea.

As Figuras 6.6 e 6.7 ilustram as curvas de DSC para o polímero PCL* sintetizado neste trabalho. A Figura 6.6 mostra o calor de fusão (ΔH_m) e a temperatura de fusão cristalina (T_m) obtidas no primeiro ciclo de aquecimento. A temperatura de fusão obtida, $T_m = 57,3^\circ\text{C}$ apresenta boa concordância com os valores de temperatura de fusão descritos na literatura para a poli (ϵ -caprolactona) [4, 16].

A Figura 6.7 mostra o valor da temperatura de transição vítrea para o PCL*. A baixa temperatura de transição vítrea observada ($T_g = -64,3^\circ\text{C}$) indica que o PCL* é um polímero muito maleável à temperatura ambiente e fisiológica (37°C) [17]. Devido às suas características elásticas o PCL* é um polímero que deverá possuir uma elevada permeabilidade aos fluídos fisiológicos na temperatura corpórea sendo adequado para o projeto de dispositivos de liberação controlada de fármacos [18].

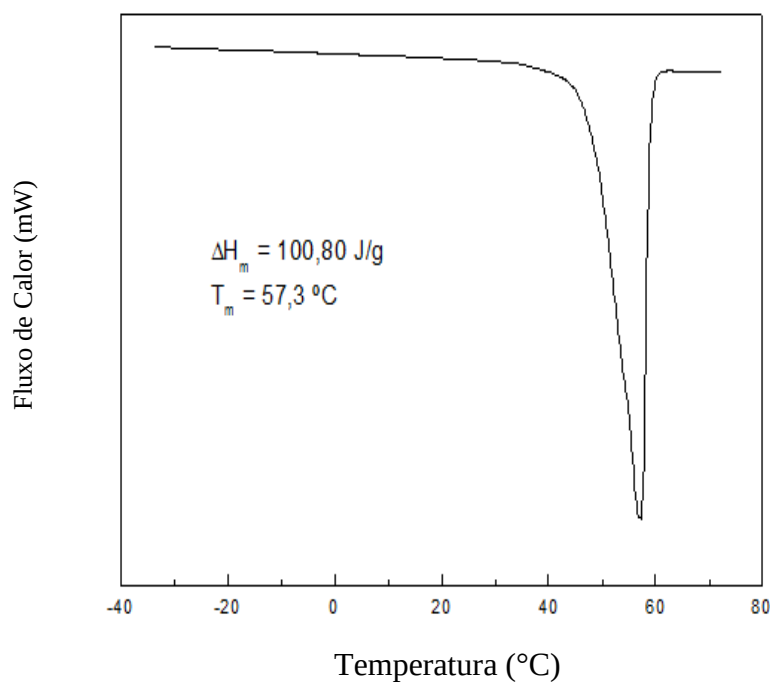


Figura 6.6 – Curva DSC do PCL* ilustrando a temperatura de fusão cristalina.

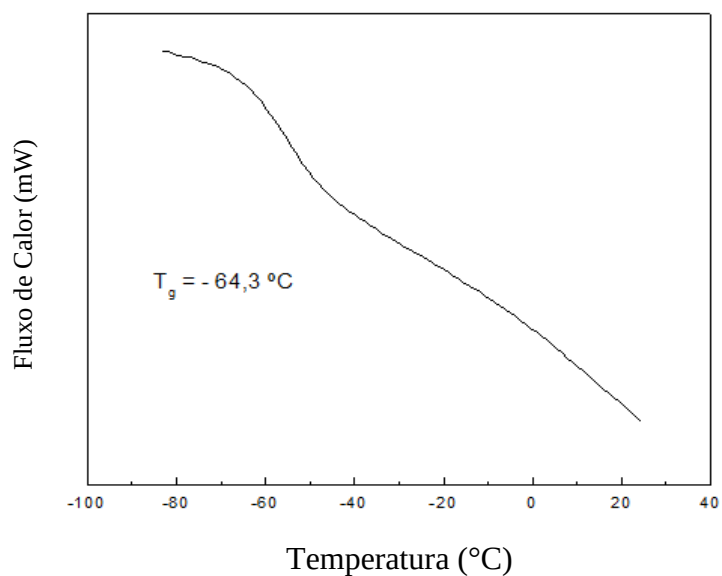


Figura 6.7 – Curva DSC do PCL* ilustrando a temperatura de transição vítrea (T_g)

Considerando o projeto de sistemas de liberação controlada de fármacos, a liberação do princípio bioativo incorporado em sistemas constituídos por polímeros hidrofílicos baseia-se na transição do estado vítreo (estado configuracional altamente emaranhado) para o estado maleável, associado a um processo de inchamento (ou intumescimento) resultante da penetração de água na matriz polimérica. A temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros hidrofílicos é influenciada por vários fatores, dos quais se destaca a presença de líquidos plastificantes. As moléculas de tais líquidos são, normalmente, de dimensões reduzidas e ficam retidas entre as cadeias poliméricas, afastando-as uma das outras, o que reduz as forças de atração intermoleculares polímero – polímero, aumentando a mobilidade das cadeias [19, 20, 21].

Devido à sua hidrofobicidade, a interação do PCL* com o fluido fisiológico não acarretará uma mudança significativa na sua T_g uma vez que o material não intumescerá em água. Neste caso, no projeto de sistemas de liberação prolongada ou dispositivos protéticos biorreabsorvíveis que utilizem o PCL* o mecanismo de liberação/biorreabsorção deverá se dar por bioerosão enzimática, ou seja, conversão da matriz de PCL* insolúvel em água em um material solúvel. A bioerosão de uma matriz polimérica hidrofóbica está ilustrada na Figura 6.8.

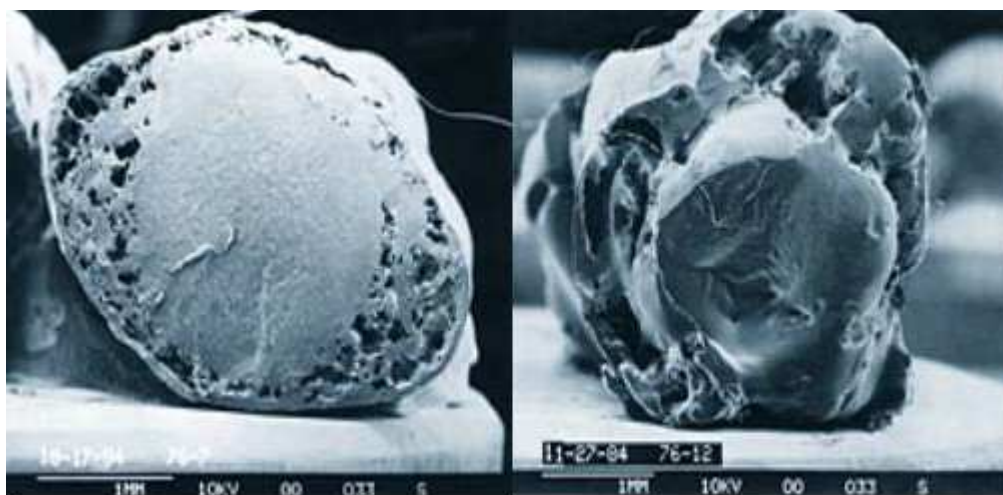


Figura 6.8 – Bioerosão de uma microesfera biorreabsorvível [22]

6.4 Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Uma técnica muito importante no estudo de sistemas moleculares complexos; a espectroscopia no infravermelho com funcional de Fourier representa atualmente uma ferramenta importante para a caracterização de polímeros. Embora não seja uma técnica de caracterização estrutural absoluta, a utilização da técnica FT-IR fornece informações sobre

três importantes características estruturais: a composição química, a estrutura configuracional e conformacional, e as forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações intermoleculares. A espectroscopia do infravermelho permitiu uma análise imediata da microestrutura do PCL* considerando-se seus grupos funcionais, permitindo ao mesmo tempo; observar a partir de sua análise a existência além da pureza do produto obtido; a existência de reações secundárias.

A Figura 6.9 ilustra os espectros de infravermelho obtidos para o polímero PCL* no equipamento Perkin-Elmer 1000. Observam-se os sinais típicos de um poliéster. O intenso pico observado em 1720 cm^{-1} corresponde ao sinal de deformação axial da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) do grupo éster. O sinal observado em 3500 cm^{-1} corresponde às vibrações de deformação axial dos grupos hidroxilas (OH) devido à polimerização com glicerol. Os sinais em 2945 cm^{-1} e 2952 cm^{-1} correspondem às deformações axiais assimétricas de $\text{C}-\text{H}$ e CH_2 . O sinal detectado em 2864 cm^{-1} corresponde às deformações axiais simétricas de $\text{C}-\text{H}$ e CH_2 . O sinal em 1471 cm^{-1} corresponde às deformações angulares simétricas no plano. Em 1245 cm^{-1} observa-se as vibrações de deformação axial de $\text{C}-\text{O}$ do éster, que são, na verdade, duas vibrações assimétricas acopladas: $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$ e $\text{O}-\text{C}-\text{C}$ [23].

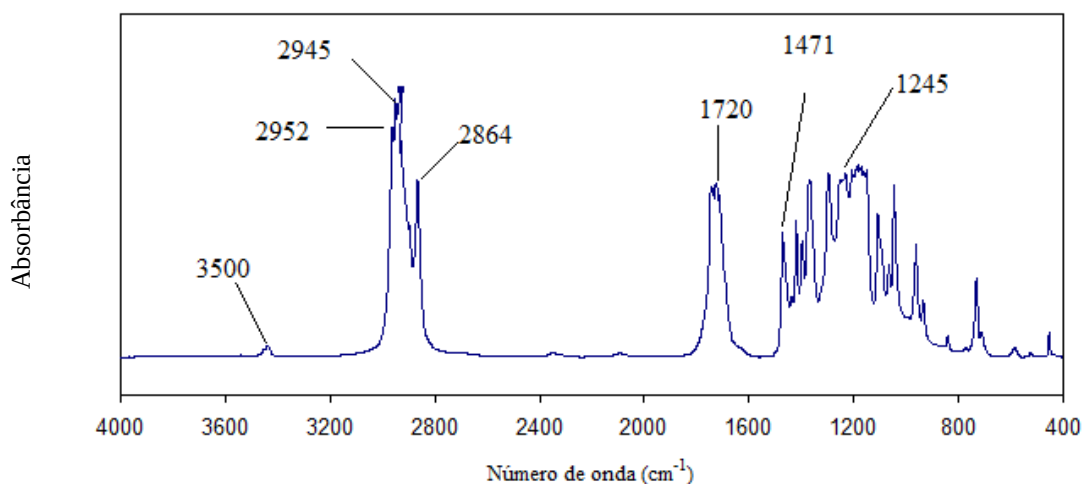


Figura 6.9 – Espectro do filme PCL* obtido no espectrômetro Perkin-Elmer 1000.

6.5 Caracterização Bioquímica

6.5.1 Adsorção Protéica

As interações entre os biomateriais e o meio biológico compreendem uma série de eventos complexos. O primeiro evento observável no contato de uma superfície não

fisiológica com o sangue é a adsorção protéica, que pode influenciar os demais eventos, como adesão de plaquetas do sangue e a formação de trombos.

A literatura indica que a microestrutura do material tais como a existência de domínios hidrofílicos ou hidrofóbicos ou a presença de microfases separadas, especialmente estruturas lamelares ou esféricas de segmentos hidrofílicos imersas em regiões hidrofóbicas exercem uma influência marcante nas propriedades biocompatíveis de um polímero candidato a biomaterial [24, 25].

As interações entre biomateriais e as proteínas sangüíneas ocorrem devido à grande diversidade estrutural apresentadas pelas proteínas. Proteínas são biopolímeros naturais cujas unidades básicas são os aminoácidos. Estes aminoácidos conferem às proteínas um grande potencial para adsorver em quase todos os tipos de interface, pois estas moléculas biológicas podem apresentar simultaneamente regiões hidrofóbicas e hidrofílicas apresentando, portanto elevada densidade eletrônica em sua superfície.

Um dos fluidos biológicos que mais comumente entra em contato com os biomateriais é o sangue. O sangue consiste de elementos sólidos (glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas) suspensos em um meio líquido denominado plasma [26], concentração total de proteínas de aproximadamente 70 mg/mL, com cerca de 150 bandas de proteínas determinadas por eletroforese em gel [27]. As principais proteínas presentes no plasma e suas respectivas concentrações estão listadas na Tabela 6.5. Estas proteínas apresentam diversas funções no sangue. Por exemplo, a albumina realiza o controle da pressão osmótica e o transporte de ácidos graxos livres no sangue [27], as imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM) são responsáveis pelo mecanismo de defesa do organismo, o fibrinogênio pode ser transformado em fibrina resultando na formação de coágulos e conseqüente interrupção de hemorragias. A hemoglobina é responsável pelo transporte de oxigênio e gás carbônico pelo sangue.

Tabela 6.5 – Principais proteínas do plasma humano [26]

Proteína	Concentração (mg/mL)
Albumina	40
IgG	8-17
LDL	4
HDL	3
α -Macroglobulina	2,7
Fibrinogênio	2-3
Transferina	2,3
α -Anti-tripsina	2
Haptoglobinas	4,8-5,6
C3	1,6
IgA	1-4
IgM	0,05-2

A quantidade de proteínas séricas adsorvidas sobre as superfícies de PCL* e PCL linear foi determinada empregando-se a equação:

$$q = \frac{(C_o - C_e).V}{W} \quad (6.1)$$

sendo q a quantidade de proteína adsorvida (mg/g), V é o volume da solução (L), W é a massa de PCL*/PCL (g), C_o é a concentração inicial da solução (mg/L) e C_e a concentração de proteína em equilíbrio na solução (mg/L).

As isotermas de adsorção das proteínas nas superfícies de PCL* e PCL linear podem ser visualizadas nas Figuras 6.10 a 6.12. No pH do experimento (7,4) as proteínas estão carregadas negativamente uma vez que os pontos isoelétricos (PI) da albumina do soro humano (HSA), imunoglobulina G (IgG) e do fibrinogênio (HFb) são 4,8, 6,6 e na faixa de 5,1-6,3, respectivamente [28, 29]. Por outro lado, nas condições do experimento, ambos, PCL* e PCL devem se apresentar neutros e o processo de adsorção deverá ser governado através de interações hidrofóbicas entre a superfície do material e as proteínas.

Observa-se nas Figuras 6.10 a 6.12 um rápido decaimento da concentração das proteínas HSA, HFb e IgG em função do tempo em pH 7,4 e 37 °C. Nos primeiros minutos e,

em torno de 30 minutos é atingida a condição de equilíbrio. Observa-se que o PCL* adsorve uma quantidade de albumina humana mais alta relativamente às proteínas HFb e IgG. Ao mesmo tempo, observa-se que o PCL* apresenta uma adsorção de albumina muito mais alta que PCL linear, indicando que o polímero estrela possui uma maior hemocompatibilidade relativamente ao polímero linear, provavelmente devido à sua estrutura globular, mimetizante das proteínas séricas.

A adsorção de fibrinogênio tem grande importância no fenômeno da hemocompatibilidade dos materiais poliméricos, uma vez que, por ser um dos fatores de coagulação, facilita a adesão de plaquetas, participando de reações de troca com outras proteínas, importantes no mecanismo da coagulação do sangue [30].

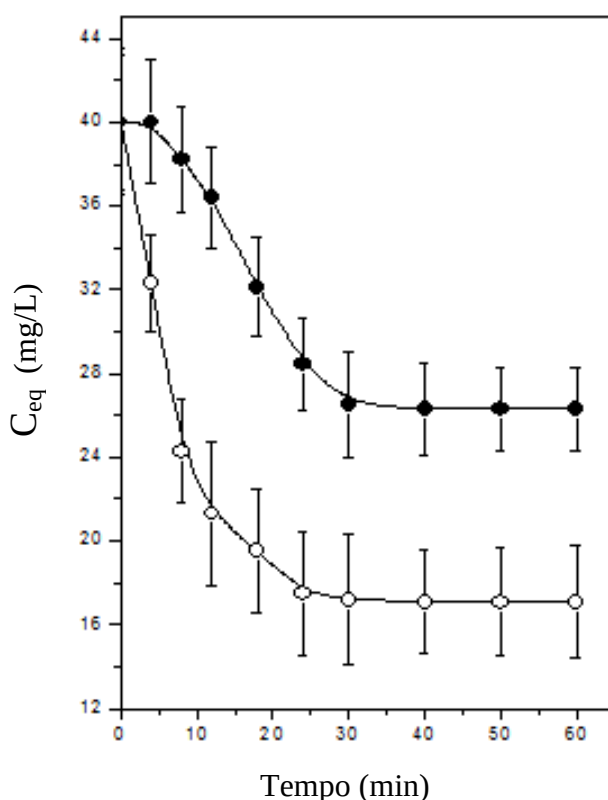


Figura 6.10 – Concentração da proteína HSA em função do tempo para PCL*(●) e PCL (○) em pH 7,4 e a 37 °C

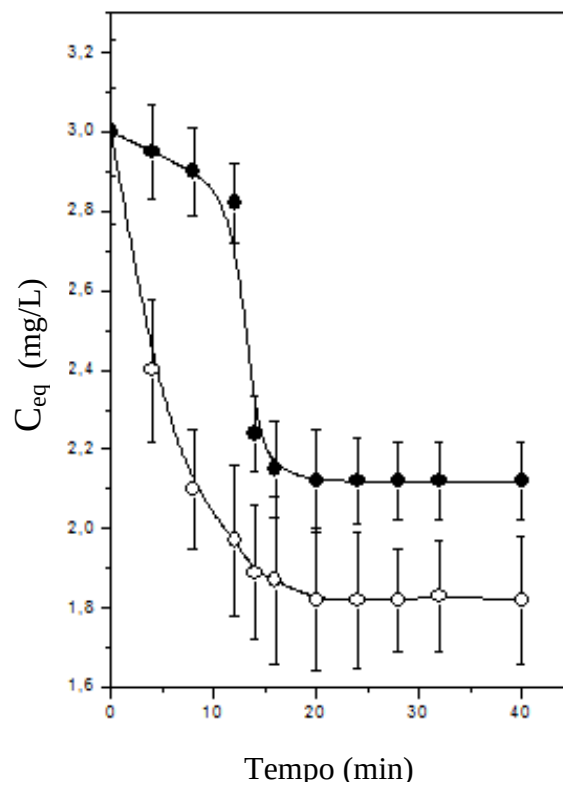


Figura 6.11 – Concentração da proteína HFb em função do tempo para PCL*(●) e PCL (○) em pH 7,4 e a 37 °C

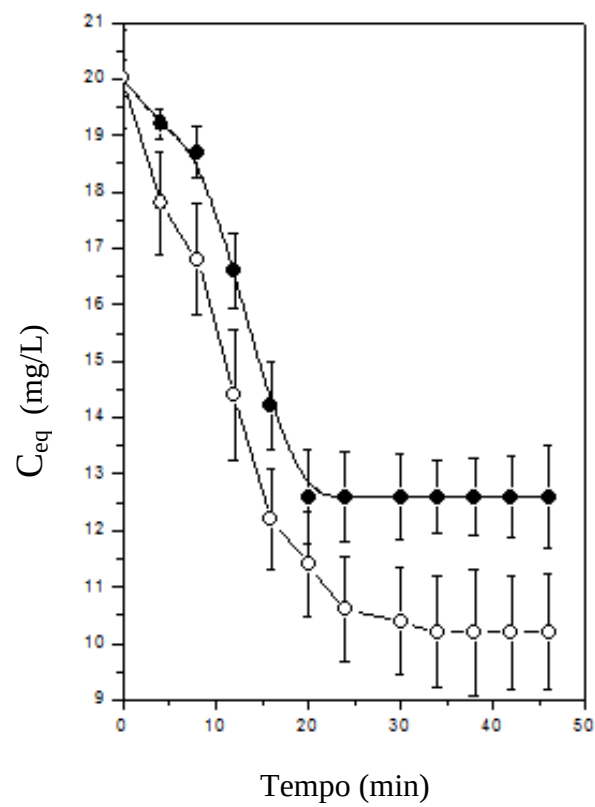


Figura 6.12 – Concentração da proteína IgG em função do tempo para PCL*(●) e PCL (○) em pH 7,4 e a 37 °C.

A concentração protéica na fase sólida (q) *versus* a concentração do adsorvato na fase líquida (C_{eq}) podem ser interpretados pela isoterma Langmuir. A equação de Langmuir é representada pela expressão:

$$q = \frac{Kq_m C_{eq}}{1 + KC_{eq}} \quad (6.2)$$

sendo K a constante de Langmuir; C_{eq} é a concentração de proteína no equilíbrio (mg/L) e q_m é a capacidade máxima de adsorção em μg de proteína por grama de PCL* ou PCL linear. Fisicamente, q_m representa a concentração das espécies adsorvidas sobre a superfície quando uma completa cobertura do tipo monocamada é atingida.

A equação anterior pode ser linearizada para se obterem os dois parâmetros de Langmuir (K e q_m). Geralmente, para determinar estes dois parâmetros é empregada a equação de linearização da isoterma, representada abaixo:

$$\frac{C_{eq}}{q} = \frac{1}{Kq_m} + \frac{C_{eq}}{q_m} \quad (6.3)$$

Um gráfico de C_{eq}/q *versus* C_{eq} fornece como coeficiente linear $1/q_m K$ e como coeficiente angular $1/q_m$. Além deste importante parâmetro, a isoterma permite ainda o cálculo da energia livre de adsorção (ΔG_{ads}) por meio da constante K , para que se possa avaliar o tipo de adsorção, física ou química, característico do processo de acordo com:

$$\Delta G_{ads} = - RT \cdot \ln K \quad (6.4)$$

As Figuras 6.13 a 6.15 ilustram os gráficos da linearização da isoterma de Langmuir para os polímeros PCL* e PCL. De acordo com as hipóteses formuladas pelo modelo de Langmuir, os fenômenos de interação entre PCL* (ou PCL) e as proteínas séricas podem ser caracterizados pela adsorção física com a formação de monocamada de proteína sobre um número definido de sítios na superfície do polímero biodegradável. Além disso, cada sítio pode acomodar somente uma molécula adsorvida e a energia da molécula adsorvida é a mesma em todos os sítios da superfície e não depende de outras entidades adsorvidas nos

sítios vizinhos. A homogeneidade da energia dos sítios de adsorção sugerida pelo ajuste dos dados de acordo com a equação de Langmuir pode ser atribuída à ocorrência preferencial da interação entre as proteínas em solução e os polímeros biodegradáveis com a participação dos grupos carboxílicos do PCL* e PCL, respectivamente.

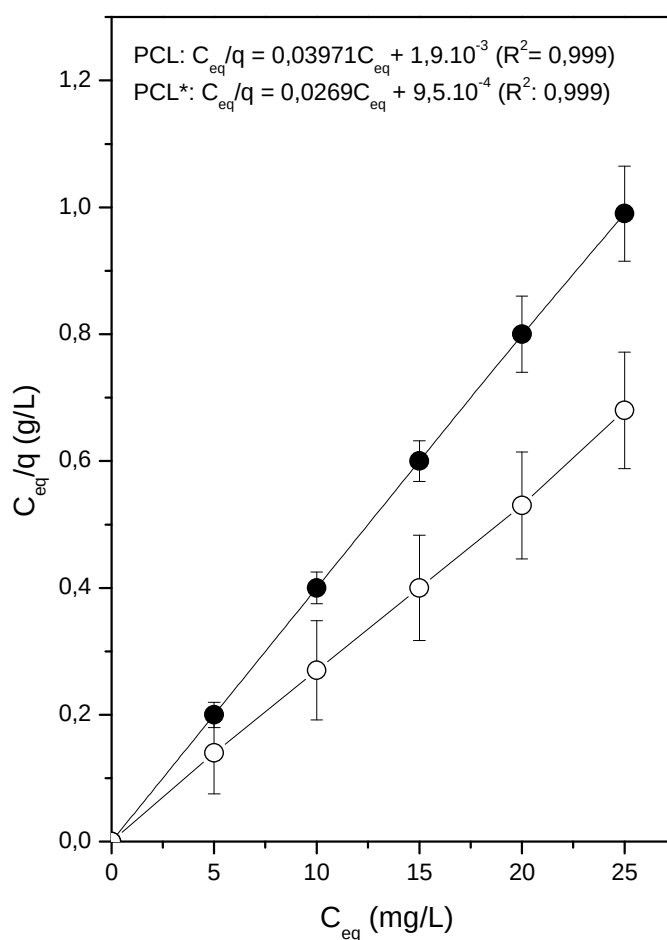


Figura 6.13 – Isoterma de Langmuir para a adsorção de HSA em PCL (●) e PCL* (○) em pH 7,4 e a 37 °C.

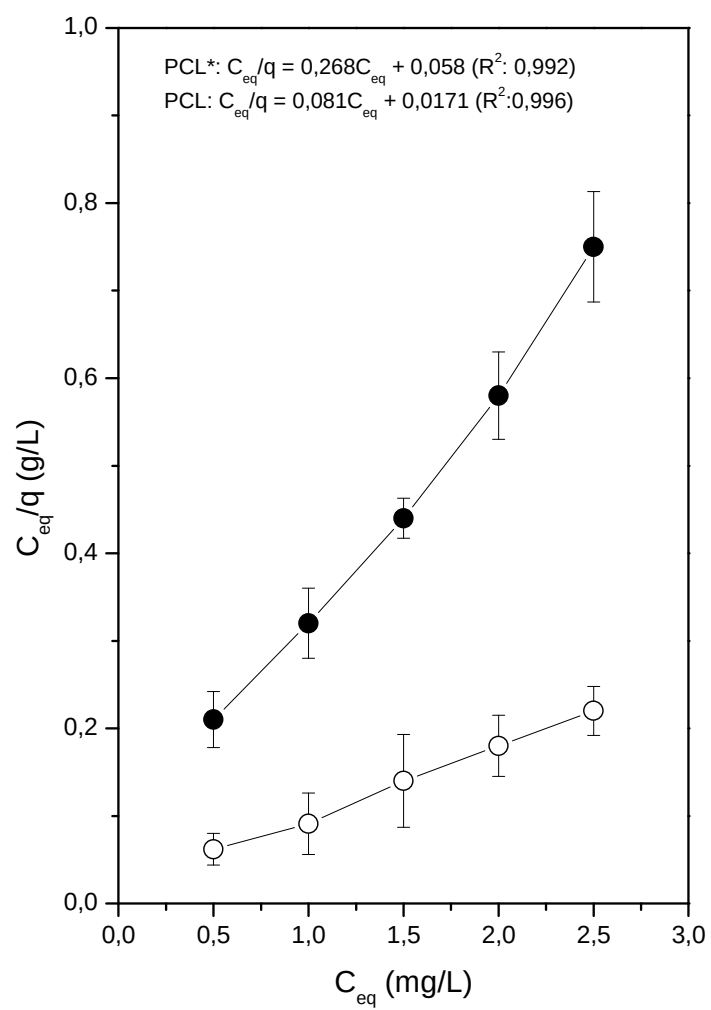


Figura 6.14 – Isoterma de Langmuir para a adsorção de HFb em PCL* (●) e PCL (○) em pH 7,4 e a 37 °C.

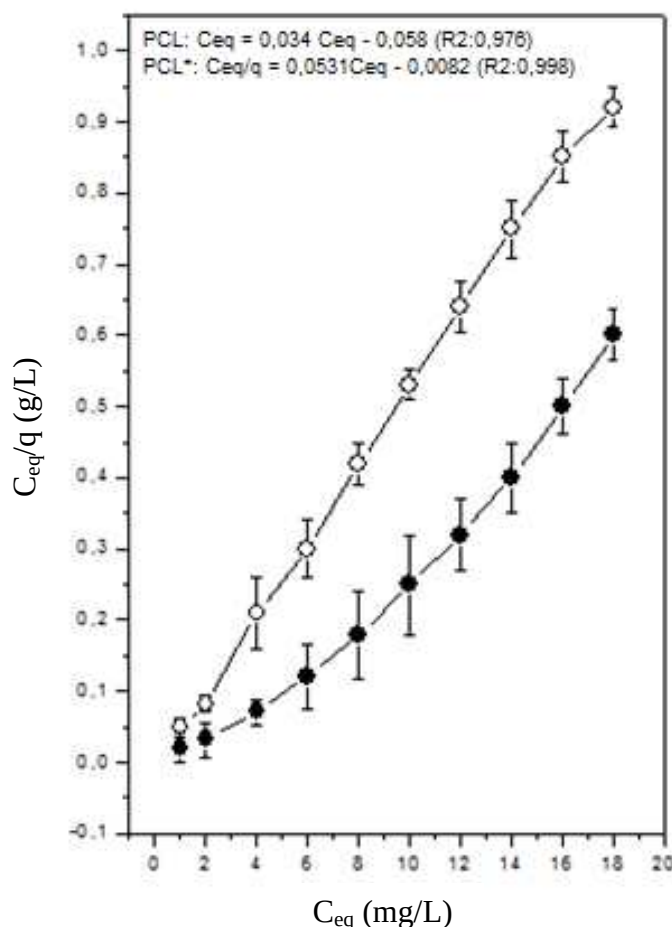


Figura 6.15: Isoterma de Langmuir para a adsorção de IgG em PCL* (●) e PCL (○) em pH 7,4 e a 37 °C.

A boa correlação dos dados observada pelo valor de R^2 obtidos neste trabalho confirma a adsorção representada pela equação de Langmuir. Complementando as indicações fornecidas pela isoterma de Langmuir, o caráter físico do processo pode ainda ser verificado por meio do cálculo da energia livre de adsorção (ΔG_{ads}).

Na adsorção química, ou quimissorção, os valores de ΔG_{ads} estão situados na faixa de 40kJ/mol a 400 kJ/mol [31]. Na adsorção física esses valores são bem menores, de 0,3 kJ/mol a 3 kJ/mol [31]. A ordem de grandeza dos valores de ΔG_{ads} calculados na Tabela 6.6 pode indicar a adsorção física como mecanismo predominante no processo de adsorção das proteínas séricas pelos polímeros biodegradáveis. O sinal negativo obtido para esse parâmetro caracteriza a espontaneidade do processo.

É interessante observar que a adsorção das proteínas trombogênicas IgG sobre a superfície de PCL* não é termodinamicamente favorecida indicando a forte influência da estrutura das proteínas séricas no processo de adsorção. Uma vez que no pH 7,4 a capacidade de adsorção das proteínas HSA, HFb e IgG pelos polímeros PCL* e PCL parecem estar

associadas à atração de van der Waals e ligações hidrogênio, estas forças parecem ser maiores no polímero PCL*, provavelmente devido à sua topologia globular.

Tabela 6.6 – Parâmetros da isoterma de Langmuir q_m e K para a adsorção de proteínas séricas sobre PCL* e PCL linear.

Proteína	$q_{m,PCL}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	K_{PCL}	ΔG_{PCL} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$q_{m,PCL*}$ ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	K_{PCL*}	ΔG_{PCL*} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
HSA	25,18	20,90	-7,83	37,17	28,32	-8,62
HFb	12,35	1,40	-0,9	3,73	15,68	-7,10
IgG	29,41	(-)0,59	-1,36	18,83	(-)0,0082	4,80

6.5.2 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade representa a fase inicial do teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas, sendo utilizado em uma primeira análise para detectar se o material sintético apresenta características de biomaterial quanto à sua interação com o tecido biológico [32].

O PCL*, como todo material destinado ao implante/administração a um organismo vivo, foi submetido à avaliação de sua citotoxicidade. No ensaio de citotoxicidade deste trabalho, os resultados foram expressos em porcentagem de células CHO sobreviventes, sendo os resultados apresentados na Figura 6.16.

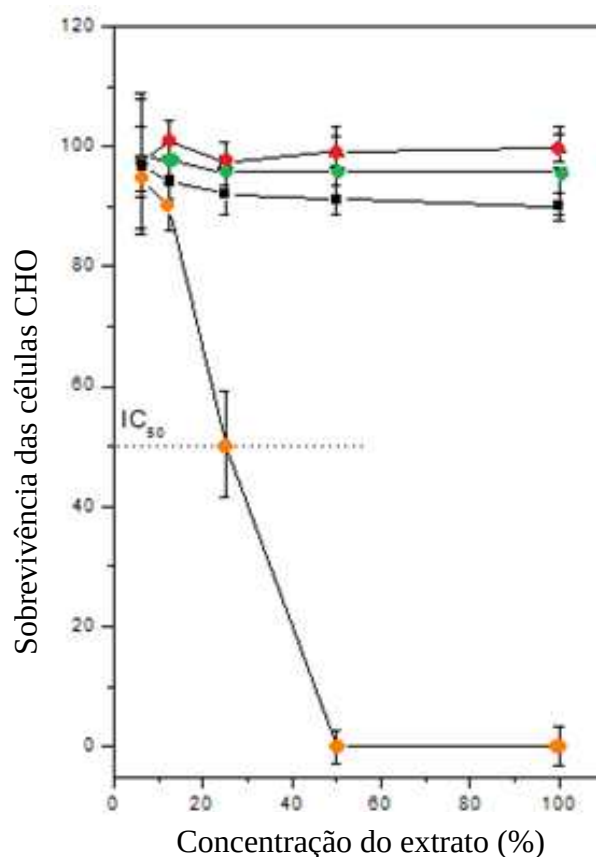


Figura 6.16: Ensaio de citotoxicidade de PCL (●), PCL* (■) contra células de mamíferos (CHO). Controle negativo (UHWMPE) (●) e, controle positivo (fenol) (●).

O material utilizado como controle positivo, solução de fenol a 0,02%, apresentou atividade citotóxica extremamente elevada, como já era esperado. Neste caso, praticamente não restaram colônias sobreviventes sobre a placa denominada de controle. À medida que a concentração de fenol aumenta, a razão do número de colônias sobreviventes diminui, até praticamente não sobraem colônias visíveis sobre a placa controle. Por outro lado, a utilização do polietileno de ultra-alto peso molecular (UHWMPE) demonstrou ser um material não citotóxico, o que justifica sua utilização como controle negativo. As amostras de PCL* e PCL linear mostraram comportamento semelhante ao controle negativo (polietileno), com viabilidade celular superior a 90%, indicando ser biocompatíveis para a implantação em organismo biológico.

6.5.3 Adesão de plaquetas e Formação de trombos

Plaquetas são fragmentos discóides anucleados da medula óssea com tamanho médio de 3-4 μm circulando no tecido sanguíneo com concentração no intervalo de aproximadamente 150×10^6 a 400×10^6 plaquetas/mL e um tempo de meia-vida de 8-10 dias. A função das

plaquetas está intimamente relacionada ao reconhecimento de injúrias vasculares, formação do tampão hemostático para a prevenção de hemorragias, retração dos coágulos e cicatrização de feridas [33].

A membrana plasmática das plaquetas contém glicoproteínas que podem atuar como receptores para agonistas em estímulos mediados pela superfície sintética, o que inicia o processo de adesão e ativação plaquetária [34]. Atualmente são conhecidos cerca de 25.000 receptores na superfície plaquetária sendo os receptores GPIb e GPIIb/IIIa os de maior densidade na superfície da plaquetas [35]. O receptor GPIb mede a interação das plaquetas com o fator de von Willebrand (vWF) adsorvido na superfície do biomaterial, o que pode iniciar o processo de adesão e ativação plaquetária.

O receptor GPIIb/IIIa (CD41/CD61) é um receptor de integrina expresso na superfície plaquetária. GPIIb/IIIa é o receptor dominante com 40.000 – 80.000 receptores no restante da superfície plaquetária. Outros 20.000 – 40.000 receptores estão presentes dentro das plaquetas nas membranas conhecidas como membranas grânulo α e as membranas que mediam a abertura do sistema canicular. Os grânulos são translocados para a membrana plaquetária durante o mecanismo de liberação, iniciados após ativação e agregação plaquetárias [35].

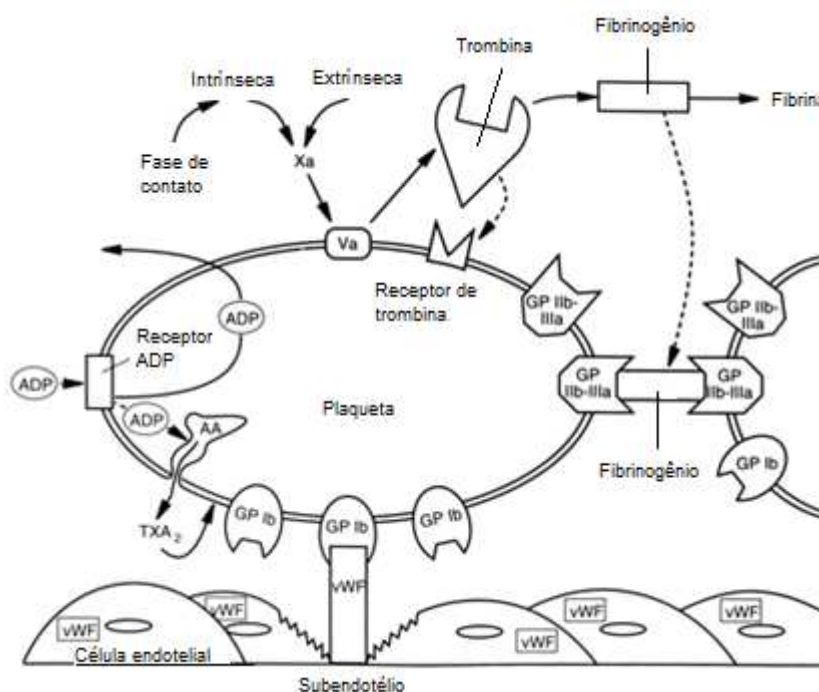


Figura 6.17 – Plaqueta e seus receptores de superfície responsáveis por sua ativação [36].

A ativação das plaquetas sanguíneas aderidas na superfície de um biomaterial pode levar a uma alteração na topologia celular mediada pela reorganização do citoesqueleto culminando com a liberação dos grânulos plaquetários o que promove a formação de agregados plaquetários e formação de trombos na interface biomaterial-tecido biológico.

Os resultados de adesão plaquetária nas superfícies de PCL* e PCL linear são ilustrados na Figura 6.18. Observa-se que houve uma pequena diferença no número de plaquetas aderidas às superfícies dos polímeros, tendo ocorrido um menor número de plaquetas aderidas à superfície de PCL*.

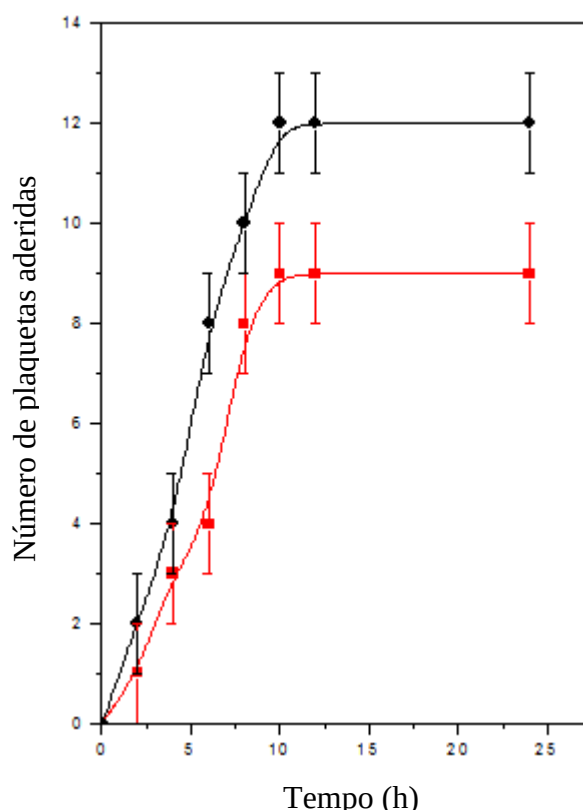


Figura 6.18 – Cinética do processo de adesão plaquetária nas superfícies de PCL* (■) e PCL linear (■). O desvio padrão nas amostras é de ± 1 . Todas as plaquetas aderidas observadas nas superfícies de PCL e PCL* foram do tipo I (citoesqueleto não modificado).

Os resultados de adesão plaquetária nas superfícies de PCL* e PCL linear monitorados por MEV e plaquetas marcadas com ^{51}Cr são ilustrados na Figura 6.19, sendo utilizado o vidro como controle positivo. Pode ser observado que não existe uma diferença significativa entre as duas superfícies do poliéster relativamente à adesão de agregados plaquetários. A adesão é significativamente maior nas superfícies de vidro não revestidas comparativamente às superfícies revestidas com os polímeros PCL e PCL*. É fato bem conhecido da literatura que o vidro apresenta uma elevada trombogenicidade devido à sua alta energia livre de superfície ($58,95 \text{ mJ/m}^2$) [52].

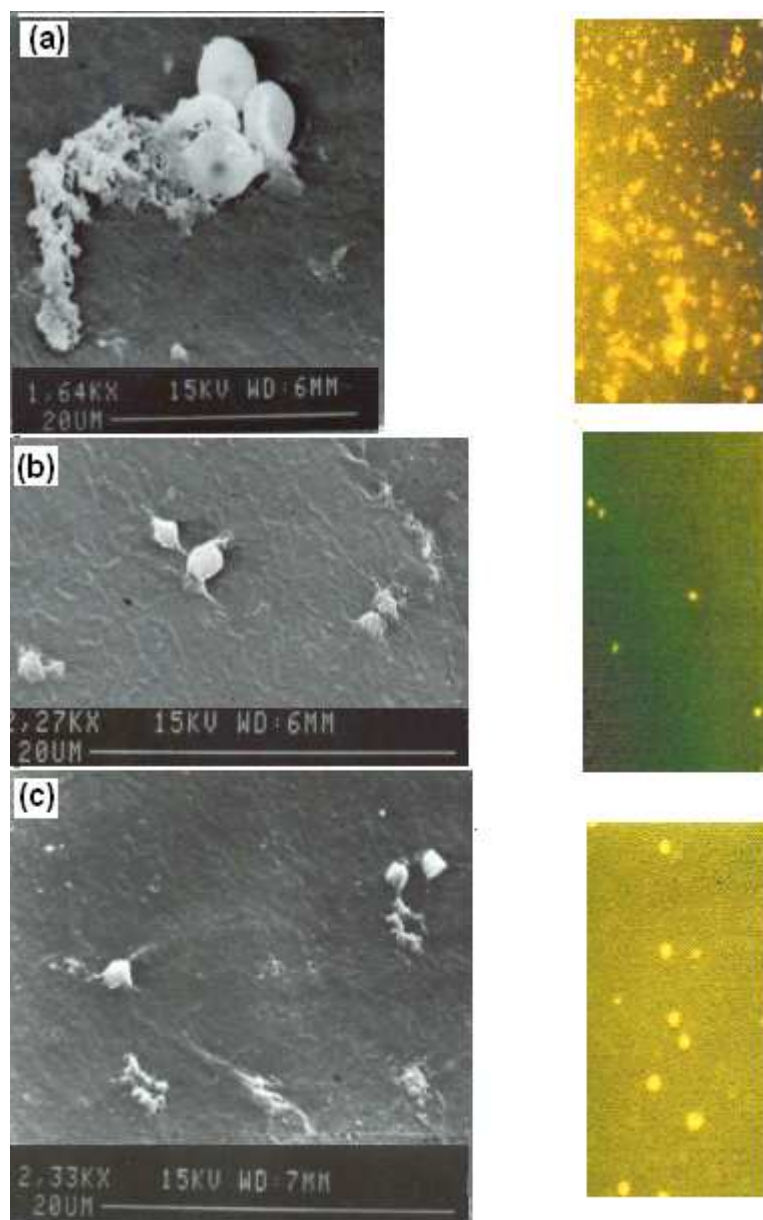


Figura 6.19: Micrografias do microscópio eletrônico de varredura sobre: Vidro (controle positivo) (a), PCL* (b) e PCL linear (c). À direita são apresentadas as micrografias de epifluorescência das respectivas superfícies.

A figura 6.20 ilustra a cinética de formação de trombos nas superfícies de PCL* e PCL antes e após o contato com a solução protéica de HSA. Observa-se que a porcentagem de formação de trombos é pequena em ambas as superfícies, entretanto após o contato com a solução protéica de HSA a porcentagem de formação de trombos foi significativamente menor nas duas superfícies do poliéster. A adsorção de HSA parece passivar a superfície do polímero inibindo a adsorção de fibrinogênio (HFb) e imunoglobulina G (IgG), evitando que HFb e IgG se liguem a receptores de membrana das plaquetas e possam ativá-las dando início a formação de agregados plaquetários e consequentemente a formação de trombos.

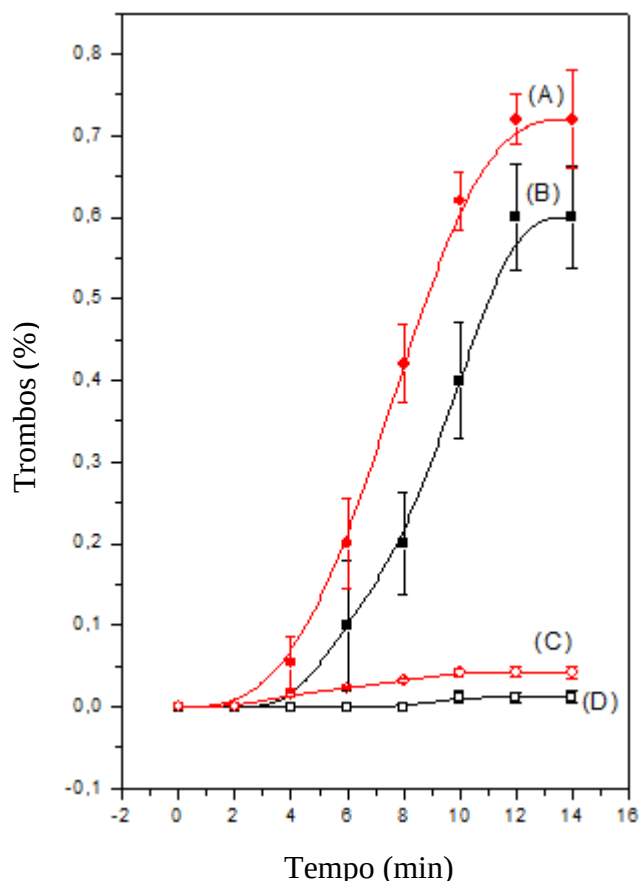


Figura 6.20 – Cinética da formação de trombos sobre PCL (A), PCL* (B) antes do contacto com a solução de HSA e após contacto das superfícies de PCL (C) e PCL* (D) com a solução proteica (40 mg.mL^{-1} , PBS, pH 7,4, 37°C).

Quando o sangue entra em contato com as superfícies de polímeros sintéticos, quase imediatamente, forma um revestimento protéico. Em seguida à formação dessa camada protéica ocorre a aderência de plaquetas. Além do fibrinogênio, as γ -globulinas pré-adsorvidas nessas superfícies artificiais estimulam as reações de liberação das plaquetas. A albumina, ao contrário, tende a tornar as superfícies menos propensas à adesão plaquetária [53]. Neste caso, reações dos radicais glicosil transferase nas unidades de polissacarídeos incompletos poderiam mediar a interação das proteínas com as plaquetas. Os grupos de radicais glicosil transferase existem no fibrinogênio, nas γ -globulinas e em muitas outras proteínas do plasma, mas, não existem na albumina. Estas diferenças químicas podem explicar o efeito benéfico da albumina no que se refere à inibição da formação de trombos na superfície de próteses poliméricas, impedindo o processo de deposição e agregação plaquetária.

6.5.4 Ensaio de biodegradação

Um ponto importante a se considerar sobre a aplicação de biomateriais biorreabsorvíveis são os mecanismos pelos quais tais sistemas podem sofrer biodegradação no organismo humano. Se a matriz polimérica cujo objetivo inicial seja a de se promover a biofuncionalidade do tecido lesado até sua total recuperação não for biorreabsorvida esta deverá ser cirurgicamente removida, implicando em um alto custo e risco para o paciente devido a septicemias.

Neste sentido, a síntese de polímeros biodegradáveis contribuiu para a área de biomateriais no sentido de que tais sistemas não requerem a remoção cirúrgica e não apresentam efeitos colaterais a serem considerados significantes para o paciente.

Matrizes poliméricas biodegradáveis já são biocompatíveis e degradáveis, isto é degradam *in vivo* em fragmentos menores que podem ser excretados ou metabolizados pelo corpo. Estes produtos de degradação não são tóxicos, e não devem criar nenhuma resposta inflamatória. Outra característica importante é a degradação ocorrer em um razoável período de tempo, requerido pela aplicação.

O processo de biorreabsorção da caprolactona ocorre através da hidrólise de suas ligações ésteres em contato com os fluidos corpóreos, originando produtos na forma de oligômeros solúveis e não tóxicos, que após sofrerem a ação metabólica do organismo são transformados em CO_2 e H_2O [9, 13]. É a degradação enzimática catalisada por enzimas denominadas de hidrolases. Certas enzimas proteolíticas (proteases) catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e outras catalisam a hidrólise de ligações éster [37]. Este mecanismo é seguido pela oxidação biológica das cadeias poliméricas (catalisada pelas oxigenases), quebra das mesmas, gerando cadeias menores e bioassimilação destas pelos microrganismos. Este processo ocorre em polímeros contendo hetero-cadeias, tais como celulose, amido e poliésteres alifáticos, dos quais os polímeros PCL* e PCL são representantes típicos. Os grupos ésteres destes polímeros são facilmente hidrolisáveis, pela ação enzimática das esterases presentes no fluido fisiológico [34].

Em geral, a velocidade de hidrólise dos polímeros é controlada por várias propriedades, incluindo estrutura, área superficial e morfologia. A susceptibilidade de polímeros à degradação enzimática é determinada pela relação entre propriedades e estrutura. A biodegradação enzimática pode ser monitorada por medidas de massa molar (cromatografia de permeação em gel- GPC), da presença de grupos laterais (infravermelho com transformada de fourier – FT-IR), mudanças nas propriedades mecânicas (análise termo-mecano-dinâmica –

DMTA), alterações na estrutura de microfase (calorimetria exploratória diferencial – DSC) ou de estrutura de macrofase (microscopia eletrônica de varredura – MEV) [38, 39, 40].

Neste trabalho, a biodegradabilidade dos polímeros PCL* e PCL foi estudada através de medidas de variações na densidade ótica de uma microemulsão preparada a partir dos respectivos poliésteres.

A Figura 6.21 ilustra a variação na densidade ótica das emulsões do polímero PCL* devido à degradação enzimática. A densidade ótica das emulsões foram medidas em um espectrofotômetro UV/Vis Cary 50 utilizando o comprimento de onda de 650 nm. As emulsões permaneceram a 37 °C sob agitação contínua durante todo o experimento.

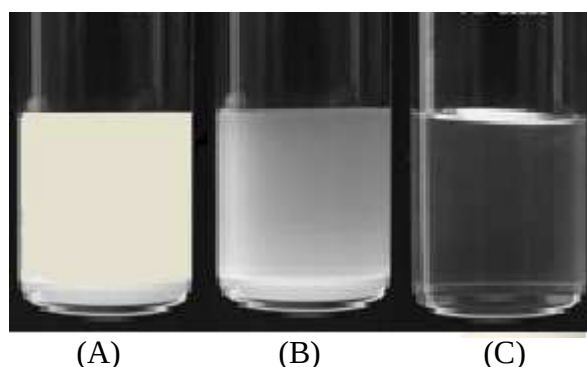


Figura 6.21 – Ilustração da turbidez após 0h (A), 10 h (B) e 30 h (C) de incubação de uma emulsão do polímero PCL* com as enzimas lipase e colesterol esterase em solução PBS 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4 e 37 °C.

As enzimas lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. Embora a diferenciação entre lípases e esterases (EC. 3.1.1.1) ainda não esteja completamente definida; pode-se afirmar que a lipase catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis [41, 42]. Tais enzimas são encontradas nos tecidos animais e exercem um papel muito importante no metabolismo humano.

A Cease é uma glicoproteína de 579 aminoácidos ácidos, com uma região entre os aminoácidos 540 e 573 muito rica em prolina, e uma sequência hidrofóbica de seis aminoácidos no C-terminal da proteína [43]. A região rica em prolina é formada por uma sequência repetitiva do tipo (PVPPTGDSGAP)_n. A diferença entre as Ceases de diferentes espécies biológicas é determinada pela sequência repetitiva dos aminoácidos. A Cease de origem bovina contém três unidades repetitivas semelhantes enquanto que a Cease humana apresenta 16 repetições. Estudos têm demonstrado que a região rica em prolina não

desempenha nenhum papel na atividade da enzima sendo que seu papel fisiológico permanece indefinido [44].

A enzima Cease hidrolisa ésteres solúveis em água e hidrofóbicos e sua posição na escala evolutiva permite classificá-la como lípases de triglicérides e esterases. As lípases de triglicérides hidrolisam preferencialmente ésteres hidrofóbicos e lipídios, enquanto esterases atuam preferencialmente em substratos solúveis em água. A Figura 6.22 ilustra a superfície equipotencial das enzimas Cease (A) e lipase (B), simuladas por computador.

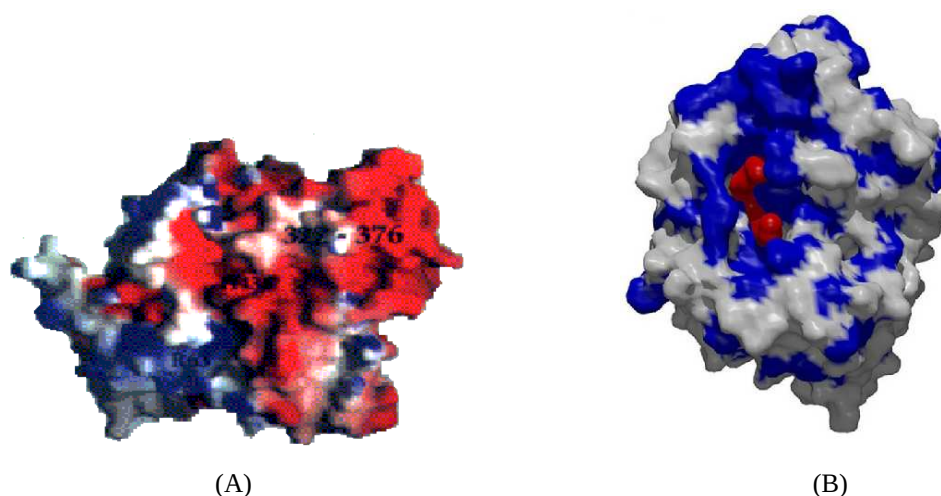


Figura 6.22 – Superfícies equipotenciais da Cease (A) e lipase (B) simuladas *in silico*. Em vermelho e azul estão representadas as regiões de alta e baixa densidade eletrônica, respectivamente [45, 46].

O gráfico da redução na densidade ótica das emulsões dos polímeros PCL* e PCL sob ação das enzimas lipase e colesterol esterase são ilustrados na Figuras 6.23 e 6.24. Observa-se na Figura 6.23 que o polímero PCL* é significativamente mais susceptível à degradação enzimática que PCL de estrutura linear.

Utilizando o método dos mínimos quadrados na região onde o processo é de primeira ordem, a velocidade instantânea, v , para a redução na densidade ótica pode ser calculada. Os valores obtidos para v considerando a enzima lípase foram iguais a $3,71\%h^{-1}$ ($y=3,71x-5,23$; $r^2=0,9823$) e $2,49\%h^{-1}$ ($y=2,49x-20,79$; $r^2=0,9696$) para os polímeros PCL* e PCL linear, respectivamente.

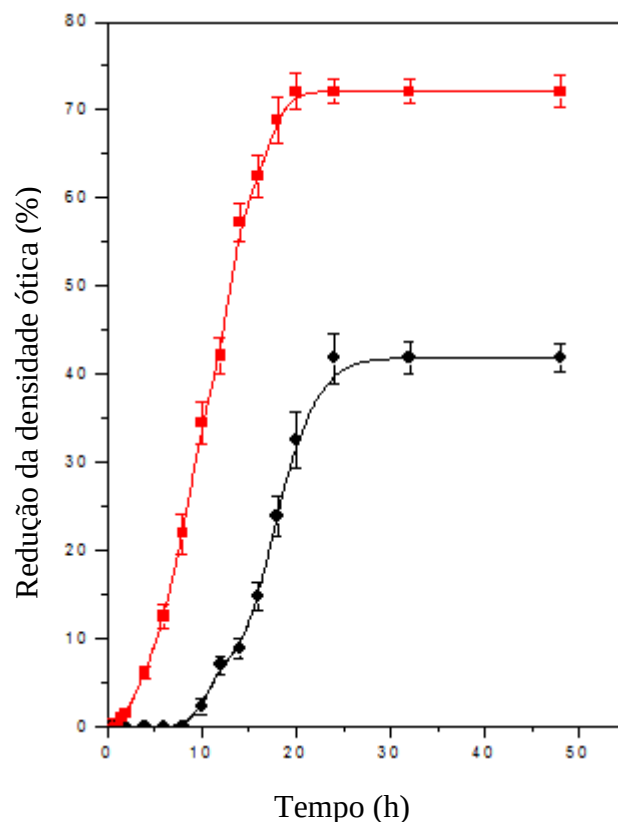


Figura 6.23 – Redução da densidade ótica em função do tempo para a hidrólise enzimática do PCL* (■) e PCL (●). Concentração da enzima lipase: 1.800 U em solução tampão PBS-salina (pH=7,4). Temperatura do ensaio: 37 °C.

Para a enzima colesterol esterase os valores de v foram iguais a $1,716\% \cdot h^{-1}$ ($y=1,716x+11,76$; $r^2=0,995$) e $0,982\% \cdot h^{-1}$ ($y=0,982x+1,05$; $r^2=0,998$) para os polímeros PCL* e PCL, respectivamente.

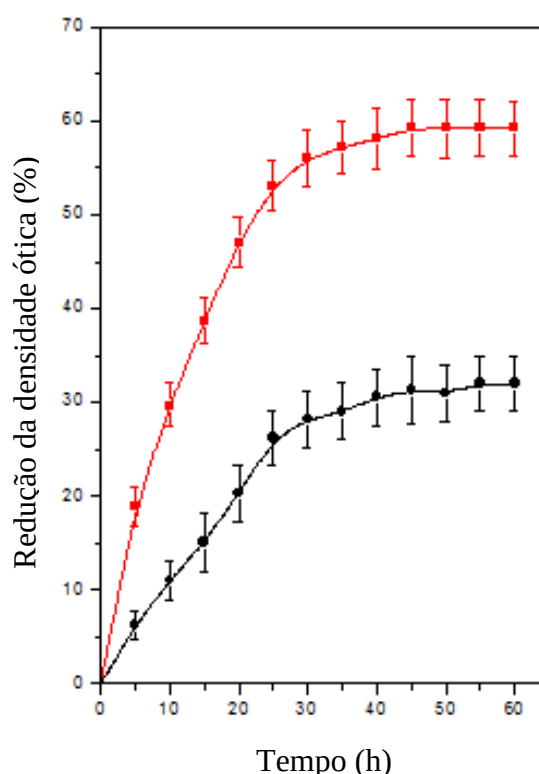


Figura 6.24 – Redução da densidade ótica em função do tempo para a hidrólise enzimática do PCL* (■) e PCL (●). Concentração da enzima colesterol esterase: 1.600U em solução tampão PBS-salina (pH=7,4). Temperatura do ensaio: 37 °C.

Considerando que a reação de biodegradação envolve uma reação enzimática, uma forma quantitativa de se avaliar a interação das enzimas com os substratos poliméricos é através da equação de Michaelis-Menten [47]:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (6.5)$$

A equação (6.5) relaciona a velocidade (v), a velocidade máxima ($V_{\max}$) e a concentração inicial de substrato com a constante de Michaelis-Menten (K_m). A constante de Michaelis-Menten de uma enzima é uma característica muito importante e fundamental, não apenas matematicamente na determinação da velocidade da reação catalisada como também na avaliação da atividade das enzimas nos tecidos. O K_m de um substrato para uma enzima específica é característico, e nos fornece um parâmetro de especificidade deste substrato em relação à enzima. Neste caso, quanto menor for o valor de K_m , maior a especificidade da enzima pelo substrato.

Uma transformação muito empregada da Equação (1) é sua linearização, para os cálculos de K_m e V_{max} , também denominada de Equação de Lineweaver-Burk [48]:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (6.6)$$

Uma vantagem da Equação (6.6) é que esta permite uma determinação precisa de K_m e V_{max} .

As Figuras 6.25 e 6.26 ilustram os gráficos de Lineweaver-Burk para os ensaios de biodegradação dos polímeros PCL* e PCL nas soluções das enzimas lipase e colesterol esterase, respectivamente. Os valores obtidos para K_m e V_{max} estão ilustrados nas Tabelas 6.7 e 6.8.

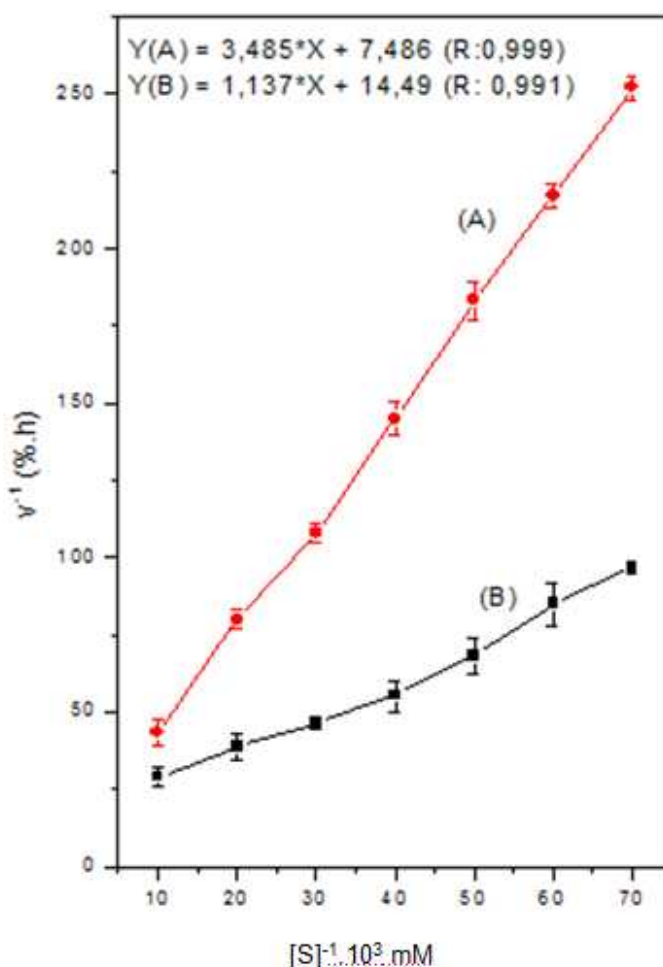


Figura 6.25 – Gráfico de Lineweaver-Burk obtido para a degradação enzimática dos polímeros PCL (A) e PCL* (B) pela enzima lipase. Concentração da enzima lipase: 1.800U em solução tampão PBS-salina (pH=7,4). Temperatura do ensaio: 37 °C.

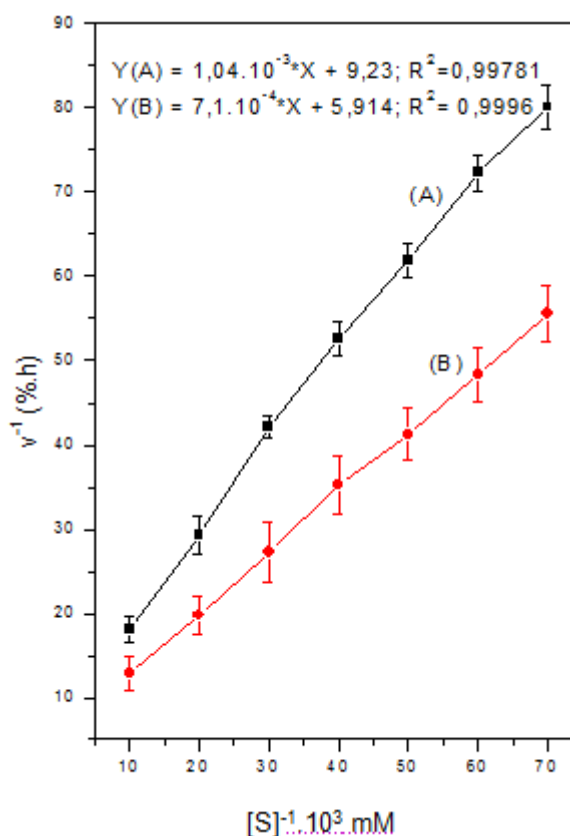


Figura 6.26 – Gráfico de Lineweaver-Burk obtido para a degradação enzimática dos polímeros PCL (A) e PCL* (B) pela enzima colesterol esterase. Concentração da enzima esterase: 1.600U em solução tampão PBS-salina (pH=7,4). Temperatura do ensaio: 37 °C.

Tabela 6.7 – Eficiência da enzima lipase na biodegradação dos polímeros PCL* e PCL. As condições do ensaio são apresentadas na Figura 6.25

	PCL*	PCL
$V_{\max}$ (%·h ⁻¹ ·g ⁻¹)	0,069	0,14
K_m (mM)	$7,87 \cdot 10^{-5}$	$4,87 \cdot 10^{-4}$
$K_m / V_{\max}$	$1,14 \cdot 10^{-3}$	$3,48 \cdot 10^{-3}$

Tabela 6.8: Eficiência da enzima colesterol esterase na biodegradação dos polímeros PCL* e PCL. As condições do ensaio são apresentadas na Figura 6.26

	PCL*	PCL
$V_{\max}$ (%·h ⁻¹ ·g ⁻¹)	0,169	0,108
K_m (mM)	$1,20 \cdot 10^{-4}$	$1,126 \cdot 10^{-4}$
$K_m / V_{\max}$	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$1,04 \cdot 10^{-3}$

A análise de K_m revela que as enzimas lipase e colesterol esterase apresentam uma afinidade aparente maior pelo polímero PCL* relativamente ao polímero PCL. As enzimas

despolimerizam os polímeros PCL* e PCL em produtos de baixo peso molecular solúveis em água que difundem da micela para o meio aquoso; resultando na diminuição da densidade ótica da solução. A estrutura globular do PCL* parece resultar em uma afinidade aparente (K_m) maior pelas enzimas lipase e colesterol esterase; possivelmente devido ao maior contato com os biocatalisadores na fase micelar e também devido ao seu menor peso molecular relativamente ao polímero PCL.

6.5.5 Microscopia de força atômica da camada protéica adsorvida

A adsorção de proteínas séricas sobre as superfícies de implantes poliméricos afeta intensamente a interação celular com a superfície do material, induzindo a ativação de macrófagos seguida pela resposta imunológica ao material implantando e controlando o comportamento de adesão celular [49]. A interação proteína-superfície é fator determinante para a introdução do implante no ambiente biológico. As proteínas promovem uma camada de revestimento sobre a superfície, a qual modula a fixação, propagação e migração de células [50].

Existe um grande interesse em se conhecer mais amplamente a interação entre as proteínas séricas e a superfície de polímeros para o desenvolvimento de biomateriais uma vez que exemplos destas interações são observados em próteses ósseas, dentárias, transplantes e outros dispositivos da área médica.

Proteínas são macromoléculas resultantes da combinação de aminoácidos. Estes aminoácidos possuem vários tipos de cadeias laterais com naturezas físico-químicas diferentes. Algumas destas cadeias laterais contêm hidrocarbonetos tais como valina, leucina, isoleucina; grupos carboxilas a exemplo do ácido glutâmico, ácido aspártico e grupamentos básicos como a lisina, arginina e histidina. Existe, portanto, uma tendência natural das proteínas séricas se associarem nas superfícies sintéticas, dada a natureza (polar/apolar) de sua estrutura.

As mudanças conformacionais originadas pela adsorção e a quantidade de proteína adsorvida são dois aspectos importantes que devem ser investigados quanto ao processo de adsorção de proteínas séricas sobre as superfícies sintéticas.

A HSA (albumina humana sérica) e fibrinogênio (HFb) são as proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo. Têm a propriedade de ligar-se reversivelmente a uma grande variedade de ligantes e fármacos, transportando inúmeras substâncias para diversos

órgãos através do sistema circulatório. A albumina é uma proteína secundária com estrutura em α -hélice. HSA possui uma molécula de cisteína livre e um resíduo de triptofano [37].

A γ -globulina humana contém principalmente a imunoglobulina da classe G (IgG) que é a principal imunoglobulina sérica e atua como receptora de antígenos. A IgG é uma proteína secundária com estrutura em beta folhas (fitas β) [37, 51]. A molécula de IgG é composta por quatro cadeias de polipeptídeos unidos por pontes dissulfeto e forças não covalentes. A adsorção de IgG na superfície de biomateriais é de grande importância para os sistemas de diagnóstico imunológico [51].

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica bastante conhecida por ser bastante sensível às modificações de biomoléculas que ocorrem na superfície dos materiais sintéticos. Neste sentido, a AFM apresenta um alto potencial analítico na ciência dos biomateriais uma vez que é capaz de gerar imagens com resolução espacial extremamente alta e em 3 dimensões.

As Figuras 6.27 e 6.28 ilustram a morfologia dos filmes de PCL* após contato com as proteínas HSA e IgG, respectivamente. Usou-se o tempo de imersão de 24 horas e concentração da solução de 0,11 mM a 0,99 mM de HSA e 0,018 mM a 0,16 mM de IgG, objetivando analisar a topografia da camada protéica no filme de PCL*. A Figura 6.27 (a) mostra a imagem do filme de PCL* antes da adesão do filme protéico.

Uma das características marcantes observadas nas imagens das Figuras 6.27 e 6.28 é a formação de camadas das proteínas adensadas em função da concentração e regiões de dimensões variadas, sem proteína (regiões mais escuras). Isso pode ser indicativo de um processo de adsorção das proteínas HSA e IgG nucleado que favorece o crescimento do filme ao seu redor. Outra característica das imagens foi à formação de algumas regiões circulares, sem proteínas o que poderia indicar uma não homogeneidade do filme protéico adsorvido sobre o filme de PCL*. Os resultados de AFM indicam, portanto, que o filme de PCL* parece favorecer a adsorção das proteínas, contribuindo desta forma para as propriedades hemocompatíveis deste material.

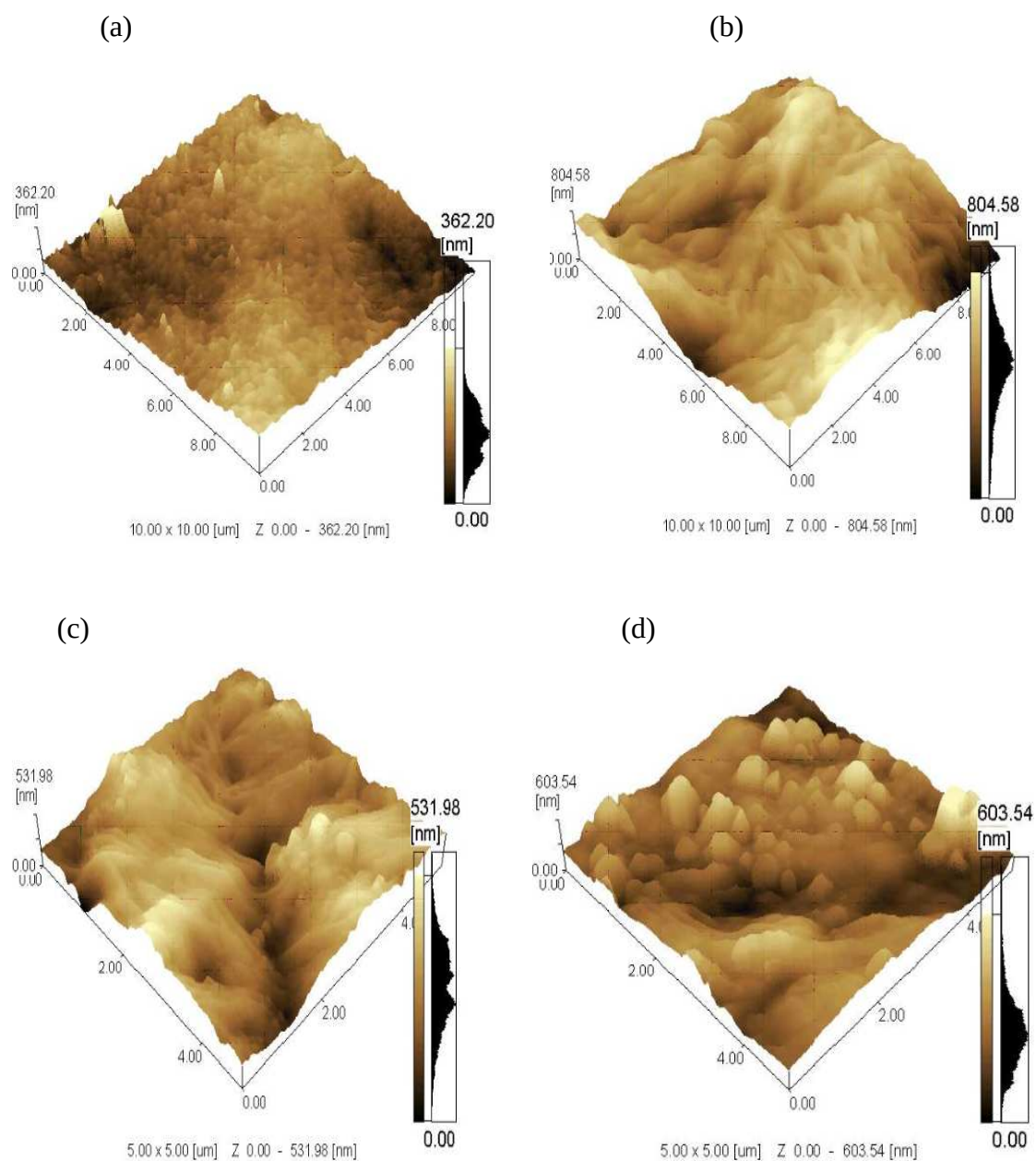
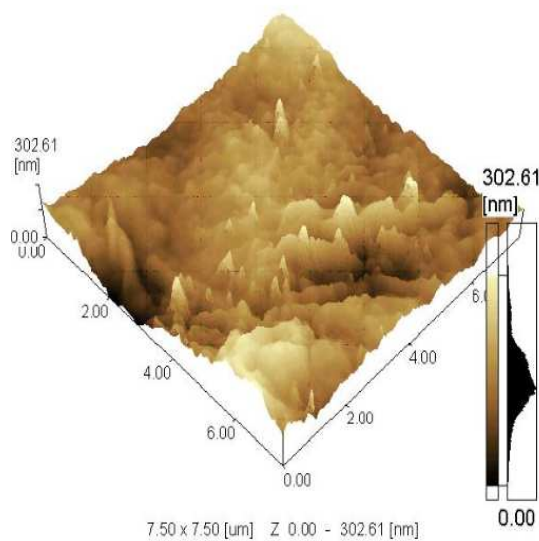
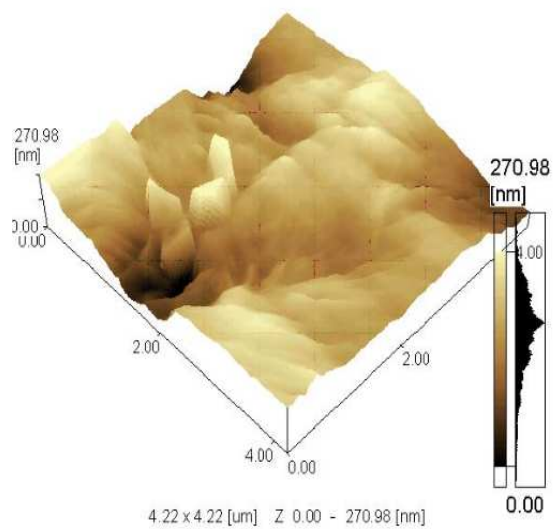


Figura 6.27: Imagens AFM – 3D do filme de PCL* em diferentes concentrações de HSA: (a) Filme de PCL estrela puro, (b) 0,11 mM (c) 0,33 mM (d) 0,99 mM.

(a)



(b)



(c)

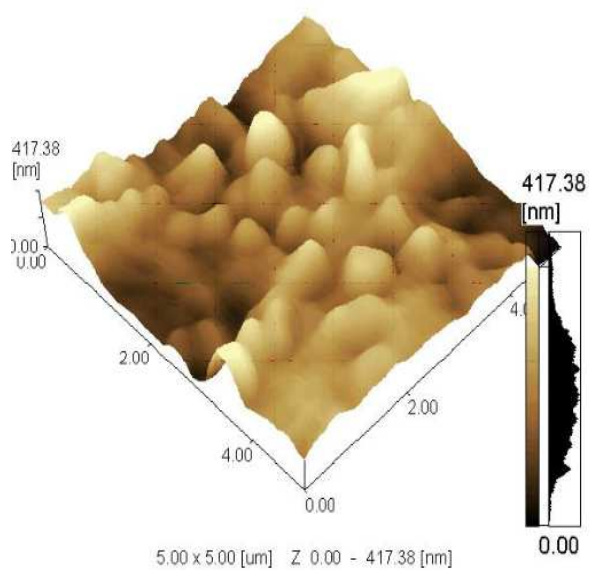


Figura 6.28: Imagens AFM – 3D do filme de PCL* em diferentes concentrações de IgG:
(a) 0,018 mM (b) 0,054 mM (c) 0,16 mM.

6.6 Referências Bibliográficas

- 1 – DE AZEVEDO M.M.M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. 2003. Monografia LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP. Disponível em: <http://lqes.iqm.unicamp.br>. Acesso em 27 julho 2009.
- 2 – LINCE F.; MARCHISIO D. L.; BARRESI A. A. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **J. Colloid Interf. Sci.**, 322: 505–515, 2008.
- 3 – CHANG H. –I.; PERRIE Y.; COOMBES A.G.A. Delivery of the antibiotic gentamicin sulphate from precipitation cast matrices of polycaprolactone. **J. Control. Release**, 110: 414-421, 2006.
- 4 – SARASAM A.; MADIHALLY S. V. Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications. **Biomaterials**, 26 (27): 5500 - 5508, 2005.
- 5 – SAAD M.; GARBUZENKO O. B.; BER E.; CHANDNA P.; KHANDARE J. J.; POZHAROV V. P.; MINKO T. Receptor targeted polymers, dendrimers, liposomes: Which nanocarrier is the most efficient for tumor-specific treatment and imaging? **J. Control. Release**, 130 (2): 107- 114, 2008.
- 6 – WENGUO CUI W.; QI M., LI X.; HUANG S.; ZHOU S.; WENG J. Electrospun fibers of acid-labile biodegradable polymers with acetal groups as potential drug carriers. **Intern. J. Pharmac.**, 361: 47–55, 2008.
- 7 – YOO H.; LEE K. H.; OH J. E; PARK T. G. J. **Control. Rel.** 68: 419, 2000.
- 8 – NAIR L.S.; C.T. LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progr. Polym. Sci.**, 32 (8-9): 762 - 798, 2007.
- 9 – BARBANTI S. H.; ZAVAGLIA C. A. C.; DUEK E. A. R. Bioresorbable Polymers in Tissue Engineering. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 15 (1): 13-21, 2005.
- 10 – JAIN R.; SHAH N.; MALICK A. W.; RHODES C. T. Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. **Drug Develop. Ind. Pharm.**, 24 (8): 703 - 727, 1998.
- 11 – PACHENCE J. M.; BOHRER M. P.; KOHN J. **Biodegradable Polymers. Principles of Tissue Engineering.**, 3 ed., 2007. Cap. 23, p. 323 - 339.
- 12 – PARK J. H.; LEE S.; KIM J-HO; PARK K.; KIM K.; KWON I. C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy. **Prog. Polym. Sci.**, 33: 113 - 137, 2008.

- 13 – REZWAN K.; CHEN Q. Z.; BLAKER J. J.; BOCCACCINI A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials.**, 27 (18): 3413 - 3431, 2006.
- 14 – CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros**. 1 ed. São Paulo: Artliber, 2002. 183 p.
- 15 – WUNDERLICH B., EA TURI. **Thermal Characterization of Polymeric Materials**; vol. 1, 2nd ed., Academic Press: San Diego, 1981, p 380.
- 16 – YANJUN CUI; XIAOMEI MA; XIAOZHEN TANG; YINPEI LUO. Synthesis, characterization, and thermal stability of star-shaped poly(ϵ -caprolactone) with phosphazene core. **Eur. Polym. J.**, 40 (2): 299 - 305, 2004.
- 17 – KWEON H. Y.; YOO M. K.; PARK I. K.; KIM T. H.; LEE H. C.; LEE H.-S.; OHC J.-S.; AKAIKED T.; CHO C.-S. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**, 24 (5): 801 - 808, 2003.
- 18 – COOMBES A. G. A.; RIZZI S. C.; WILLIAMSON M.; BARRALET J.E.; DOWNES S.; WALLACE W. A. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery. **Biomaterials**, 25 (2): 315 - 325, 2004.
- 19 – COLOMBO P.; BETTINI R.; MASSIMO G.; CATELLANI P.L.; SANTI P.; PEPPAS N.A. Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 84, n. 8, p. 991 - 997, 1995.
- 20 – COLOMBO P.; BETTINI R.; PEPPAS N.A. Observation of swelling process and diffusion front position during swelling in hydroxylpropyl methylcellulose matrices containing a soluble drug. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 61, n. 1-2, p. 83 - 91, 1999.
- 21 – COLOMBO P.; BETTINI R.; SANTI P. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. **PSTT**, New York, 3: 6 (198 - 204), 2000.
- 22 – BRANNON-PEPPAS L. Polymers in Controlled Drug Delivery. Disponível em <<http://www.device-link.com/mpb/archive/97/11/003.html>> Acesso em julho de 2009.
- 23 – SILVERSTEIN R. M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE D. J. Tradução Alencastro R. B. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.
- 24 – NORDE W.; LYKLEMA J. Why proteins prefer interfaces. **J. Biom. Sci. Polym. Edn.** 2 (3): 183 - 202, 1991.
- 25 – BRUCK S.D. **Blood compatible synthetic polymers**. New York (EUA), Charles C. Thomas, 1974. cap. II, p. 58 - 72.
- 26 – ANDRADE J.D.; HLADY V. Plasma Protein Adsorption: The Big Twelve - *Annals New York Academy of Sciences*, p. 158, 1988.

- 27 – MURRAY R.K.; GRANNER D.K.; MAYES P.A.; RODWELL V.W. 1993 Harper's Biochemistry, Appleton & Lange, Norwalk.
- 28 – BARTH A.; SCHULZ H.; NEUBERT K. Untersuchungen zur Reinigung und Charakterisierung der Dipeptidylaminopeptidase IV. **Acta Biol. Med. Ger.**, 32 (2-3): 157–174, 1974.
- 29 – LUETSCHER J.A. Biological and medical applications of electrophoresis. **Physiol. Rev.**, 27: 621 - 642, 1947.
- 30 – VROMAN L.; ADAMS AL; KLINGS M; FISCHER GC; MUNOZ PC; SOLENSKY RP. Reactions of formed elements of blood with plasma proteins at interfaces. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 283: 65 - 75, 1977.
- 31 – MOORE W.J. **Físico-química**, v. 2 , São Paulo, Edgard Blücher, 1976.
- 32 – DA SILVA A. R. P. **Estudo das propriedades bioquímicas de sistemas poliméricos arborescentes PGDL-AAS para o tratamento do câncer**. 2008.142 f. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2008.
- 33 – RATNER BD. The blood compatibility catastrophe. **J. Biomed. Mater. Res.**, 27: 283 – 287, 1993.
- 34 – PACKHAM MA; MUSTARD JF. **Blood platelet function and medicinal chemistry**. New York, Elsevier, 1984. p. 61–128.
- 35 – HONG J.; NILSSON E.K.; REYNOLDS H.; LARSSON R.; NILSSON B. A new in between whole blood and biomaterials. Studies of platelet and coagulation activation and McGraw-Hill, 1995. p. 116 –1225.
- 36 – CASTRO H. C.; BOURGUINHON S; RODRIGUES C. R.; SANTOS D. O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Bras. Patol. Med. Lab.**, 42 (5): 321 – 332, 2006.
- 37 – STRYER L. **Bioquímica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 881 p.
- 38 – GAN Z.; FUNG J.; JING X.; WU C.; KULICHE W.K. A novel laser light-scattering study of enzymatic biodegradation of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles. **Polymer**, 40: 1961 – 1967, 1999.
- 39 – KUKKARNI A.; REICHE J.; HARTMANN J.; KRATZ K.; LENDLEIN A. Selective enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) containing multiblock copolymers. **E. J. Pharm. Biopharmac.**, 68: 46–56, 2008.
- 40 – LIN W. Comparison of thermal characteristics and degradation properties of ϵ -caprolactone copolymers. **J. Biomed. Mater. Res.**, 47: 420 – 423, 1999.
- 41 – K-E. JAEGER; B. W. DIJKSTRA; M. T. REETZ. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases **Annual Rev. Microbiology**, 53: 315–351, 1999.

- 42 – U. DEREWENDA; L. SWENSON; R. GREEN; Y. WEI; G.G. DODSON; S. YAMAGUCHI; M.J. HAAS; Z.S. DEREWENDA. An unusual buried polar cluster in a family of fungal lipases. **Nature Structural Biology**, 1: 36 – 47, 1994.
- 43 – KYGER EM.; WIEGAND RC.; LANGE LG. Cloning of the bovine pancreatic cholesterol esterase/ lysophospholipase. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, 164 (3): 1302–1309, 1989.
- 44 HANSSON L.; BLACKBERG L.; EDLUND M.; LUNDBERG L.; STROMQVIST M.; HERNELL O. Recombinant human milk bile salt-stimulated lipase. Catalytic activity is retained in the absence of glycosylation and the unique proline-rich repeats. **J. Biol. Chem.**, 268 (35): 26692–26698, 1993.
- 45 – NICHOLLS A.; SHARP KA.; HONIG B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. **Proteins**, 11 (4): 281–296, 1991.
- 46 – Disponível em <<http://www.biotec.rwth-aachen.de/biokat/english/Hydrolases.htm>>. Acesso em 20 julho 2009.
- 47 – MICHAELIS L.; MENTEN M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. **Biochem. Z.** 49, 333–369, 1913.
- 48 – LINEWEAVER H.; BURK D. Determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.** 56, 658–666, 1934.
- 49 – PARK Y. J.; Y., LEE Y. M.; PARK S. N.; SHEEN S. Y.; CHUNG C. P.; LEE S. J. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. **Biomaterials**, 21(2): 153–159, 2000.
- 50 – TSAPIKOUNI T. S.; Y. F. MISSIRLIS. Protein-material interactions: From micro-to-nano scale. **Mat. Sci. Engin.**, B In Press, Corrected Proof, 2008.
- 51 – GIACOMELLI C. E.; BREMER M. G. E. G.; NORDE W. *ATR-FTIR* Study of IgG Adsorbed on Different Silica Surfaces. **J. Coll. Inter. Sci.**, 220 (1): 13-23, 1999.
- 52 – KATO K.; KANAJI T.; RUSSELL S.; KUNICKI T.J.; FURIHATA K.; KANAJI S., MARCHESE P.; REININGER A.; RUGGERI Z.M.; WARE J. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. **J. The American Society of Hematology**, 101: 1701-1707, 2003.
- 53 – YOUNG BR; LAMBRECHT LK; COOPER SL. Plasma proteins: their role in initiating platelet and fibrin deposition on biomaterials. In Cooper SL, Peppas NA eds. *Biomaterials: interfacial phenomena and applications*. Advances in Chemistry Series 199. Washington DC. 1982.

7. Conclusões

A síntese, caracterização e o estudo das propriedades do polímero PLC* foi realizado através de ensaios *in vitro* com o objetivo de avaliar a sua aplicabilidade na construção de dispositivos implantáveis para regeneração de tecidos e como veículo para liberação de fármacos.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

1. A síntese do PCL* foi efetuada com bom rendimento. Os resultados da espectroscopia ^1H -RMN e ^{13}C -RMN confirmaram a estrutura de três braços do polímero (PCL triol) e o nível de substituição do núcleo de glicerol.
2. Através da análise por GPC observa-se que o PCL* apresenta uma faixa de distribuição de massas molares unimodal, isto é, um só pico de distribuição de massas molares, com índice de polidispersão igual a 1,53. Os valores de massa molar do polímero foram da ordem de 10^3 g/mol caracterizando-o como polímero de baixo peso molecular, o que poderá propiciar uma maior velocidade em sua biodegradação relativamente ao polímero PCL linear e de peso molecular mais elevado.
3. O resultado da análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) indicou uma temperatura de transição vítrea de $-64,3^\circ\text{C}$, mostrando que o PCL* é um polímero maleável à temperatura ambiente e corporal, e conseqüentemente deverá possuir alta permeabilidade aos fluidos fisiológicos, propriedades estas que poderão ser interessantes para a liberação controlada de fármacos e dispositivos implantáveis biorreabsorvíveis.
4. A espectroscopia de infravermelho possibilitou a análise da microestrutura do polímero através da identificação de seus grupos funcionais e a pureza do produto obtido.
5. O resultado da adsorção de proteínas séricas HSA, HFb e IgG nas superfícies de PCL* e PCL linear mostrou que o PCL* adsorve uma quantidade de albumina humana significativamente mais alta relativamente às proteínas HFb e IgG. Isto mostra que o PCL* possui uma maior tendência a hemocompatibilidade relativamente ao polímero linear, provavelmente devido à sua estrutura globular, mimetizante das proteínas séricas.
6. Os ensaios de citotoxicidade contra células de mamíferos em condições *in vitro* indicam que o polímero PCL* é biocompatível.
7. A microscopia eletrônica de varredura e a microscopia de epifluorescência mostraram que as superfícies de PCL* e PCL linear apresentam baixa tendência à adesão de plaquetas.

Observou-se um pequeno número de plaquetas sem alteração de seu citoesqueleto indicando que o PCL* e PCL apresentam hemocompatibilidade.

8. Os ensaios de biodegradação mostraram que o PCL* é mais susceptível à degradação enzimática do seu análogo linear.

9. As análises de AFM evidenciaram a adsorção das proteínas séricas sobre a superfície do PCL*. Dada a natureza química da microestrutura do PCL* o processo de adsorção protéica parece ser favorecido por interações hidrofóbicas ou de van der Waals.

8. Perspectivas Futuras

De acordo com informações da empresa Fixomed [1] o uso de implantes biorreabsorvíveis no Brasil ainda é pouco difundido, sendo o consumo médio de aproximadamente 10%, devido ao alto custo destes implantes quando comparados a implantes de titânio. Nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro o consumo médio de implantes biorreabsorvíveis em cirurgias crânio maxilofaciais é de aproximadamente 25% e 20% respectivamente. No Brasil o SUS não custeia este tipo de material. Os valores aproximados de parafusos biorreabsorvíveis de até 2,0 mm de diâmetro para fixação de fraturas crânio faciais variam de R\$700,00 a R\$3.000,00 cada parafuso.

A continuidade das pesquisas com o polímero policaprolactona estrela (PCL*) é de grande importância para o desenvolvimento de implantes para aplicação na área ortopédica e para o desenvolvimento de tecnologias para produção destes implantes no Brasil, pois atualmente a técnica de produção é dominada por países da Europa e Estados Unidos. Isto representaria um grande avanço tecnológico para o Brasil e possibilitaria uma redução considerável nos custos de obtenção destes implantes permitindo maior acesso a esta tecnologia por parte da população de baixa renda.

Considerando o exposto, as perspectivas para continuidade deste trabalho seriam:

- i) Fabricar parafusos e placas de polímero PCL* e avaliar suas propriedades mecânicas com vistas à sua aplicação na reparação de tecido ósseo.
- ii) Estudar as propriedades biológicas do PCL* quanto à sua atividade osteoindutora em ensaios *in vitro* e *in vivo*.
- iii) Analisar a biodegradação e o metabolismo do PCL* em condições *in vivo*.
- iv) Estudar um modelo animal para a avaliação da adsorção e adesão plaquetária em ensaios *in vivo*.
- v) Incorporar antibióticos na estrutura do PCL* e analisar o processo de liberação controlada. Esta etapa permitirá o projeto de sistemas bioativos que poderão contribuir para o projeto de cimentos ortopédicos.
- vi) Aplicar o PCL* para a obtenção de redes interpenetrantes que propiciem a recuperação de nervos periféricos.

Glossário

Acetil coenzima A (Acetil CoA) – molécula proveniente do metabolismo dos carboidratos, lipídeos e aminoácidos. É a fonte de energia para o ciclo do ácido cítrico (ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo de Krebs). É constituída de um grupo acetil de dois carbonos unidos de forma covalente a coenzima A.

Angiogênese: consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir da proliferação de células endoteliais (células de revestimento dos vasos sanguíneos) diferenciadas de um vaso pré-existente.

Apoptose (morte celular programada): processo de morte celular caracterizado pela clivagem do DNA, condensação e fragmentação nuclear e formação de bolhas na membrana que induz a fagocitose da célula sem provocar resposta inflamatória. Está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos.

Articulação glenoumeral: principal articulação do ombro. É uma articulação que possui grande mobilidade e é instável, do ponto de vista mecânico. A sua estabilidade é mantida por um “Sistema Passivo”, composto pelo complexo capsulo ligamentar Glenoumeral e um “Sistema Ativo”, representado pelos músculos e tendões do manguito do rotador.

Artrodese: cirurgia na qual uma articulação é fundida na posição, prevenindo, assim a dor que se origina de um movimento. É uma indução artificial da ossificação de uma articulação entre dois ossos através de cirurgia.

Artroplastia: procedimento cirúrgico de uma articulação para restituir-lhe o quanto possível à mobilidade e função e para a melhora do quadro doloroso.

Artroscopia: procedimento para examinar o interior de uma articulação por meio de um artroscópio.

Calcâneo: osso que forma o calcanhar dos mamíferos bípedes. Nos humanos esse osso está localizado no tarso. É um osso curto pertencendo ao esqueleto apendicular.

Cartilagem hialina: cartilagem encontrada no disco epifisário, permitindo o crescimento longitudinal dos ossos. No adulto, também está presente como unidade esquelética na traquéia, nos brônquios, na laringe, no nariz e nas extremidades das costelas.

Células fagocitárias (fagócitos): células com uma linhagem comum na medula cuja função primária é a fagocitose. Estas células funcionam como acessórios nas fases de reconhecimento e de ativação de respostas imunes adquiridas e como células efetoras da imunidade inata e da imunidade adquirida. Os fagócitos mononucleares funcionam no sangue em uma forma incompletamente diferenciada chamada monócitos e, quando chegam aos tecidos, amadurecem até macrófagos.

Células Osteoprogenitoras (osteogênicas): células que se diferenciam em osteoblastos que são os responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos (colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea.

Chitosan: polissacarídeo encontrado no exoesqueleto de crustáceos.

Ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico) – série de reações químicas que acontecem na célula com a finalidade de oxidar a acetil CoA a duas moléculas de CO₂. É uma parte do metabolismo dos organismos aeróbios e anaeróbios.

Citocinas: são proteínas produzidas por tipos celulares muito diferentes que medeiam as reações inflamatórias e imunes. As citocinas são os principais mediadores da comunicação entre as células do sistema imune.

Citotoxicidade: capacidade de um material exercer a morte de células.

Condrócitos: são células que constituem o tecido cartilaginoso.

Fator de von Willebrand (vWF): proteína que circula no plasmática de alto peso molecular, produzida por células endoteliais e megacariócitos que é parte do complexo fator VIII/fator von Willebrand. Possui receptores para colágeno, plaquetas, e atividade ristocetina, como também determinantes antigênicos imunologicamente distintos. Funciona na adesão de

plaquetas ao colágeno e formação do tampão hemostático. O tempo prolongado de sangramento na doença de Von Willebrand é devido à deficiência deste fator.

Iatrogenia – qualquer alteração patológica provocada no paciente por um procedimento médico equivocado.

Imunogenicidade: capacidade de induzir uma resposta imune detectável.

Imunoglobulina (Ig, anticorpo): um tipo de molécula glicoprotéica também chamada de Ig, produzida por linfócitos B que ligam antígenos, muitas vezes com alto grau de especificidade e de afinidade. Os anticorpos secretados executam várias funções efetoras, incluindo neutralização de antígenos e promoção de destruição de microrganismos dependente de leucócitos.

Interleucina 6 (IL-6): citocina produzida por fagócitos mononucleares ativados, células endoteliais e fibroblastos, que funciona tanto na imunidade inata quanto na adquirida. Estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, bem como o crescimento dos linfócitos B produtores de anticorpos.

Linfócito: tipo de leucócito ou glóbulo branco presente no sangue fabricado pela medula óssea vermelha. Os linfócitos estão envolvidos na resposta imune adquirida e consistem em duas classes funcionais de células: o linfócito T, que está envolvido em processos de imunidade celular e na regulação da síntese de anticorpos; o linfócito B, que participa do processo de imunidade humoral e é o precursor da principal célula formadora de anticorpos do organismo – o plasmócito.

Manguito rotador: é um grupo de músculos e seus tendões que age para estabilizar o ombro. É constituído por um grupo de quatro músculos: o supra-espinhal, infra-espinhal, redondo menor e subescapular.

Macrófago: célula fagocítica localizada nos tecidos, derivada dos monócitos do sangue, que desempenha importantes papéis nas respostas imunes inatas e adquiridas, efetuando a fagocitose de elementos estranhos ao corpo.

Neutrófilos: classe de leucócitos circulantes, também chamado leucócito polimorfonuclear (PMN), que é recrutado para os locais onde há inflamação, sendo capaz de fagocitar microrganismos digerindo-os enzimaticamente.

Osteocondução: é caracterizada pelo crescimento ósseo por aposição do osso existente ou sobre o mesmo. Esse processo para ocorrer necessita de osso ou células mesenquimais diferenciadas.

Osteoindução: um material osteoindutivo auxilia a reparação de uma ferida óssea induzindo a formação de novo tecido através da diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos devido à presença de fatores indutores da formação óssea.

Osteogênese: o processo de formação óssea.

Osteopenia: patologia que consiste na diminuição da densidade mineral dos ossos, conseqüente à predominância do desgaste ósseo normal sobre a síntese de matriz óssea.

Osteotomia: incisão cirúrgica de um osso, principalmente para aliviar uma dor articular ou com objetivo de restaurar um osso, consolidar uma fratura ou por anomalias congênicas ou adquiridas.

Osteossíntese: redução cirúrgica das fraturas pela união dos fragmentos ósseos com auxílio de parafusos, fios, placas, hastes metálicas ou outros meios mecânicos. Este material é geralmente retirado quando a fratura está consolidada.

Scaffolds: suporte que permite o crescimento de células.

Talo (tálus): osso do pé dos mamíferos que articula com os ossos da perna (tíbia e fíbula) formando o tornozelo.

Vasculogênese: formação de novos vasos sanguíneos *in situ*, em local onde não há vasos, através de estímulo de proliferação de angioblastos (células precursoras do endotélio), originários do mesoderma esplâncnico.