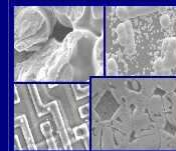




PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia  
Faculdade de Física  
Faculdade de Química



PGETEMA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE IN  
VITRO DE POLIURETANO COMO BIOMATERIAL NA ENGENHARIA TECIDUAL.**

**CHRISTIAN VIEZZER**

BIÓLOGO

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre**

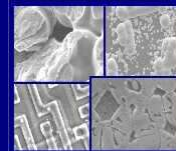
**Março, 2009**



PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia  
Faculdade de Física  
Faculdade de Química



PGETEMA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE IN  
VITRO DE POLIURETANO COMO BIOMATERIAL NA ENGENHARIA TECIDUAL.**

**CHRISTIAN VIEZZER**

**BIÓLOGO**

ORIENTADORA: PROF(A). DR(a). SANDRA MARA EINLOFT

CO-ORIENTADORA: PROF(A). DR(a). DENISE CANTARELLI MACHADO

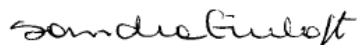
Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre  
Março, 2009**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA  
CITOCOMPATIBILIDADE IN VITRO DE POLIURETANO  
COMO BIOMATERIAL NA ENGENHARIA TECIDUAL**

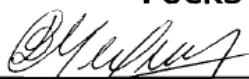
**CANDIDATO: CHRISTIAN VIEZZER**

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de *MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS* e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós - Graduação em Engenharia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.



---

**DRA. SANDRA MARA OLIVEIRA EINLOFT – ORIENTADORA –  
PUCRS**



---

**DRA. DENISE CANTARELLI MACHADO – CO-ORIENTADORA –  
PUCRS**

**BANCA EXAMINADORA**



---

**DR. JADERSON COSTA DACOSTA - PUCRS**



---

**DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE – PGETEMA/PUCRS**

*O último esforço da razão é reconhecer que existe uma infinidade de coisas que a ultrapassam.*

*(Pascal)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus Pais, por não me deixarem faltar nada e me ensinarem a ser uma pessoa de valores. A minha esposa Débora Nobre, por toda a paciência, apoio, compreensão e entusiasmo para que este trabalho se realizasse.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Providencia Divina por estar sempre presente na minha vida, guiando-me com a sua Luz e tornando tudo possível;

Agradeço a minha orientadora professora Dr<sup>a</sup>: Sandra Mara Einloft, por todo apoio, pela credibilidade, orientação e confiança em mim depositada, o que tornou possível a realização deste projeto;

Em especial a minha co-orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Denise Cantarelli Machado que abriu as portas desse mundo fantástico que é a Ciência, que sempre acreditando e incentivando mostrou-me os caminhos da aprendizagem e do conhecimento acadêmico.

As Professoras (Rô e Jeane) e aos colegas do Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) - PUCRS que sempre me auxiliaram na obtenção dos polimeros e conhecimento prestado;

Um especial agradecimento as colegas e amigas Vanusca e Tassiani pela contribuição com seus conhecimentos e “mão de obra”;

A todos os colegas dos Laboratórios de Biologia Celular e Molecular do IPB - PUCRS, pela compreensão, amizade e ajuda nos momentos de dificuldades;

Aos professores e funcionários do PGTEMA – PUCRS e pela contribuição para que este trabalho pudesse ser feito,

Ao PRPPG e ao IPB pelo suporte e toda a sua estrutura.

# ÍNDICE

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>5</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Considerações Gerais .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Objetivos Específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Biomateriais.....</b>	<b>18</b>
3.1.1. Biocompatibilidade.....	20
3.1.2. Polímeros sintéticos biodegradáveis.....	21
<b>3.2. Engenharia Tecidual (ET) .....</b>	<b>22</b>
3.2.1. Matriz Extracelular .....	24
<b>3.3. Poliuretanos como biomateriais.....</b>	<b>25</b>
3.3.1. Poliuretanos (PUs).....	25
3.3.2. Biocompatibilidade dos poliuretanos .....	29
3.3.3. Poliuretanos a partir de poli (caprolactona) - PCL .....	30
3.3.4. Avaliação de citotoxicidade em Biomateriais .....	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. Síntese do Polímero.....</b>	<b>34</b>
4.1.1. Preparação do filme de PU.....	35
<b>4.2. Caracterização do Polímero .....</b>	<b>36</b>

4.2.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) .....	36
4.2.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ...	36
4.2.3. Ressonância Magnética Nuclear – $^1\text{H}$ ( $^1\text{H}$ -RMN).....	36
<b>4.3. Avaliação da Citotoxicidade in vitro .....</b>	<b>37</b>
4.3.1. Cultura de Células .....	37
4.3.2. Teste por Meio de Extração.....	37
4.3.3. Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT .....	38
<b>4.4. Avaliação da adesão Celular sobre o filme de PU.....</b>	<b>39</b>
<b>4.5. Análise estatística .....</b>	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>41</b>
5.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) .....	41
5.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	42
5.3. Ressonância Magnética Nuclear – $^1\text{H}$ ( $^1\text{H}$ -RMN).....	45
5.4. Citotoxicidade pela redução do MTT.....	47
5.5. Adesão celular .....	51
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>57</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.2.1 Principais células envolvidas na resposta do hospedeiro. As variáveis intensidade e tempo são dependentes do tamanho da lesão criada no momento da implantação, tamanho, forma e das características físicas e químicas do biomaterial (Anderson, 2001).....	23
Figura 3.3.1. Estrutura da cadeia principal de um poliuretano.....	27
Figura 3.3.2. Estrutura da cadeia poliuretânica ( Dodge, 2003; Guelcher, 2008). ....	28
Figura 4.1.1- Sistema reacional utilizado para a síntese do polímero de poliuretano.	35
Figura 5.2.1 Espectro de Infravermelho do (a) polímero de poliuretano (PU), (b) poli(caprolactona) (PCL) e (c) hexametileno diisocianato (HDI).....	42
Figura 5.5.1.Células de fibroblastos sobre filme de PU em 24h de cultura: (A) aumento de 50x e (B) aumento de 100x.....	51
Figura 5.5.2.Células de fibroblastos sobre filme de PU em 48h de cultura: (A) aumento de 50x e (B) aumento de 100x.....	51
Figura 5.5.3.Células de fibroblastos sobre filme de PU em 72h de cultura: (A) aumento de 50x e (B) aumento de 100x.....	52
Figura 5.5.4. Células de fibroblastos sobre placa de cultura (poliestireno) aumento de 100x. ....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1.1. Massas molares ( $M_w$ e $M_n$ ) do polímero de poliuretano (PU). ....	41
Tabela 5.2.1. Atribuições das bandas referentes ao espectro do PU, PCL e HDI. ....	43
Tabela 5.4.1. Valores da média e desvio padrão de absorbância nos períodos de 24, 48 e 72h. ....	47
Tabela 5.4.2. Valores da média e desvio padrão de porcentagem de viabilidade celular nos períodos de 24, 48 e 72h. ....	48

## LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Uso de Biomateriais na área médica .....	19
Quadro 3.3.1. Principais poliois utilizados para síntese de PU biodegradáveis (Guelcher, 2008). .....	26
Quadro 3.3.2. Principais poliisocianatos utilizados para síntese de PU biodegradáveis (Guelcher, 2008). .....	27
Quadro 4.3.1. Escala graduada para Teste de Meio de Extração (ME).....	39

## LISTA DE SÍMBOLOS

<sup>1</sup> H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear	
ATCC	American Type Culture Collection	
DBTDL	Dibutil dilaurato de estanho	
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco	
DPBS	Solução salina tamponada com fosfato	
ECM	Matriz extracelular	
FAK	Focal Adhesion Kinase (quinase de adesão focal)	
FTIR	Fourier transform infrared (Infravermelho por Transformada de Fourier)	
GPC	Gel Permeation chromatography (cromatografia de permeação em gel)	
HDI	Hexametileno diisocianato	
HE	Hematoxilina e Eosina	
HMDI	4,4- dicitlohexametileno diisocianato	
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta performance)	
IP	Índice de polidispersão	
ISO	International Standardization for Organization	
MAPK	(Mitogen-activated protein kinase) proteína quinase ativada por mitógeno	
ME	Meio de extração	
Mn	Massa molar numérica media	g/mol
MPa	Mega Pascal	kgf/cm <sup>2</sup>
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio	
Mw	Massa molar ponderal média	g/mol
OD	Optical density (densidade ótica)	nm
PCL	Poli(caprolactona)	
PEG	Poli(etileno glicol)	
PU	Poliuretano	
Ras	Proteína G pequena	
THF	Tetrahidrofurano	
δs	Deformação angular simétrica	
vas	estiramento assimétrica	
vs	Estiramento simétrico	

## RESUMO

VIEZZER, Christian. **Síntese, caracterização e avaliação da citocompatibilidade in vitro de poliuretano como biomaterial na engenharia tecidual.** Porto Alegre - 2009. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A utilização de polímeros sintéticos na fabricação de biomateriais tem despertado a atenção de muitos pesquisadores, visando a criação de implantes que possam auxiliar na regeneração tecidual, através do contato de tipos celulares específicos com os polímeros sintéticos biodegradáveis. Os poliuretanos (PU) são considerados como um dos biomateriais mais versáteis atualmente utilizados devido suas ótimas propriedades mecânicas e sua compatibilidade tecidual. No presente trabalho, foi estudada a síntese de poliuretanos para uso como biomateriais utilizando hexametileno diisocianato e poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL). O polímero sintetizado foi caracterizado por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN). A sua citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT), também foi avaliado a adesão celular in vitro com fibroblastos de camundongos. Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram a citocompatibilidade do polímero de PU que não interferiu no processo de adesão e proliferação celular.

Palavras-Chaves: Biomateriais, Poliuretanos, Citocompatibilidade.

## ABSTRACT

VIEZZER, Christian. **Synthesis and characterization and in vitro evaluation of polyurethane as biomaterial for tissue engineering.** Porto Alegre. 2009. Master. Pos-Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The use of synthetic polymers to manufacture biomaterials has attracting attention of many researchers, aiming to develop of implants that can improve tissue regeneration by contact with specific cellular types in contact with biodegradable synthetic polymers. Polyurethanes (PU) are considered one of the most versatile biomaterials at present, due to it good mechanical properties and its tissue compatibility. In the present work the synthesis of poliurethanes to by use as biomaterials utilizing hexamethylene diisocyanate (HDI) and poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) was evaluated. The synthesized polymer was characterized by Gel Permeation Chromatography (GPC), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ). In vitro cytotoxicity was also evaluated by tetrazolium salt reduction assay (MTT) and in vitro cellular adhesion with mouse fibroblast cells. The results obtained in confirmed the cytocompatibility of the PU polymer and that it did interfer with cell adhesion and proliferation.

Key-words: Biomaterials, Polyurethane, Cytocompatibility.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Considerações Gerais

Biomateriais são uma parte importante dos cerca de 300.000 produtos para uso na área da saúde. No ano 2000, o mercado mundial de biomateriais foi estimado em 23 bilhões de dólares, com uma taxa de crescimento maior que 12% ao ano, chegando a movimentar em 2005 mais de 40 bilhões de dólares. No Brasil, a maioria das empresas do setor são de pequeno ou médio porte ou são subsidiárias de grandes corporações (Soares, 2006). A aplicação de materiais poliméricos biodegradáveis para finalidades médicas vem crescendo rapidamente, aplicando-se em diversas áreas biomédicas como, por exemplo, engenharia tecidual (ET), implantes de dispositivos médicos, órgãos artificiais, próteses, oftalmológica, odontológica, reparo ósseo e em outros campos diversos de atuações médicas. (Sittinger, 1996; Yang, 2007; Nichols, 2008).

Langer e Vacanti (1993) definem ET como sendo um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos de modo que estes restaurem, mantenham ou possam melhorar a função do tecido ou mesmo do órgão por inteiro. A ET é hoje fundamental ao exercício da medicina regenerativa e o mercado potencial de produtos desenvolvidos via ET como pele, osso, cartilagem, entre outros tipos de tecidos é estimado em cerca de 100 bilhões de dólares ao ano (Woodfield, 2007).

Deste modo, surge a necessidade de novos materiais que sirvam como matrizes adequadas aos locais de reparo para regeneração do tecido lesado,

proporcionando uma superfície adequada para a adesão, proliferação e diferenciação celular, minimizando as respostas inflamatórias inerentes ao organismo hospedeiro frente ao material utilizado. Deste modo, a ET usa a combinação de células, novos materiais, fatores bioquímicos e físico-químicos para melhorar ou substituir as funções biológicas do tecido lesado (Vert, 2007).

Entretanto, os tecidos envolvidos exigem certas propriedades mecânicas e estruturais para suas funções adequadas, por isso é fundamental o conhecimento da anatomia do tecido ou órgão de interesse, bem como suas interações biológicas. A tentativa de simular estes mecanismos nos polímeros biodegradáveis resulta não só na análise da sua composição química, mas também da sua estrutura interna e suas interações com os tecidos, tornando-os cada vez mais próximos das matrizes dos tecidos encontrados nos organismos vivos, otimizando o desenvolvimento de novos materiais para a ET. Assim os polímeros de origem sintética ou natural são agentes promissores no estudo de fabricações de novos materiais, pois estes, sendo biodegradáveis, dão suporte ao crescimento celular e são absorvidos pelo organismo a medida que o tecido lesado é regenerado, não havendo a necessidade de uma nova intervenção cirúrgica para a retirada do polímero.

No presente trabalho, foi estudada a síntese de poliuretanos para uso como biomateriais utilizando poli(caprolactona) como poliols. O polímero sintetizado foi caracterizado por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear de  $H^1$  ( $^1H$ -RMN) e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). A sua citotoxicidade também foi avaliada pelo ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT) e adesão celular em culturas *in vitro* com fibroblastos de camundongos.



## **2. OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivo principal a avaliação da citocompatibilidade in vitro do polímero de poliuretano sintetizado a partir de hexametileno diisocianato e poli( $\epsilon$ -caprolactona) diol para ser utilizado como biomaterial na engenharia de tecidos.

### **2.1. Objetivos Específicos**

A partir da síntese do poliuretano pretende-se:

- Caracterizar a sua estrutura química pelas técnicas de GPC, FTIR e  $^1\text{H-RMN}$ .
- Avaliar a citotoxicidade in vitro das células expostas a extratos do polímero.
- Avaliar a adesão celular sobre a superfície do filme do polímero in vitro.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Biomateriais**

Materiais utilizados como implantes surgiram com a necessidade de reaver as funções perdidas de partes do corpo. Relatos indicam que os Romanos, os Chineses e os Astecas usavam ouro na substituição de dentes a mais de 2000 anos atrás (Ratner, 2004). O uso de materiais na medicina somente tornou-se prático com o advento de técnicas cirúrgicas desenvolvidas pelo Dr. J. O Lister em 1860. Procedimentos cirúrgicos anteriores, que envolviam biomateriais ou não, eram geralmente mal sucedidos em consequência das infecções que eram exacerbadas na presença destes materiais. Placas de ossos foram introduzidas no início do século XX com objetivo de fixar fraturas de ossos longos. Em 1930 foram introduzidos aços inoxidáveis e ligas de cromo e cobalto, que obtiveram grande sucesso na fixação de fraturas, aparecendo às primeiras cirurgias de substituição de articulação (Bronzino, 1999). Quanto aos polímeros, pilotos de aviões da II Guerra Mundial que foram feridos por fragmentos de plástico (polimetilmetacrilato) do “cockpit” das aeronaves não sofreram reações crônicas adversas devido a presença dos fragmentos dos plásticos no corpo, tornando o uso do polimetilmetacrilato (PMMA) difundindo no uso de implante na substituição de córnea e para substituições de ossos do crânio devido a trauma. Continuando com os avanços nos materiais e técnicas cirúrgicas, em 1950 foram feitos os primeiros experimentos de substituição de vaso sanguíneo, em 1960 da válvula do coração e também de articulações cimentadas (Park, 2000). No início do século passado, plásticos sintéticos tornaram-se disponíveis e a sua facilidade de fabricação levou a muitos implantes experimentais, dando início ao entendimento sobre estes materiais (Ratner, 1999), e nas últimas décadas o desenvolvimento destes materiais teve uma

influência considerável devido os avanços nas muitas áreas da ciência e biotecnologia.

Uma das definições correntes diz que os biomateriais são materiais sintéticos ou naturais; sólidos ou, às vezes, líquidos, utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos (Helmus & Tweden, 1995; Ratner, 2004). Segundo Williams (1987), biomateriais são quaisquer substâncias (outras que não drogas) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que pode ser usada por qualquer período de tempo, substituindo parte ou todo um sistema que trata, aumenta, ou substitui qualquer tecido, órgão, ou função do corpo.

O uso de biomateriais, como indicado no Quadro 3.1, inclui a substituição de uma parte do corpo que perdeu a sua função devido a uma doença ou trauma e o uso destes materiais visando a melhoria da função, correção de anormalidades e ou até mesmo a cura. (Bronzino, 1995; Kawachi, 2000).

Quadro 3.1. Uso de Biomateriais na área médica

Área de problema	Exemplo
Substituição por doença ou dano	Osso, dente, máquina de diálise, artérias, veias, implantes de juntas de joelho
Participa na recuperação	Suturas, Fixação ortopédica
Melhorar a função	Válvula cardíaca, lentes intraoculares
Correção de função	Válvula cardíaca, próteses ortopédicas, tendões, traquéia artificial
Auxílio para diagnóstico	Agulhas, cateteres
Auxílio para tratamento	Cateteres, drenos

Adaptada de Bronzino, 1995 e Kawachi, 2000

Quanto ao tipo de material, os biomateriais podem ser polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais, que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos, que entram em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos (Jahno, 2006). A vantagem de se usar materiais poliméricos quando comparados com materiais metálicos e cerâmicos é a facilidade de manufatura, a capacidade de modelar a composição micro e macro-estrutural destes materiais, o custo razoável, bem como sua biodegradabilidade (Pathiraja, 1998; Sittinger, 1996).

Eufinger e Saylor (2001) classificaram os implantes de acordo com a fonte de obtenção. Os mesmos podem ser: (i) Autólogo: retirado do próprio paciente; (ii) Não autólogo: originário de outro ser vivo, podendo este ser: *Homólogo*: da mesma espécie; *Heterólogo*: de outra espécie; e (iii) Aloplástico: com a utilização de materiais biocompatíveis. A vantagem do implante aloplástico (utilizando materiais como resinas, polímeros, metais e cerâmicas) é que esses proporcionam estabilidade geométrica, podem ser obtidos em qualquer quantidade, os riscos da presença de agentes infecciosos são minimizados e não é necessário a retirada de um enxerto autólogo, o que aumentaria a morbidade da cirurgia e dor no período de pós-operatório.

### **3.1.1. Biocompatibilidade**

A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um biomaterial, prótese, ou equipamento médico de desempenhar uma resposta apropriada no hospedeiro em uma aplicação específica, envolvendo a aceitação de um implante artificial pelo tecido circundante e pelo organismo como um todo (Anderson, 2001). Vale lembrar que o sucesso do biomaterial no organismo não depende só de fatores como propriedade do material e o contexto em que o material é usado, mas também, outros fatores, incluindo a técnica cirúrgica e a condição de saúde do paciente (Bouillaguet, 2006).

Todavia, a avaliação da biocompatibilidade do implante, inclui a determinação da resposta imune em relação a composição do biomaterial, a composição do tecido, e em última instância, a combinação das composições do biomaterial e do tecido ao tempo de exposição do implante (Babensee, 1998). Estes fatores estão

intimamente relacionados com o comportamento celular em contato com o biomaterial e, particularmente, a adesão celular com a sua superfície (Serrano, 2004). Conseqüentemente as características do material, tais como hidrofobicidade, energia de superfície, porosidade, carga e composição química, são de fundamental importância para a resposta do tecido em contato com o biomaterial (Dewez, 1998; Khorasani, 2006; Furth, 2007).

A reprodutibilidade em termos químicos, físicos e propriedades biológicas são fatores determinantes no desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas (Zadrahala, 1999), seguido da tolerância, adesão e proliferação celular e subseqüentemente formação do novo tecido. Sendo assim, o material não deve provocar uma resposta inflamatória crônica, não pode ser imunogênico ou citotóxico e deve proporcionar propriedades mecânicas adequadas para não quebrar durante o manuseio e as atividades normais do paciente (Anderson, 2001).

### **3.1.2. Polímeros sintéticos biodegradáveis**

A utilização de polímeros sintéticos na construção de biomateriais tem despertado a atenção de pesquisadores há algumas décadas, visando a criação de implantes que possam formar novos tecidos, naturais, através do uso de tipos celulares específicos sobre polímeros sintéticos biodegradáveis (Vacanti, 1993), levando a uma integração total das células do doador e elementos mesenquimais presentes, incluindo vasos sanguíneos e tecidos conjuntivos (Mooney, 1995).

Uma classe de polímeros sintéticos biodegradáveis são os poliésteres alifáticos obtidos a partir de poli( $\alpha$ -hidróxi ácidos) tais como poli(ácido láctico), poli(ácido glícólico) e poli(caprolactona) (Lee, 2002; Sahoo, 2007; Pektok, 2008). Estes polímeros podem sofrer degradação via hidrólise ou ataque enzimático (Howard, 2002) e os subprodutos provenientes entram em rotas metabólicas celulares onde são catabolisados ou são liberados via excreção normal.

Polímeros biodegradáveis estão sujeitos ao ataque químico in vivo, os monócitos são recrutados para a superfície do implante, onde podem se diferenciar

em macrófagos e células gigantes de corpo estranho. A liberação de moléculas biologicamente ativas pela atividade dos macrófagos pode facilitar a degradação dos implantes, afetando a sua bioestabilidade (Guelcher, 2008).

O desenvolvimento de biomateriais tem como ênfase a criação de um material que permita uma resposta inerte ao tecido, produzindo componentes bioativos que forneçam uma reação fisiológica controlada no ambiente tecidual (Hench, 2002).

### **3.2. Engenharia Tecidual (ET)**

A ET é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos de modo que estes restaurem, mantenham ou possam melhorar a função do tecido ou mesmo do órgão por inteiro (Langer e Vacanti, 1993). Segundo Nichols (2008), a engenharia tecidual como alternativa para medicina regenerativa tem como função a reconstrução tecidual através de equivalentes de tecidos para reparar as funções fisiológicas perdidas devido a doenças ou injúrias, fazendo o uso de células e matrizes sintéticas ou naturais para condução e suporte do tecido em desenvolvimento, permitindo a gênese e manutenção de funções biológicas específicas.

A formação de um novo tecido envolve processos complexos cuja razão e as formas são afetadas por muitos fatores, tais fatores podem estar relacionados com o fenótipo da célula, densidade e distribuição espacial da célula (Cheng, 2006) e a superfície do biomaterial modula uma série de respostas celulares, tanto in vitro como in vivo (Keselowsky, 2004). Estas respostas incluem a adesão, sobrevivência, proliferação e diferença na expressão fenotípica (Allen, 2003; Brodbeck, 2001).

Entretanto, um dos maiores obstáculos da ET é em geral a incapacidade do corpo em aceitar o implante, levando o organismo a desencadear uma cascata de eventos para combater o corpo estranho, podendo culminar com o encapsulamento fibroso do material. Tais eventos seguem as seguintes etapas: injúria, inflamação

aguda, inflamação crônica, granulação do tecido, reação de corpo estranho e fibrose (Zdrahala, 1999). A figura 3.2.1 mostra os períodos da resposta-hospedeiro e as principais células envolvidas.

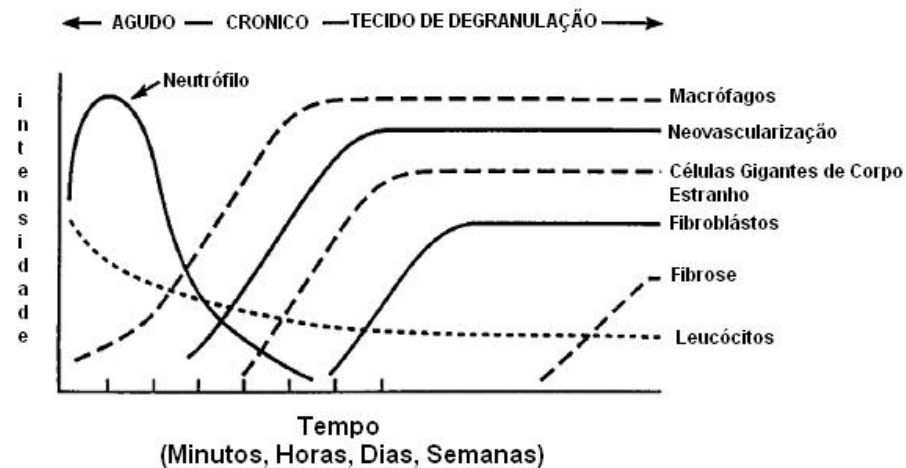


Figura 3.2.1 Principais células envolvidas na resposta do hospedeiro. As variáveis intensidade e tempo são dependentes do tamanho da lesão criada no momento da implantação, tamanho, forma e das características físicas e químicas do biomaterial (Anderson, 2001).

Segundo Grodzinski (1999) os materiais utilizados na fabricação de arcabouços para engenharia de tecidos são normalmente selecionados para proporcionar uma estrutura temporária, exibindo propriedades mecânicas e biológicas adequadas ao novo tecido formado, buscando características que os aproximem dos sistemas biológicos complexos. Numerosos materiais vêm sendo pesquisados como arcabouços para o uso em ET e no reparo de tecidos, estes incluem os polímeros naturais e sintéticos, os materiais cerâmicos e os compósitos (Hech, 2002). O uso de polímeros sintéticos para esta finalidade vem crescendo muito no meio científico, uma vez que as propriedades físicas dos polímeros podem ser modificadas de muitas maneiras. Em particular, a composição química e o arranjo da cadeia têm um grande efeito nas propriedades finais do material (Mikos, 1993; Hutmacher, 2001) e conseqüentemente, os polímeros podem ser adaptados para uma variedade de aplicações em materiais biomédicos.

Assim com o avanço da ET há a necessidade de desenvolver novos biomateriais, preferencialmente biodegradáveis, que possam fornecer um arcabouço para o crescimento, diferenciação e proliferação das células (Kirkpatrick, 2007), concentrando esforços na busca de materiais semelhantes ao tecido do doador.

### **3.2.1. Matriz Extracelular**

A matriz extracelular (ECM) é composta por uma rede complexa de macromoléculas extracelulares (Alberts, 2004), fornecendo um ambiente organizado no qual as células podem mover-se e interagir uma com as outras de forma ordenada. A ECM tem um papel chave e essencial na sobrevivência, proliferação e migração das células em seu contato (Vakonakis, 2007). A ligação da célula à matriz extracelular necessita de proteínas de adesão celular transmembrana, que atuam como receptores da matriz e conectam-na com o citoesqueleto celular (Fodor, 2003). Certos receptores de superfície celular, incluindo algumas integrinas, podem ligar os componentes da ECM desse modo aderindo indiretamente às células umas as outras por meio de suas interações com a matriz. (Lodish, 2005).

As integrinas são os principais receptores usados pelas células para ligarem-se à ECM que quando ativadas pela matriz, também atuam como transdutores de sinais ativando diversas vias de sinalização intracelular (DeMali, 2003). Estudos recentes demonstram que ECM influencia profundamente no programa celular de crescimento, diferenciação e apoptose. A promoção ou supressão do crescimento pela ECM está associado igualmente com a estimulação ou inibição dos mediadores chaves responsáveis pelo ciclo celular, incluindo ciclinas, genes de respostas primárias (Boudreau, 1999) e vias de transdução de sinal intracelular tais como FAK, MAPK e Ras entre outras. (Hill, 1995; Fodor, 2003; Alenghat, 2002; Berrier, 2007).

Com isso há uma relevante importância no entendimento das interações das células com a superfície dos biomateriais, e que ainda, a sua compreensão permitirá que os biomateriais sejam desenvolvidos de acordo com a necessidade dos tecidos o a ser regenerado, visando uma melhor integração do novo tecido, evitando uma rejeição e conseqüentemente uma melhor qualidade de vida para o paciente.



### 3.3. Poliuretanos como biomateriais

#### 3.3.1. Poliuretanos (PUs)

Os PUs foram descobertos em 1937 quando Heinrich Rinke sintetizou o 1,6-hexametileno diisocianato (HDI) e Otto Bayer desenvolveu o processo de poliadição de diisocianatos (Barikani, 2007; Santerre, 2005). Os PUs são compostos de blocos de segmentos alternados flexíveis e segmentos rígidos unidos por ligações uretano (Who, 2000). Elastômeros de poliuretanos são considerados como um dos mais versáteis biomateriais atualmente utilizados devido suas ótimas propriedades mecânicas, particularmente de força elástica e resistência a fadiga e sua compatibilidade sanguínea e com outros tecidos (Lamba, 1998; Zhang, 2000). Os segmentos de PU podem ser representados por três componentes básicos, um diisocianato, um poliálcool e um extensor de cadeia, este último nem sempre se faz necessário. O poliálcool (segmento flexível) é uma molécula, geralmente de cadeia longa com uma temperatura de transição vítrea baixa ( $<25^{\circ}$ ) e terminada por um grupo hidroxila (-OH). O Quadro 3.3.1 mostra os principais polióis utilizados na confecção de biomateriais. O extensor de cadeia é normalmente uma molécula pequena com grupos hidroxila ou amina, e o diisocianato é um composto de baixo peso molecular que pode reagir igualmente com o poliálcool ou o extensor de cadeia. A combinação do extensor de cadeia e os componentes do diisocianato são referidos como o segmento rígido do polímero.

Quadro 3.3.1. Principais poliois utilizados para síntese de PU biodegradáveis (Guelcher, 2008).

Nome químico	Estrutura
Poli (óxido de etileno) (PEO)	$\text{HO} \left[ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O} \right]_n \text{H}$
Poli (óxido de propileno) (PPO)	$\text{HO} \left[ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O} \right]_n \text{H}$
Poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)	$\text{HO} \left[ \left( \text{CH}_2 \right)_5 \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_n \text{O} \left( \text{CH}_2 \right)_4 \text{O} \left[ \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \left( \text{CH}_2 \right)_5 \right]_m \text{OH}$
Poli (D,L- lactideo)	$\text{HO} \left[ \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \text{-} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{-O-} \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \text{-} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_m \text{O} \left( \text{CH}_2 \right)_4 \text{O} \left[ \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{-} \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \text{-O-} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{-} \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \right]_m$
Poli (glicolideo)	$\text{HO} \left[ \text{CH}_2 \text{-} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{-O-} \text{CH}_2 \text{-} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \right]_m \text{O} \left( \text{CH}_2 \right)_4 \text{O} \left[ \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{-CH}_2 \text{-O-} \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} \text{-CH}_2 \right]_m$

Nos isocianatos o átomo de carbono apresenta-se como um centro deficitário de elétrons, o que torna estes compostos altamente reativos e suscetíveis a reações nucleofílicas. Reagem com compostos que apresentam na cadeia átomos de hidrogênio ativos, como grupos hidroxila de álcoois primários e secundários e, aminas primárias e secundárias, formando respectivamente ligações uretânicas e uréia (Wegener, 2001). Grupos hidroxila diálcoois terciários também reagem com isocianatos, mas devido ao impedimento estérico, a reatividade é baixa e a ligação uretana formada é degradada termicamente sob condições brandas (Bock, 2001). No Quadro 3.3.2 podemos ver os principais diisocianatos utilizados na síntese de poliuretanos para uso médico (Guelcher, 2008).

Quadro 3.3.2. Principais poliisocianatos utilizados para síntese de PU biodegradáveis (Guelcher, 2008).

Nome químico	Estrutura
1,6- hexametileno diisocianato (HDI)	
1,4- butano diisocianato (BDI)	
Diisocianato de éster metílico de lisina (LDI)	
Isoforona diidosianato (IPDI)	
4,4'-díciclo-hexilmetileno (H12MDI)	
4,4'-difenilmetileno diisocianato (MDI)	

Poliuretanos lineares são polímeros nos quais a estrutura da cadeia principal é composta por uma unidade aromática ou alifática R1 e R2 ligada junto ao grupo polar uretano, em que o R2 constitui um grupo alifático, aromático ou radical alicíclico derivado do monômero isocianato e R1 é um grupo complexo derivado de um polioliol como mostrado na Figura 3.3.1 (Krol, 2007).

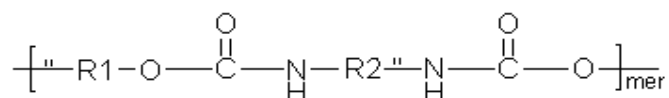


Figura 3.3.1. Estrutura da cadeia principal de um poliuretano.

A ligação uretana ( $-\text{NH}-\text{COO}-$ ) é resultado da reação entre o grupo isocianato do diisocianato ( $-\text{NCO}$ ) e o grupo hidroxila do polioliol ( $-\text{OH}$ ). Se um excesso estequiométrico de diisocianato for usado, a cadeia diuretânica é terminada em  $-\text{NCO}$  e o produto é chamado de pré-polímero com terminação  $-\text{NCO}$  (Sebenik, 2007). A Figura 3.3.2 mostra a estrutura da cadeia poliuretânica.

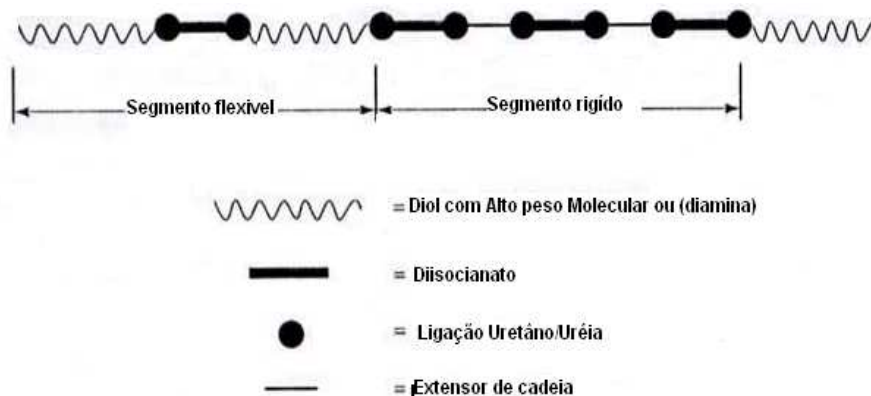


Figura 3.3.2. Estrutura da cadeia poliuretânica ( Dodge, 2003; Guelcher, 2008).

Uma característica que contribui para as muitas propriedades dos PUs é a estrutura de microfase que o polímero pode exibir (Basse, 2006; Fernandez, 2006). Fazendo com que exista um grau de imiscibilidade entre os segmentos polar rígido uretânico e os segmentos flexíveis do póliol. A formação desta microestrutura de duas fases leva a formação de regiões igualmente enriquecidas em segmentos flexíveis e rígidos (WoodHouse, 2005). Deste modo a conformação do polímero tende a minimizar a energia livre interfacial. Conseqüentemente, quando exposto ao meio polar a composição da superfície do PU terá uma proporção maior de segmentos polares rígidos. Isto se deve a mobilidade dos segmentos flexíveis (Wen, 1997; Yilgör, 2001). O grau de separação de fase entre segmentos flexíveis e rígidos influi diretamente nas propriedades físicas, mecânicas e adesivas do polímero (Bogdanov, 1999). Estas propriedades estão relacionadas à combinação dos constituintes das cadeias poliméricas, tamanho dos segmentos flexíveis, razão molar  $\text{NCO}/\text{OH}$ , tipo de extensor de cadeia e presença ou não de solventes na síntese (Hori, 1992).

### 3.3.2. Biocompatibilidade dos poliuretanos

O Poliuretano está associado como um dos melhores materiais para aplicação biomédica devido as suas ótimas propriedades mecânicas, ao seu caráter polimérico segmentado, sua vasta disponibilidade de variações geométricas e excelente compatibilidade sanguínea e tecidual (Ghosh, 2004; Hasirci, 2007). Poliuretanos biodegradáveis são formados a partir de diisocianatos alifáticos com diferentes polióis podendo citar com exemplo poli (ácido láctico) (PLLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e poli (caprolactona) (PCL) e extensores de cadeia como diois, diaminas e disulfetos (Jiang, 2007).

Em 1960 surgiu no mercado as primeiras PU com grau biomédico (Elastomer Biomer<sup>®</sup>) para implantes cardiovasculares, mas foi retirado do mercado em 1990 devido a micro-rachaduras na superfície do segmento flexível do polieter (Guelcher, 2008). Entretanto nos últimos anos uma variedade de elastômeros de PU vem sendo desenvolvidos para aplicações em ET como suporte para regenerações de tecido cardiovascular (Andrews, 2008) e músculo-esquelético (Klompaker, 1996; Kavlock, 2007), regeneração nervosa (Borkenhagen, 1998) entre outros tipos de tecidos.

Marques (2002) estudou o efeito citotóxico de extratos de compósitos de PU em células L929, avaliando a atividade mitocondrial e morfologia destas células em diferentes períodos de tempo, demonstrando que o polímero exibiu uma citocompatibilidade podendo ser usado como biomaterial.

As ligações hidrogênio entre os grupos uretanos fornecem ao polímero de poliuretano uma boa propriedade de deformação elástica (Yelgor, 2001; Guelcher, 2007), tornando interessante o seu uso em tecidos que necessitam de uma apropriada elasticidade como, por exemplo, em tecidos moles.

Hsu (2000) mostrou que fibroblastos de camundongos e células endoteliais humanas aderem e proliferam na superfície de poliuretanos, proporcionando um ótimo substrato em sua composição química e física para aplicação em enxertos vasculares.

Segundo Yin (2007) os PU elastoméricos baseadas em PCL-PEG- HDI para fabricação de tubos para regeneração de nervos periféricos em modelos in vivo possuem uma boa biocompatibilidade que, quando implantado em coelhos, em períodos de tempo curto e longo, não formam fibrose e inflamações crônicas.

Phan e colaboradores (2005) avaliaram uma membrana baseada em poliuretano (Tegaderm™) para utilização em ET em pele. Os autores confirmaram que a membrana permitia a adesão celular e o crescimento de queratinócitos, mantendo uma característica similar ao longo da proliferação, quando comparado ao controle na placa de plástico de cultura. Sugeriram que a membrana Tegaderm™ poderia ser usada e modificada para ser empregada como material para engenharia de tecidos em pele.

Estes atributos incluem um grande número de propriedades físicas e mecânicas, funcionalidade química, e diversidades nas características específicas do polímero de PU.

### **3.3.3. Poliuretanos a partir de poli (caprolactona) - PCL**

Os PUs derivados de PCL diol são considerados promissores na fabricação de implantes para uso clínico, pois apresentam pequena estabilidade hidrofílica e sofrem degradação frente a álcalis, o que torna este tipo de poliól atrativo para o uso na síntese de poliuretanos biodegradáveis. O PCL é considerado não tóxico e um material biocompatível (Kronenthal, 1975) e os produtos de sua degradação são metabolizados pelo ciclo do ácido tricarbóxico ou eliminados pela secreção renal (Kweon, 2003), mesmo que ainda não se saiba exatamente como ocorra a degradação dos poliuretanos in vivo, supõe-se que elas podem sofrer degradação nas ligações uretânicas ou uréias por ação enzimática (Elliott, 2002; Zgrahala, 1999).

Sahoo e colaboradores (2007) sintetizaram PU a partir de  $\epsilon$ -caprolactona (CL) e  $\beta$ -butiroprolactona (BL) através da polimerização por abertura de anel utilizando

catalisador de estanho. Em seu estudo demonstraram que o aumento da proporção de BL reduz a cristalinidade do polímero e conseqüentemente aumenta sua degradação, corroborando com os achados de Loh (2008), Barikani (2007) e Huang, (1989) que demonstraram que o aumento da cadeia do poliéster aumenta a taxa de degradação do polímero. Propriedades de degradação dos polímeros utilizados na ET são de crucial importância para a seleção de biomateriais bem como o sucesso na regeneração de tecidos (Sung, 2004).

O poliuretano biodegradável sintetizado a partir de 1,4- butano diisocianato (BDI), tiramina como extensor de cadeia e poli (caprolactona) com massa molecular variando de 1100 e 2700 g/mol apresentam um aumento da temperatura de fusão de 21°C para 61°C e um aumento do módulo de estocagem a 37°C de 52 para 278 MPa quando há um aumento do peso molecular do PCL, sugerindo que o aumento da cristalinidade do macrodiol de PCL contribui para as propriedades mecânicas do polímero (Kavlock, 2007).

Alperin e colaboradores (2005) demonstraram a proliferação de células-tronco embrionárias diferenciadas em cardiomiócitos sobre filmes de PU com PCL. A proliferação de miócitos mostrou uma contratilidade completa e algumas propriedades consistentes nos primeiros estágios de diferenciação de cardiomiócitos. Os autores concluíram que o filme de PU provia um material com propriedades mecânicas apropriadas para suportar a contração celular.

Zhang e colaboradores (2006) estudaram os efeitos de dois extensores de cadeia na degradação, propriedades mecânicas, hidrofobicidade, e citocompatibilidade de PUs. Dois tipos de poliuretanos biodegradáveis foram sintetizados a partir de difenilmetileno diisocianato (MDI), poli(caprolactona) (PCL) e como extensor de cadeia butanodiol (BD) ou 2,2'-(metilamino) dietanol (MIDE), utilizando o poli(lactide) (PLA) como controle negativo devido a sua taxa de degradação semelhante a do PCL. Os dois tipos de PU demonstraram ter uma citocompatibilidade e comportamentos de degradação semelhantes ao do PLA.

### 3.3.4. Avaliação de citotoxicidade em Biomateriais

Equipamentos médicos e biomateriais implantados são freqüentemente avaliados em razão de sua reatividade biológica. O cultivo de células *in vitro* constitui uma valiosa ferramenta para se conhecer os mecanismos pelos quais os biomateriais podem produzir reações adversas a nível celular, sendo aceito como um ótimo método sensível para testes de biocompatibilidade (Bricanti, 2006; Bhatia, 2008).

As culturas de células, preferencialmente obtidas de pacientes, bem como células-tronco (Vert, 2007), fibroblastos e outros tipos celulares que secretam quantidades suficientes de proteínas da matriz extracelular são mantidas por um determinado período para fornecer estruturas que sirvam para a reconstrução de tecidos lesados (Yang, 2007), simulando a matriz extracelular encontrada nos tecidos, proporcionando estrutura semelhante as dos órgãos.

Além de simular reações biológicas que ocorrem no organismo este método é considerado de baixo custo para o desenvolvimento do material (Hanks, 1996). Segundo Takamori (2006) os ensaios de citotoxicidade também podem ser utilizados na fase de desenvolvimento do produto, quando se deseja estabelecer a melhor proporção entre os componentes de um biomaterial ou quando se modifica um material já existente.

De acordo com a International Standard Organization (ISO) 10993-5 o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivo biomédico. Segundo as normas da ISO 10993-5 os testes *in vitro* são classificados em três categorias: teste de contato direto, no qual o material fica em contato direto com as células; teste de contato indireto, no qual o material fica sobre uma camada de agar que está sobre as células e os possíveis produtos citotóxicos podem se difundir pelo Agar; e finalmente o teste por meio de extração (ME) que utiliza um solvente em contato com material por um período de tempo e a medida que o material sofre decomposição, libera



esses produtos no meio (solvente) para o contato com as células e assim avaliar a sua citotoxicidade.

Testes de contato direto e indireto utilizam escores visuais da interação material-célula, nos quais os biomateriais são avaliados baseados alterações morfológicas das células, incluindo a lise celular, o arredondamento, a difusão (extensão), a proliferação e o contato célula-célula (Bhatia, 2008). Já o método de extração é utilizado como alternativa para excluir os possíveis danos causados pelas interações mecânicas com o material ou contato com o agar, conseqüentemente aumentando a sensibilidade do procedimento do teste (Bricanti, 2006).

Os tempos de exposição aos materiais testados podem ser de curta duração, envolvendo períodos de até 4 horas ou de longa duração, correspondendo a períodos de 24 horas ou mais (Barile, 1994).

Apesar dos testes *in vitro* serem dinâmicos, os mesmos não reproduzem a situação real que ocorre quando um biomaterial é enxertado *in vivo*. No entanto estes testes, fornecem informações valiosas a respeito da morfologia e proliferação celular, comportamento das células durante o período de culturas simulando o microambiente celular e molecular encontrado em uma situação específica da regeneração quando se faz o uso de biomateriais (Lorenzi, 2006; Kiripatrick, 2007). Um dos métodos utilizado para analisar esses efeitos tóxicos *in vitro* é a avaliação da atividade metabólica das células expostas aos materiais. O teste de MTT (Mosmann, 1983) é um ensaio colorimétrico quantitativo, sensível e de confiança que mensura a viabilidade, proliferação e atividade das células. Este ensaio se baseia na capacidade da enzima desidrogenase encontradas nas mitocôndrias de células vivas converterem o substrato amarelo, solúvel em água, de brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em um produto de cor púrpura, decorrente da formação de cristais de formazan, que são insolúveis em água. A quantidade do formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Al-Rubeai, 1990).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Síntese do Polímero

O poliuretano (PU) foi sintetizado utilizando os seguintes reagentes: HDI (hexametileno diisocianato, Merck); PCL ( $\epsilon$ -policaprolactona diol, MM= 2.000 g/mol, Acros Organics), DBTDL (dibutildilaurato de estanho, Miracema-Nuodex Ind.); acetona P.A. (Merck). Para o índice de acidez foi utilizado: acetona P.A. (Vetec) e solução KOH a 0,3359 M.

A reação da formação do poliuretano foi realizada em uma etapa sem a utilização de extensor de cadeia. Foi utilizado um reator de vidro com agitação mecânica acoplado a um condensador e um termopar para o controle da temperatura reacional (Figura 4.1.1).

Pesou-se 99,46 g (0,0497 mol) de PCL (Mn 2.000 g/mol) que ficou em agitação dentro do reator a 60°C, com 100 mL de solvente acetona até completa solubilização. Após, adicionou-se 0,1157g (0,1832 mmol) de DBTDL e 10,06 g (0,0598 mol) de HDI com a ajuda de um funil de adição. A razão de NCO/OH utilizada foi de 1,20. Toda a reação foi feita em atmosfera inerte de N<sub>2</sub>.

A temperatura do sistema reacional foi mantida a 60°C e para controle de consumo do NCO, após 1 hora de reação foi realizado a titulometria com N-dibutilamina resultando em 0,19% NCO não reagido (residual NCO teórico = 0,78%). Ao fim da reação foi feita uma análise por infravermelho do PU sintetizado para verificar a redução da banda característica de NCO do diisocianato ( $\approx 2.270 \text{ cm}^{-1}$ ).

Após a síntese este foi colocado em formas e mantido em vácuo para seu posterior uso.

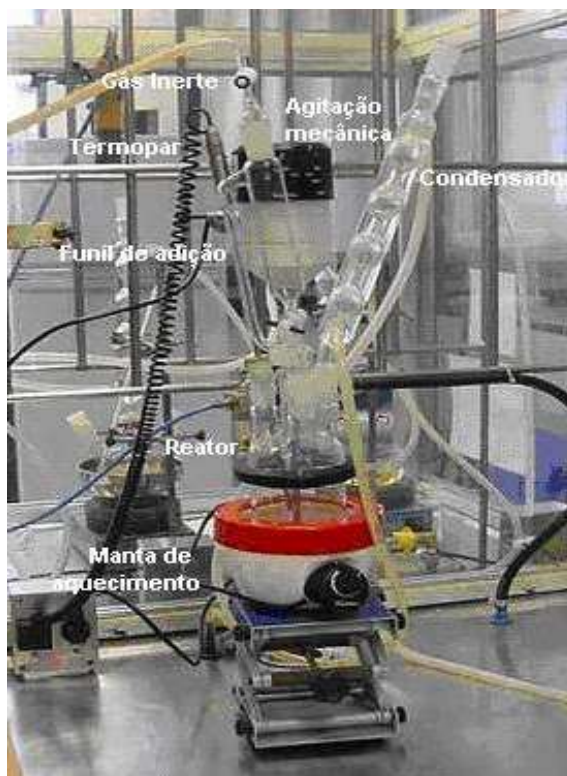


Figura 4.1.1- Sistema reacional utilizado para a síntese do polímero de poliuretano.

#### 4.1.1. Preparação do filme de PU

Para a preparação do filme de PU as amostras foram pesadas (3g) e solubilizadas em 5 mL de clorofórmio, sob agitação. Em seguida foram adicionados 3 mL da solução em uma placa de vidro, produzindo filmes de 100  $\mu\text{m}$  utilizando um estensiómetro. O solvente foi evaporado ao ar livre e após foram realizadas 24 horas de vácuo para retirada do solvente. Para a retirada do filme de PU da placa, esta foi levada a uma capela de fluxo laminar e foram adicionados isopropanol e em seguida tampão fosfato (DPBS) gelado sobre o filme de PU, fazendo com que o filme fosse liberado da placa. Todas as amostras foram lavadas três vezes em tampão fosfato para a retirada de possíveis resíduos.

## **4.2. Caracterização do Polímero**

### **4.2.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)**

As análises por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) foram realizadas com HPLC pump-1515 isocrático utilizando detector de índice de refração Waters Instruments 2412 e THF como eluente.

### **4.2.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros de FITR foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Helmer-(célula de seleneto de zinco) em valores de transmitância através do filme de PU.

### **4.2.3. Ressonância Magnética Nuclear – $^1\text{H}$ ( $^1\text{H}$ -RMN)**

Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN foram obtidos em um espectrofotômetro Varian INOVA-300-300 MHz usando clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como solvente e  $\text{SiMe}_4$ , as atribuições foram feitas em relação ao sinal do  $\text{CDCl}_3$  em 7.27 ppm. As amostras (~20 mg) foram solubilizadas em 1 mL de  $\text{CDCl}_3$ .

### **4.3. Avaliação da Citotoxicidade in vitro**

#### **4.3.1. Cultura de Células**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados levando-se em conta o uso de técnicas assépticas para minimizar a contaminação microbiana. As células de fibroblasto de camundongos NIH-3T3 obtidas pela *American Type Culture Collection* (ATCC CRL-1658) foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco), gentamicina (Gibco) (0,025 g/L), estreptomicina/penicilina (Gibco) (0,1 g/L) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) em uma estufa (Sannyo) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada 48 horas.

Depois de atingida a confluência, as células foram lavadas com tampão DPBS (Gibco), após aspirado o DBPS, foram adicionados 3 mL tripisina-EDTA 0,05% (Gibco), para cobrir toda a superfície da garrafa com a solução e em seguida o frasco foi incubado na estufa à 37°C por 3 minutos. Decorrido o tempo de incubação a cultura foi examinada no microscópio para verificar a remoção total das células da superfície da garrafa e foram adicionados 5 mL de SFB para inativar a ação da tripisina. Em seguida as células foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer e plaqueadas em quadruplicata na densidade de  $0,5 \times 10^4$  células por poço em placas de cultura de 96 poços.

#### **4.3.2. Teste por Meio de Extração**

A citotoxicidade dos filmes de PU em culturas de células NIH-3T3 foram avaliadas através do teste de meio de extração (ME) pelas normas da ISO 10993-5. Todos os testes de citotoxicidade foram avaliados nos períodos de 24, 48 e 72 horas de cultura do polímero com os fibroblastos na concentração de 100% do ME. Foram utilizados ME com sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) como controle positivo e como controle negativo somente o meio DMEM. Segundo a norma ISO10993-5 a área da superfície do material a ser testado é calculada com base da dimensão dos lados

(área) da amostra, não levando em conta a porosidade. Deste modo foram confeccionados corpos de prova a partir dos filmes de poliuretano com 3 cm<sup>2</sup> e colocado em um mL de meio DMEM, o qual foi utilizado como solvente de extração. Os MEs foram incubados em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h e somente após este período os meios foram colocados sobre as culturas celulares. Todas as amostras foram esterilizadas com álcool 70° e lavadas com tampão DPBS e em seguida mantidas dentro da capela de fluxo laminar (Veeco) sobre lâmpada UV por duas horas.

Para a avaliação da atividade celular foi escolhida a fase *log* de crescimento, pois esta é a fase de maior viabilidade celular e atividade metabólica e, por isso, é o período ideal para a experimentação e estudo (Peres, 2005).

#### **4.3.3. Ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT**

Após cada período de incubação com o ME as culturas de células foram lavadas com tampão DPBS (100 µL) e logo após foram adicionadas no meio DMEM (50 µL/poço) contendo 10% da solução de MTT (Sigma) na concentração de 5mg/mL. As células foram incubadas por 4 horas em estufa (Sannyo) a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, o meio com MTT foi aspirado e logo em seguida adicionado 100µL de DMSO (Sigma) foi adicionado para solubilizar os sais de formazan. A conversão do produto de MTT (medida da viabilidade celular) foi mensurada através da densidade ótica (OD) com espectrofotômetro *Mircroplate Reader* (BioRad) a 570 nm. A média da OD para o controle negativo (DMEM) representa 100% de viabilidade celular. Todas as amostras foram feitas em quádruplicatas e repetidas três vezes.

Os valores de viabilidade celular foram classificados segundo a norma U.S. Pharmacopeia & the National Formulary (USP-NF18) conforme mostrado no quadro 4.3.1

Quadro 4.3.1. Escala graduada para Teste de Meio de Extração (ME).

Grau	Tipo de resposta Celular	Comentários sobre a Resposta Celular
0	Nenhuma	Resposta celular adversa não encontrada
1	Mínima	Não mais do que 20% das células apresentam resposta adversa
2	Média	Não mais do que 50% das células apresentam resposta adversa
3	Moderada	Não mais do que 70 % das células apresentam resposta adversa
4	Severa	Células apresentam aproximadamente resposta adversa completa

Adaptada a partir da USP23-NF18.

#### 4.4. Avaliação da adesão Celular sobre o filme de PU

Para a adesão celular, os filmes de PU foram cortados com uma área de 1 cm<sup>2</sup> e esterilizados com álcool 70°, seguido por lavagem com tampão DPBS e mantido sobre luz UV por duas horas. Posteriormente foram colocados em placas de cultura de 6 poços. Onde 1,5 x 10<sup>4</sup> células por poço foram cultivadas em placas separadas para os períodos de 24, 48 e 72 horas e incubadas em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Sendo utilizado como controle a cultura de células sobre a placa de poliestireno.

Seguido os períodos de incubação as células foram lavadas com tampão DPBS e fixadas com metanol (Merck) por dez minutos. Os filmes foram retirados dos poços de cultura e colocados em lâminas histológicas para serem coradas. A coloração procedeu-se da seguinte forma: 1 mL de solução de Hematoxilina foi colocada por três minutos sobre os filmes de PU; após foram lavados com água destilada e em seguida foi colocado 1 mL de solução de Eosina sobre os filmes por dois minutos seguindo de lavagem com água destilada. Após a coloração as

lâminas foram observadas em microscópio óptico (Zeiss, Axiolab) acoplado a uma câmera digital (Olympus Qcolor3), para a aquisição das imagens.

#### **4.5. Análise estatística**

Os dados obtidos no ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT (média  $\pm$  desvio padrão) foram tratados com teste estatístico ANOVA e Tukey como pós-teste ( $p < 0.01$ ), utilizando o software GraphPad Prism 4.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O polímero de PU obtido por reação em uma etapa com catalisador de estanho foi caracterizado por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância Magnética Nuclear de Próton ( $^1\text{H-RMN}$ ) e estes serão discutidos nos itens 5.1. ao 5.3. A avaliação de citotoxicidade e adesão celular serão discutidas nos itens 5.4. e 5.5.

### 5.1. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

Através do GPC obteve-se a massa molar numérica média ( $M_n$ ), a massa molar ponderal média ( $M_w$ ) e o índice de polidispersão (IP) do polímero de PU, descritas na Tabela 5.1.1.

Tabela 5.1.1. Massas molares ( $M_w$  e  $M_n$ ) do polímero de poliuretano (PU).

	$M_w$ (g/mol)	$M_n$ (g/mol)	IP ( $M_w/M_n$ )
PU	175625	120359	1,46

Solvente: THF

Pode-se confirmar a síntese do polímero pelo aumento na massa molar do PCL de  $M_n = 2.000$  g/mol para  $M_n = 120.359$  g/mol quando reagido com HDI para formar o polímero de PU. Diversos estudos utilizam a cromatografia de permeação em gel para acompanhar as mudanças na distribuição do peso molecular com o tempo para observar a cinética da reação (Heintz, 2003), e tais efeitos na

distribuição do peso moleculares influenciam diretamente nas propriedades mecânicas do material. Não foi encontrado na literatura dados referentes a massa molar de poliuretano sintetizado a partir do HDI e PCL para que fosse possível comparar os dados obtidos neste trabalho.

## 5.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR do polímero sintetizado (a), PCL (b) e HDI (c) são mostrados na figura 5.2.1, sendo as atribuições das bandas realizadas em comparação aos valores das frequências características para os grupos existentes na molécula, de acordo com a literatura (Silverstein, 1991).

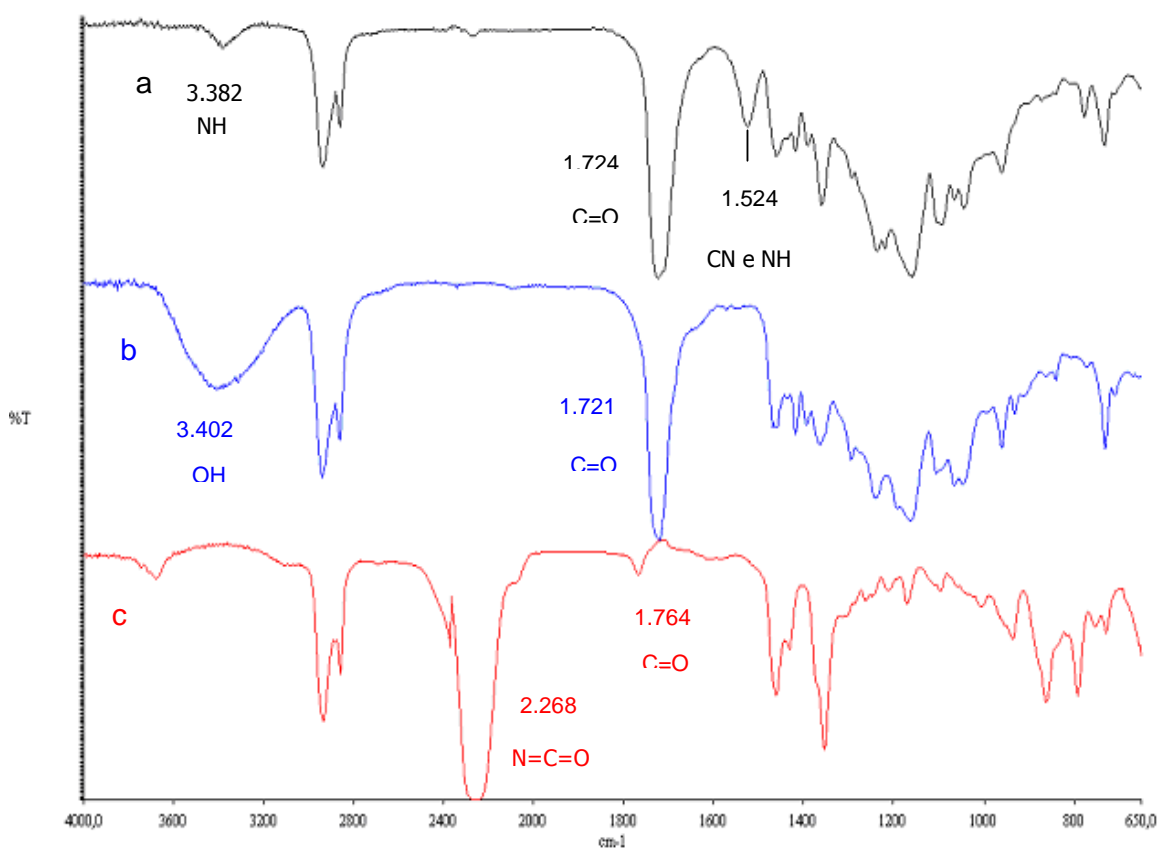


Figura 5.2.1 Espectro de Infravermelho do (a) polímero de poliuretano (PU), (b) poli(caprolactona) (PCL) e (c) hexametileno diisocianato (HDI)

Na Tabela 5.2.1 são apresentadas as atribuições das bandas características para o filme do polímero (PU), polioliol (PCL) e diisocianato (HDI) respectivamente.

Tabela 5.2.1. Atribuições das bandas referentes ao espectro do PU, PCL e HDI.

<b>Comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição (PU)</b>
3.382	$\nu_s$ NH (uretano)
2.936 – 2.865	$\nu_{as}$ CH <sub>2</sub> - $\nu_s$ CH <sub>2</sub>
1.724	$\nu$ C=O (uretano + éster)
1.524	$\nu$ CN + $\delta_s$ NH (uretano)
1.461	$\delta_s$ CH <sub>2</sub>
1.237	$\nu$ C-O (uretano)
1.062	$\nu$ C-O (éster) + $\nu$ N-C (uretano)
<b>Comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição (PCL)</b>
3.402	OH
2.941 – 2.865	$\nu_{as}$ CH <sub>2</sub> - $\nu_s$ CH <sub>2</sub>
1.721	$\nu$ C=O (éster)
1.239	$\nu_{as}$ C-O (éster)
1.064	$\nu$ C-O
<b>Comprimento de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição (HDI)</b>
2.936 – 2.860	$\nu_{as}$ CH <sub>2</sub> - $\nu_s$ CH <sub>2</sub>
2.258	$\nu$ N=C=O
1.764	$\nu$ C=O
1.461	$\delta_s$ CH <sub>2</sub>

$\nu$ : estiramento;  $as$ : assimétrico,  $s$ : simétrico e  $\delta$ : deformação angular.

Os espectros de FTIR, mostrados na Figura 5.2.1, referentes ao filmes de PU, apresentaram um banda característica da ligação N–H de uretano e de amida II nas regiões de 3.382 e 1.524 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, corroborando os achados de

Marcos-Ferández (2006) e Guan (2005). A banda característica do grupo NCO em torno de  $2268\text{ cm}^{-1}$  é encontrada no espectro, mas com uma diminuição acentuada quando comparado a banda encontrada no espectro do HDI, deste modo confirmando a reação entre os grupos NCO do diisocianato com o poliol. Nas regiões de  $2.936\text{ cm}^{-1}$  e  $2.865\text{ cm}^{-1}$  do espectro de PU, observam-se as bandas características de estiramento assimétrico e simétrico de  $\text{CH}_2$ , respectivamente. A banda na região de  $1.724\text{ cm}^{-1}$  (Tab. 5.2) é atribuída ao estiramento da carbonila (C=O) do grupo uretano e éster, referente a formação da ligação uretano (grupo –NHCOO–), com a diminuição concomitante do grupo isocianato (–NCO) em  $2.268\text{ cm}^{-1}$  durante a reação (Zhang, 2000). Outra banda que caracteriza a formação do polímero pode ser observada em  $1.062\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-O proveniente do PCL e do estiramento N-C devido a ligação uretano.

Na Figura 5.2.1 no espectro do HDI aparece uma banda de alta intensidade em  $2.258\text{ cm}^{-1}$  característico do estiramento simétrico do grupo  $\text{N}=\text{C}=\text{O}$  e na região de  $1.461\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação angular do grupo metileno do diisocianato. As bandas características do estiramento assimétrico e simétrico das ligações (C–O) do poliéster ocorrem em  $1.239\text{ cm}^{-1}$  e  $1.064\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

A banda de estiramento em  $3.402\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à ligação intramolecular forte da hidroxila (OH) do poliol PCL.

### 5.3. Ressonância Magnética Nuclear – $^1\text{H}$ ( $^1\text{H}$ -RMN)

As análises do  $^1\text{H}$ -RMN nos permitem observar a formação do polímero de PU a partir de HDI e PCL. O espectro do polímero com os seus respectivos deslocamentos químicos é mostrado na Figura 5.3.1.

O espectro do polímero mostra um sinal no deslocamento químico ( $\delta$ ) em 1.38 e 1,65 ppm, que é atribuído aos prótons dos grupos metileno ( $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ) do HDI bem como do PCL da cadeia. O deslocamento químico de 2,31 e 4,04 ppm é atribuído aos prótons do grupo  $\text{CH}_2\text{COO}$  do PCL, o  $\delta$  3,15 ppm é atribuído ao próton metino na ligação uretano ( $\text{NHCOO}$ ) que caracteriza o polímero de PU. O deslocamento químico é atribuído ao sinal de  $\delta$  3,75 e 4.23 ppm é devido a presença do grupo metileno da ligação  $\text{CH}_2\text{NHCOO}$ , estes deslocamentos químicos corroboram com os achados de Xie (2007) e Loh (2008). O sinal de 7,27 ppm e 0 ppm se referem respectivamente ao  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{SiMe}_4$ .

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, cdcl<sub>3</sub>) δ 4.27 – 4.19 (a, 2H),  
 4.06 (b, 4H), 3.73 – 3.66 (c, 2H), 3.16 (d, 1H),  
 2.31 (e,4H), 1,65 (f,g, 10H), 1.38 (h,i, 8H).

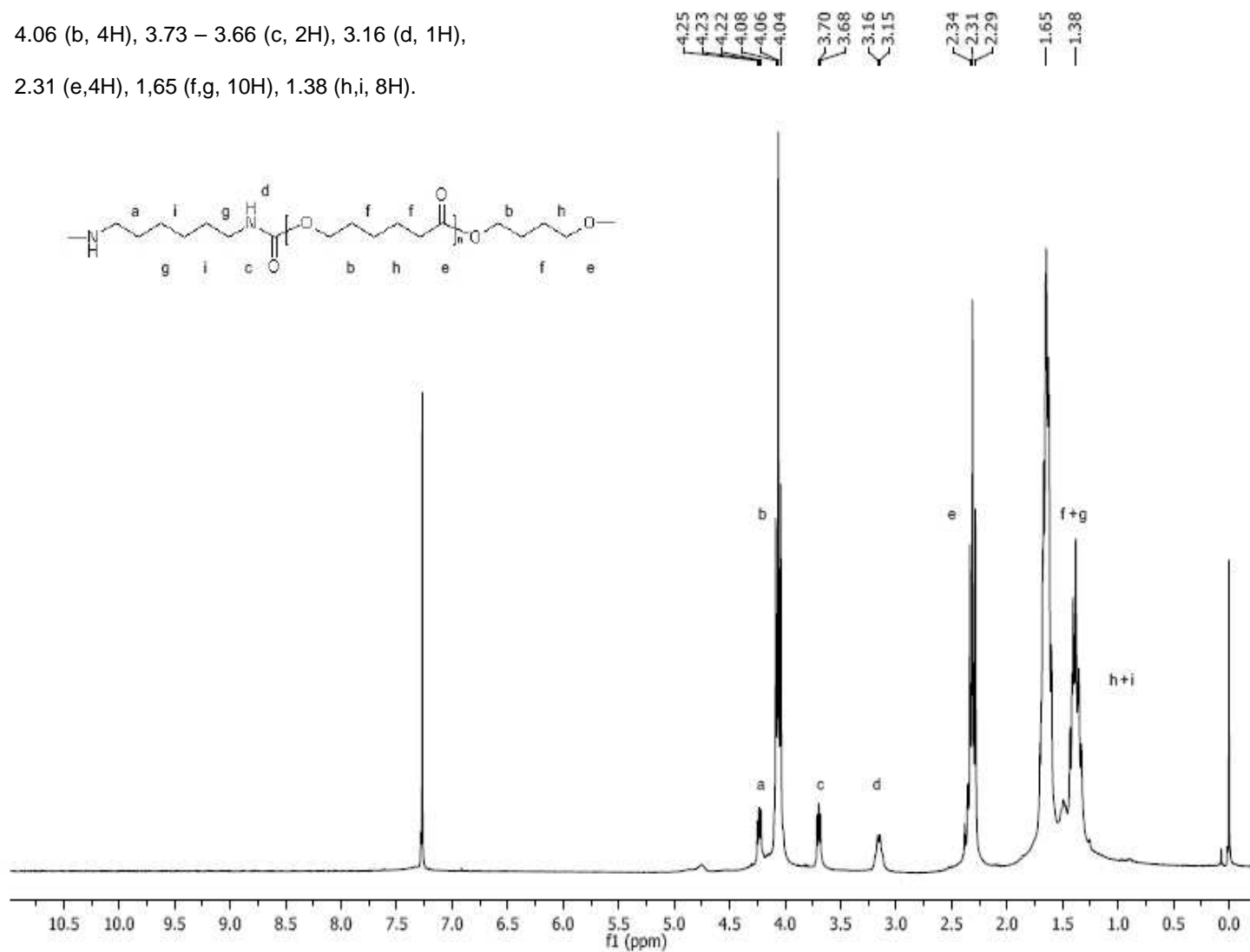


Figura 5.3.1 Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do polímero de PU

#### 5.4. Citotoxicidade pela redução do MTT

Os ensaios de citotoxicidade permitem um controle cuidadoso do ambiente físico-químico e fisiológico, fornecendo consistência na amostragem e reprodutibilidade dos dados, tais testes utilizam células de tipos específicos (Fresheney, 2001). Valores de absorvância mensurados pela redução do sal de formazan nas mitocôndrias estão diretamente relacionados com a viabilidade celular (Gomes, 2001).

A tabela 5.4.1 mostra os valores das médias das absorvâncias e seus desvios padrão e a tabela 5.4.2 mostra os valores médios de porcentagem da viabilidade celular e seus desvios padrões nos diferentes períodos de cultura de fibroblastos com o polímero (PU).

Tabela 5.4.1. Valores da média e desvio padrão de absorvância nos períodos de 24, 48 e 72h.

Grupo	Período de incubação em horas		
	24	48	72
PU	0,173±0,005	0,255±0,038	0,305±0,029
CN	0,231±0,003	0,326±0,007	0,333±0,019
CP	0,087±0,004	0,083±0,005	0,082±0,006

PU: Poliuretano, CN: controle negativo e CP: controle positivo, OD: 570nm.

Tabela 5.4.2. Valores da média e desvio padrão de porcentagem de viabilidade celular nos períodos de 24, 48 e 72h.

Grupo	Período de incubação em horas		
	24	48	72
PU	75,03%±1,95	78,22±11,7	91,49±8,7
CN	99,85±1,32	99,89±1,9	99,90±5,8
CP	37,51±1,5	25,35±1,5	24,52±1,7

PU: Poliuretano, CN: controle negativo e CP: controle positivo

Na figura 5.4.1 o gráfico mostra a viabilidade das células cultivadas na presença do polímero de PU em 24, 48 e 72 horas após a exposição dos extratos do meio com o polímero. Após o período de incubação as células expostas ao meio de extração (ME) foram comparadas com o controle positivo e avaliadas quanto a atividade metabólica pela redução do sal de tetrazólio, nas mitocôndrias, pelo método de MTT, demonstrando a integridade funcional e estrutural da organela (Briganti, 2006). Os valores de absorbância obtidos foram normalizados com o controle negativo, meio D-MEM puro, como sendo 100% de células viáveis.



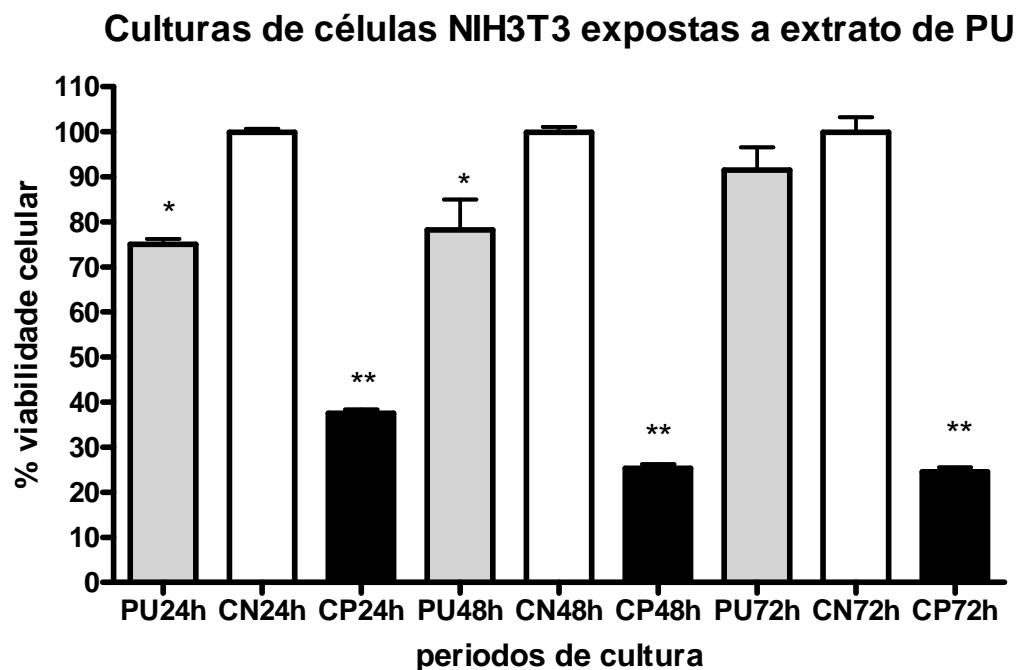


Figura 5.4. 1. Viabilidade celular por período de tempo. PU: polímero, CN: controle negativo (\* $p < 0,01$ ) e CP: controle positivo (\*\*= $p < 0,01$ ).

A viabilidade das células incubadas com extrato do meio com o polímero foi significativamente diferente (\*\* $p < 0,01$ ) ao controle positivo ( $\text{CuSO}_4$ ) nos diferentes tempos de cultura. Quando comparadas ao controle negativo apresentaram um  $p < 0,01$  (\*) nos períodos de 24 e 48 horas e, no período de 72 horas não foi observada diferença significativa em relação a viabilidade das células cultivadas em meio DMEM (CN).

Segundo Minnem e colaboradores (2005) a biocompatibilidade é o maior problema no desenvolvimento de novos materiais biodegradáveis utilizados na engenharia de tecidos e o método de MTT é utilizado como teste para avaliar a atividade metabólica das células expostas a estes materiais.

Neste estudo as células expostas aos extratos do ME após o período de 72 horas apresentaram 91% viabilidade celular (Tabela 5.4.2). Segundo a norma USP 23-NF18 (Quadro 3.4.1) a classificação de citotoxicidade nos biomateriais pela está organizada em uma escala de 0-4, no qual o 0 da escala classifica o material que

não apresenta resposta celular adversa e o grau 4 como material que apresenta uma resposta adversa severa. O PU sintetizado neste trabalho quando comparado ao controle negativo apresentou, conforme a norma USP 23-NF18, grau 2 e 1 na escala nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente, ( $p < 0,01$ ) o que corresponde a uma resposta celular adversa média a mínima. No período de 72 horas ( $p > 0,05$ ) apresentou grau 0 na escala correspondendo a nenhuma resposta adversa do biomaterial frente as culturas de células expostas ao extrato de PU.

Ao contrário os controles positivos apresentaram uma resposta celular severa a moderada com mais de 70% de danos nas células nos períodos de 48 e 72 horas ( $p < 0,01$ ) e em torno de 60% no período de 24 horas quando comparados aos controles negativos. Estes dados eram esperados uma vez que o cobre tem efeito citotóxico, demonstrando que a avaliação pelo método de MTT foi satisfatória.

Segundo Guelcher (2005), os poliuretanos sintetizados com PCL e PEG e diisocianatos alifáticos apresentam uma alta viabilidade celular quando células de osteoblastos foram expostas ao polímero. Deste modo, a sua química não citotóxica faz destes poliuretanos bons candidatos para o desenvolvimento de implantes biomédicos.

Guan (2005) em sua laboriosa síntese de poliuretanos a partir de 1,4-butanodiisocianato, PCL, PCL-PEG-PCL, putrescina como extensor de cadeia e peptídeos como sítio ativo para degradação enzimática demonstrou que células de endotélio humano quando expostas aos extratos do polímero não apresentaram efeitos citotóxicos. Hyridia (2008) estudando a citocompatibilidade de PU em contato direto e extrato do polímero com fibroblastos demonstrou que não houve efeito citotóxico e nem lise celular.

As células de fibroblastos as células predominantes nos tecidos em contato com a maioria dos materiais implantados. O aumento da função dos fibroblastos leva a uma prolongada e extensiva formação de tecido fibroso na superfície de implantes, conseqüentemente, comprometendo o sucesso do mesmo (Kaplan, 1994). Deste modo a viabilidade dos fibroblastos obtida neste estudo de 75 e 78% nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente, pode ser considerado

um achado interessante, pois sugere que a proliferação dos fibroblastos ocorram de uma maneira moderada, minimizando a resposta primária das células em contato com o polímero.

### 5.5. Adesão celular

A Figura 5.5.1 mostra as células de fibroblastos cultivadas sobre o filme de PU em 24 horas. Figura 5.5.2 em 48 horas; Figura 5.5.3 em 72 horas e a Figura 5.5.4 demonstra as células sobre a placa de cultura (controle).

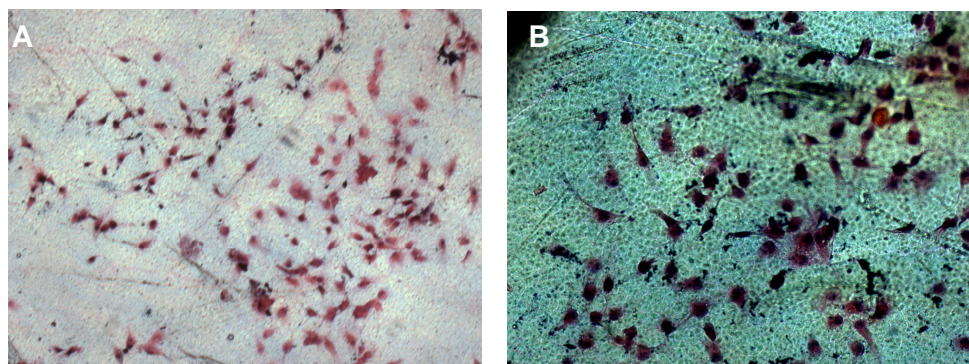


Figura 5.5.1. Células de fibroblastos sobre filme de PU em 24h de cultura: (A) aumento de 50x e (B) aumento de 100x.

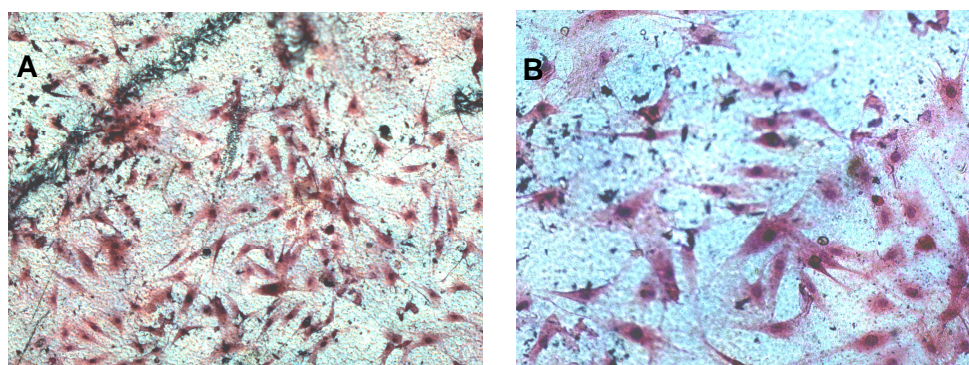


Figura 5.5.2. Células de fibroblastos sobre filme de PU em 48h de cultura: (A) aumento de 50x e (B) aumento de 100x.

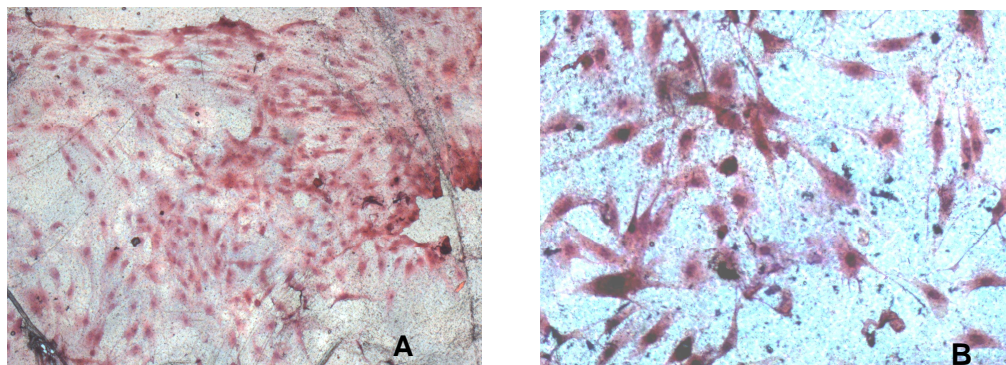


Figura 5.5.3. Células de fibroblastos sobre filme de PU em 72h de cultura: (A) aumento de 50x e (B) aumento de 100x.

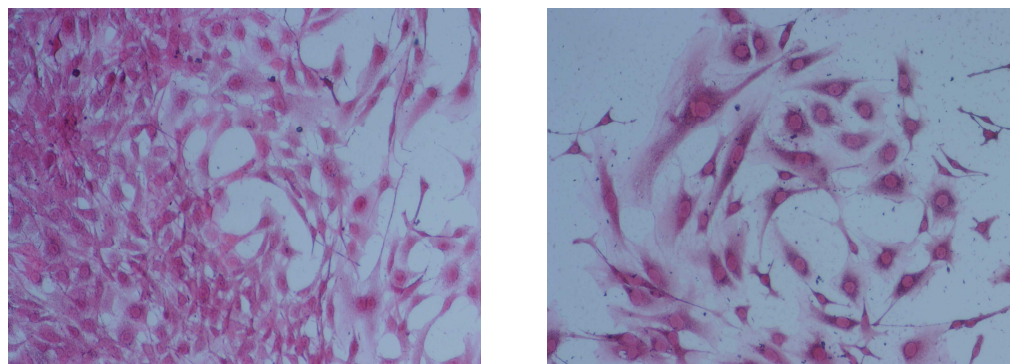


Figura 5.5.4. Células de fibroblastos sobre placa de cultura (poliestireno) aumento de 100x.

A análise por microscopia ótica das culturas de fibroblastos sobre o filme de PU nos períodos de estudo apresentam morfologia semelhantes as células do controle positivo (Figura 5.5.4), homoganeamente distribuídas, apresentando aspecto alongado, com inúmeros prolongamentos citoplasmáticos, e interações célula-célula de acordo como já descrito pelos autores (Lakard, 2004; Oezyurek, 2008). Neste estudo não foi avaliada a proliferação celular, mas podemos observar que as células aderidas nos filmes de PU apresentaram uma tendência crescente de proliferação com os períodos de cultura, isto é; maior número de células com períodos mais longos em cultura.

Para que ocorra a aderência das células nos materiais utilizados em cultura celular é necessário que a superfície de crescimento seja carregada negativamente.

Desta forma, os plásticos utilizados em placas de cultura são tratados afim de aumentar a sua carga líquida negativa na superfície, permitindo a aderência eletrostática das células (Peres, 2005).

Embora as células possam aderir primeiramente por forças eletrostáticas (Kung, 2005), elas necessitam que moléculas de adesão celular, e integrinas, se liguem ao substrato formando ligações químicas. A ativação ocorre por meio de estímulos locais, como mediadores solúveis (p.ex., citocinas, fatores de crescimento, hormônio) ou interfaces sólidas, acompanhado pela mudança conformacional da sua estrutura tendo como resultado final a modulação da afinidade pelo ligante (Silveira, 2007). A adesão celular por meio das integrinas desencadeia uma série de vias de sinalização celular terminando em transcrição de genes responsáveis pela sobrevivência e proliferação celular (Lim, 2006). Outro fator importante desencadeado por essa interação célula-superfície é a secreção de proteínas da matriz extracelular.

A adesão celular está envolvida na integração com os biomateriais. A biocompatibilidade dos materiais está intimamente relacionada com o comportamento celular, quando em contato com estes, e, particularmente, com a adesão celular à sua superfície. A ligação, a adesão e a proliferação celular na superfície, fazem parte da primeira fase da interação célula-material (Anselme, 2000).

Dey (2008) avaliou a biocompatibilidade de PU em cultura in vitro de células 3T3 de fibroblastos e células musculares da aorta humana. O crescimento e proliferação dos fibroblastos e células musculares in vitro demonstrou uma boa interação célula-material. Ensaio quantitativo confirmaram que as células cresceram e proliferaram sobre filmes de PU. O mesmo foi encontrado por Zia (2008) que demonstrou que células de fibroblastos são citocompatíveis com filmes de PU.

Uma das principais células do tecido conjuntivo são as células de fibroblastos que secretam diversos fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina) e os macrófagos que tem uma alta atividade enzimática. As ações destas células junto com biomateriais biodegradáveis

modulam a regeneração do tecido lesado em contato com o implante, pois a atividade enzimática e hidrolítica dos macrófagos permitem o surgimento de espaços dentro da matriz polimérica, facilitando a proliferação celular e a deposição de uma nova ECM sintetizada pelos fibroblastos (Li, 2006).

Zhang (2000) utilizando células-tronco de medula óssea em arcabouços de PU mostrou que após 7 dias de cultura as células mantiveram uma morfologia similar as células que cresceram sobre a placa de estireno. Grad (2003) utilizou condrócitos sobre uma matriz porosa de PU e constatou que ao longo do período de culturas as células mantiveram o seu fenótipo. Corroborando as observações obtidas no presente estudo onde as células mantiveram o mesmo fenótipo quando cultivadas sobre uma superfície de poliuretano.

Embora a interação dos grupos químicos livres do polímero com proteínas, não tenha sido o objetivo deste estudo, podemos sugerir que os grupos químicos proporcionam sítios de interações intermoleculares com proteínas de adesão celular, bem como as proteínas presentes no meio de cultura (p.ex., colágeno, fibronectina), fornecendo regiões de ancoramento para as células, proporcionando uma maior interação da célula com o material influenciando a proliferação.

## 6. CONCLUSÕES

A síntese do polímero de PU e análise da sua citocompatibilidade em culturas de fibroblastos permitiram concluir que:

- O polímero de PU sintetizado apresentou uma massa molar ponderal média de 175.625 g/mol, demonstrado pela análise por GPC.
- A análise por FTIR demonstrou os principais grupos de átomos característico do polímero de PU, pela presença das bandas de absorção em  $3.382\text{ cm}^{-1}$  da ligação N-H,  $1.724\text{ cm}^{-1}$  ligação C=O (uretano + éster),  $1.524\text{ cm}^{-1}$  das ligações CN e NH,  $1.237\text{ cm}^{-1}$  C-O do uretano, e pela Ressonância Magnética Nuclear permitiu que fosse determinada a estrutura química do polímero.
- O teste do MTT mostrou que o PU não é tóxico e que os fibroblastos de camundongo aderem e proliferam sobre o filme de PU.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação de citocompatibilidade do polímero PU com diferentes células humanas.
- Quantificação da expressão de genes que codifica proteínas de adesão celular e matriz extracelular.
- Adsorção de proteínas sobre a superfície do polímero visando avaliar mais detalhadamente a interação proteína celular e polímero.
- Teste de degradação in vitro do polímero para definir sua taxa de degradação, bem como, síntese do polímero com extensores de cadeia com sítios ativos para degradação enzimática.
- Caracterização das propriedades termo-mecânica do polímero para adequá-los aos diferentes tipos de tecidos a serem substituídos.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4<sup>a</sup> ed. Editora Artmed. Porto Alegre, 2004.

ALENGHAT FJ, Ingber DE. Mechanotransduction: All Signals Point to Cytoskeleton, Matrix, and Integrins. **Science's**. v.119, p. 1-4, 2002.

ALLEN LT, Fox EJ, Blute I, Kelly ZD, Rochev Y, Keenan AK, Dawson KA, Gallagher WM Interaction of soft condensed materials with living cells: phenotype/transcriptome correlations for the hydrophobic effect. **Proc Natl Acad Sci**. v. 27, p. 6331-6, 2003.

ALPERIN C, Zandstra, KA, et al. Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications. **Biomaterials**. v 26, 7377-7386, 2005.

Al-Rubeai MA, et al Methods for the estimation of the number and quality of animal cells immobilized in carbohydrate gels. **Enzyme Microb Technol**. v. 2, p.459-63, 1990.

ANDERSON JM. Biological Responses to Materials. **Annu Rev Mater Res**. v.31, 81-110, 2001.

ANDREWS KD, Feugier P, Black RA, Hunt JA.. Vascular prostheses: performance related to cell-shear responses. **J Surg Res**. v. 149(1), p. 39-46, 2008.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667-681, 2000.

BARIKANI M, M. Mohammadi, **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 773-780, 2007.

BERRIER AL, Yamada KM. Cell-Matrix Adhesion. **Journal of Cellular Physiology**. v.213, 565-573, p. 2007.

BHATIA SK, Yetter AB. Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biol Toxicol**. v. 24(4), p. 315-9, 2008.

BOGDANOV, B.V. Toncheva, E. Schacht, L. Finelli, B. Sarti, M. Scandola. Physical properties of poly(ester-urethanes) prepared from different molar mass polycaprolactone-diols. **Polymer** ,v.40, p3171–3182, 1999

BORKENHAGEN M, Stoll RC, et al. In vivo performance of a new biodegradable polyester urethane system used as a nerve guidance channel. **Biomaterials**,v.19,2155, 1998.

BOUDREAU N.J, Jones PL. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. **J. Biochemical**, v.339, p. 481-488, 1999.

BOUDREAU NJ, Jones PL. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. **Biochem. J**. v. 339, p. 481-488, 1999.

BOUILLAGUET S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. **J Endod**. v.32(10), p989-92, 2006

BRIGANTI E., et al. Silicone based polyurethane materials: a promising biocompatible elastomeric formulation for cardiovascular applications. **J Mater Sci: Mater Med**. v.17, 259-266, 2006.

BRODBECK WG, Shive MS, Colton E, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM. Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells. **J Biomed Mater Res.** v. 15, p. 661-8, 2001.

BRONZINO J D., **Biomedical Engineering Handbook**, vol. 1. CRC Press, 1656p, ed 2a, 1999.

CHENG G, et al. Cell Population Dynamics Modulate the Rates of Tissue Growth Processes. **Biophysical Journal.** v. 90, p. 713-724, 2006.

DEMALI, K.A, et al Integrin Signaling to the actin cytoskeleton. **Currente Opinion in Cell Biology**, v.15, p. 572-582, 2003.

DEWEZ J.L, et al. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined patterns. **Biomaterials.** v10, p. 1441-1445, 1998.

DEY J, et. al . Development of biodegradable crosslinked urethane-doped polyester elastomers. **Biomaterials.** v. 29, p.:4637-49, 2008.

DODGE, J. Polyurethanes and Polyureas. In: Rogers, M. E.; Long, T. E. (Ed.). **Synthetic Methods in Step-Growth Polymers.** United States of America: John Wiley & Sons, 2003. p. 197-258.

ELIZABETE Y. Kawachi, et. al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quím. Nova** v .23, 2000.

ELLIOTT S.L, Fromstein JD, et al. Identification of biodegradation of products formed by L-phenylalanine based segmented polyurethaneureas. **Journal of Biomaterials Science Polymer.** v.13, p.691, 2002.

EUFINGER H, Saylor B. Computer-assisted prefabrication of individual craniofacial implants. **AORN J.** v. 74, p. 648-54, 2001.

FERREIRA P. Development of a biodegradable bioadhesive containing urethane groups. **J Mater Sci Mater Med.** v.19 (1), p.111-20, 2008.

FODOR W.L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. **Reproductive Biology and Endocrinology.** v.1, p.1-6, 2003.

FRESHNEY I, Application of Cell Cultures to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology.** v.17, p.213-230, 2001

GOMES ME, et al. Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymers: effect of several additives and processing conditions. **Biomaterials.** v.22, p. 1911-1917, 2001.

GRODZINSKI-J,J. Biomedical application of functional polymers. **Reactive & Functional Polymers,** v.39, p.99-138, 1999.

GUAN J, Fuzimoto KL, et al. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. **Biomaterials.** v.26, p.3961-3971, 2005.

GUELCHER SA, et al. Synthesis of biocompatible segmented polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders. **Acta Biomaterialia.** v.1, 471-484, p. 2005.

GUELCHER SA, Srinivasan, et al. Synthesis, mechanical properties, biocompatibility, and biodegradation of polyurethane networks from lysine poliisocyanates. **Biomaterials,** v.29, p.1762-1775, 2008.

GUNATILLAKE Pathiraja A. , Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **European Cells and Materials**. v.5, p.1-16, 2003.

HENCH LL, Polak JM. Third- Generation Biomedical Materials. **Science**. v. 95, p. 1014-17, 2002.

HILL C.S and Treisman, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. **Cell**, v.80, p. 199-211, 1995.

HORI Y, M. Suzuki, Y. Okeda, T. Imai, M. Sakagushi. A novel biodegradable poly(urethane ester) synthesized from poly(3-hydroxybutyrate) segments. **Macromolecules**, v. 25, p. 5117-18, 1992.

HOWARD GT. Biodegradation of polyurethane: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.49, p.245-252, 2002.

HRIDYA VK, Jayabalan M. Studies on in vitro bioestability and blood compatibility of polyurethane potting compound based on aromatic polymeric MDI for extracorporeal devices. **Journal of Materials Science: Mater. Med.** 2008.

HSU S, Tseng H, Wu M. Comparative In Vitro Evaluation of Two Different Preparations of Small Diameter Polyurethane Vascular Grafts. **Artificial Organs**. v..24(2), p119-128, 2000.

HUANG S-L, et al. Microphase structure and protein adsorption of polyurethanes with butadiene soft segment. **European Polymer Journal**. v.36, 285-294, 2009

HUTMACHER D.W. Scaffolds desing and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives. **Journal of Biomaterials Science-Polymer**. v.12 (1), p. 107-124, 2003.

ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods.** International Organization for Standardization. Geneva., 1999.

JANHO, V. **Síntese e caracterização do poli (l-ácido láctico) para uso como Biomaterial** . Porto Alegre. 2006. 79p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia dos Materiais), PGETEMA, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

JIANG X, J. Li, M Ding, H. Tan, Q. Ling, Y. Zhong, Q. Fu. Synthesis and degradation of nontoxic biodegradable waterborne polyurethanes elastomer with poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) as soft segment. **European Polymer Journal**. v. 43, p. 1838-1846, 2007.

KAPLAN F.S, Hayes WC et al. Orthopedic basic science. Rosemont, IL. **American Academy of Orthopedic Surgeons**. v. p127-185, 1994.

KAVLOCK K.D, Pecher TW, et al. Synthesis and characterization of segmented poly(esterurethane urea) elastomers for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**. v3, p.475, 2007.

KESELOWSKY BG, Collard DM, García AJ. Surface chemistry modulates focal adhesion composition and signaling through changes in integrin binding. **Biomaterials**. v. 25, p. 5947-54, 2004.

KIRKPATRICK CJ, et al. Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. **Biomaterials**. V. 28, p. 5193-98, 2007.

KLOMPMAKER J, Jansen HWB, et al. Meniscal replacement using a porous polymer prosthesis: a preliminary study in the dog. **Biomaterials**. V.17, p.1169, 1996.

KRÓL P. Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. **Progress in Materials Science**. v. 52, p. 915–1015, 2007.

KRONENTHAL RL. Biodegradable polymers in medicine and surgery. **Polymer Science Technology**. V.8, p. 119-137, 1975.

KUNG S, Choi H. Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S. cerevisiae* onto modified surfaces by poly(styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. **Colloids and Interfaces B: Biointerfaces**. v.46, p. 70-77, 2005.]

KWEON, et. al. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**. v 24, p. 801-8, 2003.

LAKARD S, Herlem G, Propper A, Kastner A, Michael G, Vallès-Villarreal N, Gharbi T, Fahys B. Adhesion and Proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. **Bioelectrochemistry**. V.62, p. 19-27 2004.

LAMBA NMK, Cooper SL, Lelah MD, Woodhouse KA. **Polyurethane in biomedical applications**. Boca Raton: CRC Press; 1998. 277 p.

LANGER R, Vacanti JP. Tissue engineering. **Science**. V. 14; p. 920-6, 1993.

LEE SJ, Khang G, Lee YM, Lee HB. Interaction of human chondrocytes and NIH/3T3 fibroblasts on chloric acid-treated biodegradable polymer surfaces. **J Biomater Sci Polym**. v.13 (2), p.197-212, 2002.

LIM JY et al. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. **Biomaterials**, v.28, p. 1787-1797, 2007.

LODISH, Harvey et al. **Biologia celular e molecular**. 5ªed.. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MARCOS-FERNÁNDEZ A, et al. Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly(ester- urethane- urea)s based on poly( $\epsilon$ -caprolactone) and amino acid derivatives. **Polymer**. v.47, p. 785-798, 2006.

MARQUES AP, Reis RL, Hunt JA. The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. **Biomaterials**. v.23, p. 1471-1478, 2002.

MIHAIL I. **Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes**. Smithers Rapra Technology, 625p, 2005.

MIKOS A.G, Sarakinos G, Lyman MD, Ingeber DE, Vacabti JP, Langer R, Prevascularization of porous biodegradable polymer. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 42, p. 716-723, 1993.

MINNEN BV, et al. Short-term *in vitro* and *in vivo* biocompatibility of a biodegradable polyurethane foam based on 1,4-butanediisocyanate. **Journal of materials science: materials in medicine**. v.16, p. 221-227, 2005.

MOONEY DJ, et al. Biodegradable sponges for hepatocyte transplantation. **J Biomed Mater Res**. v. 29, p. 959-965. 1995.

MOSMANN T . Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65, p. 1-2. 1983.

NICHOLS J.E, Cortiella J. Engineering of a Complex Organ. **Proc Am Thorac Soc**. v.5 p. 723-730, 2008.



OEZYUEREK Z, et al. Sulfated glyco-block copolymers with specific receptor and growth factor binding to support cell adhesion and proliferation. **Biomaterials**. v.30, 1026-1035, 2009.

PARK HJ, Park KD, Bae YH. PMDS-based polyurethanes with MPEG grafts: synthesis characterization and platelet adhesion study. **Biomaterials**, v. 20, p. 943-953, 1999.

PATHIRAJA AG; Adhikari, R. Biodegradable Synthetic Polymers for Tissue Engineering. **European Cells and Materials**. v.5, p. 1-16, 2003.

PEKTOK E, Nottelet B, Tille JC, Gurny R, Kalangos A, Moeller M, Walpoth BH. Degradation and healing characteristics of small-diameter poly(epsilon-caprolactone) vascular grafts in the rat systemic arterial circulation. **Circulation**. v. 24, p. 2563-70, 2008.

PERES C.M, Curi R. **Como cultivar células**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 2005.

PHAN T.T, Lim IJ, Tan EK, Bay BH e Lee ST. Evaluation of cell culture on the polyurethane-based membrane (Tegaderm<sup>TM</sup>): implication for tissue engineering of skin. **Cell and Tissue Banking**. v. 6, p. 91-97, 2005.

RATNER BD, et al. **Biomaterials Science : An Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press . 864p ed 2a. 2004.

SAHOO S, Cho-Hong JG, Siew-Lok T. Development of hybrid polymer scaffolds for potential applications in ligament and tendon tissue engineering. **Biomed Mater**. v. 3, p. 169-73, 2007.

SANTERRE JP, Woodhouse K, Laroche G, Labow RS. Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implantes to tissue engineering materials. **Biomaterials**. V. 26, p. 7457-7470, 2005.

SEBENIK U, Krajnc M. Influence of the soft segment length and content on the synthesis and properties of isocyanate-terminated urethane prepolymers. **International Journal of Adhesion & Adhesives**. v. 27, p. 527–535, 2007.

SERRANO MC, et al. In vitro biocompatibility assessment of poly( $\epsilon$ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**. v.25, p. 5603-5611, 2004.

SILVEIRA, AL. **Análise por modelagem e dinâmica molecular da interação entre a interação entre a integrina  $\alpha 6 \beta 1$  e a laminina 111 humana**. Rio de Janeiro. 2007. 75p. Dissertação (Laboratório Nacional de Computação Científica), PGETEMA, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

SILVERSTEIN, R. M.; Bassler, G. C.; Morril, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1994, 387 p.

SITTINGER M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. **Biomaterials**. v. 17, p. 237-42, 1996.

SOARES, G.A. **Biomateriais**. Rio de Janeiro, Dezembro, 2005. Disponível em:< [http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr10\\_biomateriais.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr10_biomateriais.pdf)>. Acesso em: 19 maio 2007.

TAKAMORI, ER. **Estudo in vitro da citotoxicidade do osso bovino misto quimicamente tratado**. Campinas, 2004. 84p. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica).

TWEDEN KS, Harasaki H, Jones M, Blevitt JM, Craig WS, Pierschbacher M, Helmus MN. Accelerated healing of cardiovascular textiles promoted by an RGD peptide **J Heart Valve Dis**. v. 4, S90-7, 1995.

VAKONAKIS, I, Campbell I.D. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. **Current Opinion in Cell Biology**, v.19, p. 578-583, 2007.

VERT M. Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. Strategies of the future. **Progress in polymer science**. V.32, p. 755-761, 2007.

WEGENER, G. et al. Trends in industrial catalysis in the polyurethane industry. **Applied Catalysis A: General**, Dormagen, Germany, v. 221, p. 303-335, 2001.

WEN J, Somorjai G, Lim F, Wrd R. XPS estudy of surface composition of a segmented polyurethane block coploymer modified by PDMS end groups and its blends with phenoxy. **Macromolecules**. v. 30, p. 7206-13, 1997.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials. Progress in Biomedical Engineering**. v.4, 1987.

WOODFIELD, Dr. Tim, Research Fellow, Centre for Bioengineering. Disponível em [http://www.bioengineering.canterbury.ac.nz/seminar\\_info/seminars.shtml](http://www.bioengineering.canterbury.ac.nz/seminar_info/seminars.shtml), Acesso em 17/09/2007

YANG J, Yamato M, et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. **Biomaterials**. v. 28, p. 5033-5043, 2007.

YILGÖR E, Yilgör I. Hydrogen Bonding: A Critical Parameter in Designing Silicone Copolymers. **Polymer**. v. 42, p. 7953-7959, 2001.

YIN D, Wang X, et al. Preliminary Studies on Peripheral Nerve Regeneration using a New Polyurethane Conduit. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. v.22, p. 143-159, 2007.

ZDRAHALA R , Zdrahala IJ. In vivo Tissue engineering: part I. Concept genesis and guidelines for its realization. **Journal of Biomaterial Application.** v. 14, p. 129, 1999.

ZDRAHALA R, Zdrahala IJ. Biomedical applications of polyurethanes: a review of past promises, present realities, and vibrant future. **Journal of Biomaterial Application.**v. 14, p. 67-90, 1999.

ZHANG C, Improving the elasticity and cytophilicity of biodegradable polyurethane by changing chain extender. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** v. 79, 335-44, 2006.

ZHANG JY, Beckman EJ, et al. A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro. **Biomaterials.** v. 21, p. 1247-1258, 2000.

1995 U.S. Pharmacopoeia & the National Formulary:USP23-NF18 Editor: **United States Pharmacopoeia Publisher:USPharmacopoeia** Date Published: January 1994 ISBN:0913595764 Pages: 2391