



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLIURETANO COM
RAPAMICINA E SEU POTENCIAL USO EM REGENERAÇÃO
VASCULAR**

EMANUELLI LOURENÇO CABRAL GRACIOLI

QUÍMICA INDUSTRIAL

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DOS MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Abril, 2016



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLIURETANO COM
RAPAMICINA E SEU POTENCIAL USO EM REGENERAÇÃO
VASCULAR**

EMANUELLI LOURENÇO CABRAL GRACIOLI

QUÍMICA INDUSTRIAL

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DOS MATERIAIS

ORIENTADOR: PROF(a). DR(a). ROSANE LIGABUE

CO-ORIENTADOR: PROF(a). DR(a). VANUSCA DALOSTO JAHNO

Tese 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 Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Abril, 2016**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLIURETANO COM RAPAMICINA E SEU POTENCIAL USO EM REGENERAÇÃO VASCULAR

CANDIDATA: EMANUELLI LOURENÇO CABRAL GRACIOLI

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

DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - ORIENTADORA

DRA. VANUSCA DALOSTO JAHNO - CO-ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

**DR. DANIEL EDUARDO WEIBEL - PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
DOS MATERIAIS - UFRGS**

**DR. LUIZ CARLOS BODANESE - DO PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS
DA SAÚDE - PUCRS**

DR. MARCUS SEFERIN - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900

Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625

E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br

www.pucrs.br/feng

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Patente:

Ligabue, Rosane; EINLOFT, Sandra; GRACIOLI, E. L.; JAHNO, V. D.; DIAS, G. T. G.; DULLIUS, J. USO DE MEMBRANAS BIOPOLIMÉRICAS PARA A OBTENÇÃO DE PRÓTESES, PRÓTESES CARDIOVASCULARES COMPREENDENDO TUBOS BIOPOLIMÉRICOS, E PROCESSOS PARA A OBTENÇÃO DOS MESMOS. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR10201203380, data de depósito: 28/12/2012, título: "USO DE MEMBRANAS BIOPOLIMÉRICAS PARA A OBTENÇÃO DE PRÓTESES, PRÓTESES CARDIOVASCULARES COMPREENDENDO TUBOS BIOPOLIMÉRICOS, E PROCESSOS PARA A OBTENÇÃO DOS MESMOS", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Ligabue, Rosane; EINLOFT, S.; DULLIUS, J.; GRACIOLI, E.; DIAS, G. T. G.; JAHNO, Vanusca. USO DE MEMBRANAS BIOPOLIMÉRICAS EM PRÓTESES CARDIOVASCULARES. 2011, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI11069929, data de depósito: 29/12/2011, título: "USO DE MEMBRANAS BIOPOLIMÉRICAS EM PRÓTESES CARDIOVASCULARES", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Artigo completo publicado em periódico:

GRACIOLI, Emanuelli Cabral; Winter, Patricia; Ziulkoski, Ana Luiza; Spilki, Fernando; Dullius, Jeane; Einloft, Sandra; Perini, Sílvio; Bodanese, Luiz Carlos; Jahno, Vanusca Dalosto; Ligabue, Rosane Angélica. Dispositivos poliméricos cardiovasculares: comportamento termomecânico e viabilidade celular. Matéria (UFRJ), v. 18, n. 2, p. 1313-1322, junho 2013.

Trabalhos completos/resumos publicados em anais de congresso:

GRACIOLI, E. L. C.; LUCENA, G. B. ; ROVARIS, P. W. ; MORAES, J. P. ; EINLOFT, S. ; DULLIUS, J. ; ZIULKOSKI, A. L. ; JAHNO, V. D. ; LIGABUE, R. . Síntese, caracterização e avaliação da citotoxicidade de poliuretano bioestável. In: XIII Simposio Latinoamericano de Polímeros, 2012, Bogotá. SLAP 2012, 2012.

GRACIOLI, E. L. C.; LUCENA, G. B.; ROVARIS, P. W.; DULLIUS, J.; EINLOFT, S.; PERINI, S.; BODANESE, L. C.; ZIULKOSKI, A. L.; JAHNO, V. D.; LIGABUE, R. Propriedades térmicas e mecânicas e citotoxicidade de poliuretanos para uso na área cardiovascular. In: 20º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2012, Joinville. 20º CBECiMat, 2012.

GRACIOLI, E.; ROVARIS, P. W. ; ZIULKOSKI, A. L. ; JAHNO, V. D. ; LIGABUE, R. . Mechanical, morphological and cytotoxicity evaluation of biostable polyurethane for use in the cardiovascular area. In: Congress of the European Polymer Federation, 2013, Pisa. European Polymer Federation, 2013.

*“A vida é aquilo que você
deseja diariamente”
(André Luiz)*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu esposo, Bruno, ao nosso filho Samuel e aos meus pais, João e Maria, que foram os principais motivos e incentivadores para que esse trabalho fosse finalizado. Sem vocês ao meu lado, eu não seria quem sou.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter oportunizado muitas felicidades e conquistas na minha vida. Por ter colocado no meu caminho o meu esposo Bruno, uma pessoa com uma alma do tamanho do infinito. Por juntos termos tido a dávida de receber em nossa família, nosso príncipe Samuel. E por ter me colocado na vida dos meus pais, João e Maria, pessoas de uma integridade e amor indescritíveis. Vocês são os amores da minha vida!

Agradeço a orientação da professora Rosane Ligabue, que depositando sua confiança em mim, aceitou orientar esse trabalho e a co-orientação da professora Vanusca Jahno, que me incentiva desde o meu início como iniciação científica. Sem a compreensão e ajuda de vocês, este trabalho não estaria sendo finalizado! Obrigada por tudo!

Agradeço à toda minha família! Em especial às minhas tias e avó amadas, Eva, madrinha Nilza e vó Nena! Agradeço por nunca me deixarem esquecer que temos força suficiente para encarar momentos difíceis e de superações. Estendo esse agradecimento à minha família Gracioli, tios, tias, primos e primas, que no meio dessa jornada nos (à mim e ao meu esposo) presentearam com um afilhado lindo! Assim como, à Rose, Betinho, Larissa e vó Neusa e toda família que sempre me enviam muito amor e carinho. Amo vocês!

Agradeço aos amigos que Deus me deu, poucos, mas maravilhosos! Aqueles que eu levarei para sempre no meu coração e que, em outros momentos da nossa existência, nos reencontraremos!

Agradeço aos meus colegas de trabalho e professores do Grupo de Desenvolvimento de Materiais e Tecnologias Limpas da Faculdade de Química/PUCRS e da secretaria da Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais/PUCRS, pelo convívio e grande ajuda nos momentos em que precisei. Principalmente minha colega Fabiana Gonçalves, que além da amizade, em momentos em que deveria pensar na sua viagem devido ao doutorado sanduíche,

arrumava tempo para me ajudar. Estarás sempre no meu coração! Gostaria de agradecer especialmente também ao meu colega Wesley pela imensa ajuda dada no final deste doutorado, ao Léo pelas inúmeras ajudas e a Claudia, secretária da pós-graduação pelas ótimas notícias dadas em momentos em que eu estava precisando. Pessoal, muito obrigada mesmo!

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Luiz Carlos Bodanese por apoiar o desenvolvimento deste trabalho, como também, ao Dr. Sílvio Perini, que disponibilizou muito tempo e paciência para me ajudar. Muito obrigada!

Agradeço ao grupo de pesquisa da Prof^a Dr^a Vanusca da Universidade Feevale, que me forneceram espaço para que eu realizasse análises em seus equipamentos. Muito obrigada!

Por fim, agradeço de coração ao Sr. Sidival Dias e Sidival Dias Júnior da empresa A.S.Technology Componentes Especiais Ltda, pelas grandes oportunidades que me proporcionaram ao longo de todos esses anos como estagiária, mestranda e doutoranda, assim como, por acreditarem no meu trabalho.

Muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	3
DEDICATÓRIA.....	6
AGRADECIMENTOS	7
SUMÁRIO	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	16
RESUMO	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivos específicos	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1. Biomateriais poliméricos.....	24
3.1.1. Membranas Cardiovasculares	30
3.1.2. Poliuretanos	33
3.2. Utilização de fármacos.....	36
3.3. Avaliações <i>in vitro</i>.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1. Síntese e caracterização do poliuretano bioestável	43
4.1.1. Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	43
4.1.2. Espectroscopia de infravermelho (IV)	43
4.1.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear – ¹ H (¹ H-RMN).....	43
4.2. Preparação das membranas de poliuretano bioestável.....	43
4.3. Impregnação do fármaco rapamicina nas membranas poliméricas	45
4.4. Ensaio e caracterizações nas membranas poliméricas.....	45
4.4.1. Rugosidade	45
4.4.2. Microscopia de força atômica (AFM).....	46

4.4.3. Teste de inchamento.....	46
4.4.4. Ângulo de contato	47
4.4.5. Teste de calcificação <i>in vitro</i>	47
4.4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	48
4.4.7. Ensaio de resistência à tração	48
4.4.8. Análise termogravimétrica (TGA).....	49
4.4.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	49
4.4.10. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	49
4.4.10.1. Ensaio de citotoxicidade em células fibroblásticas	49
4.4.10.2. Ensaio de citotoxicidade em células epiteliais.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1. Caracterização do poliuretano bioestável.....	53
5.2. Obtenção das membranas poliméricas.....	57
5.3. Ensaio de resistência à tração das membranas poliméricas	61
5.4. Teste de inchamento.....	63
5.5. Análise de ângulo de contato.....	67
5.6. Teste de calcificação <i>in vitro</i>.....	74
5.7. Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) das membranas poliméricas	78
5.7.1. TGA e DSC da membrana polimérica com rapamicina.....	82
5.7.2. TGA e DSC das membranas após os testes de inchamento e calcificação.....	86
5.8. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	91
5.8.1. Células fibroblásticas	91
5.8.2. Células epiteliais (Empresa Biosíntesis)	94
6. CONCLUSÃO	96
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Classificação dos materiais de acordo com a sua origem (Adaptado de Olsson, 2008). 25
- Figura 3.2. Micrografia dos materiais a) poliuretano e b) PTFE antes (esquerda) e após (direita) 30 dias de degradação enzimática; com aumento de 1000x (Cabral, 2012). 28
- Figura 3.3. Preparação de membranas; a) evaporação de solvente, b) moldagem por compressão, c) rolo de moagem e d) método de disco giratório (Dash, 2012). 29
- Figura 3.4. Preparação de *scaffolds*; a) evaporação de solvente e lixiviação de partícula, b) *scaffold* fibroso, c) liofilização e d) extrusão (Dash, 2012). 30
- Figura 3.5. Número de células após 8 semanas de implantação no ventrículo direito de ratos adultos. As membranas estudadas foram de PTFE, gelatina (GEL), PGA e poli (caprolactona-lactide) (PCLA1 e PCLA2) (Ozawa, 2002). 31
- Figura 3.6. Cortes histológicos da parede do miocárdio de ratos com infarto (a) e com a membrana de poliuretano (b) após 8 semanas de implantação; corados com hematoxilina e eosina. As setas pretas indicam a área de PU implantado (Fujimoto, 2007). 32
- Figura 3.7. Reação geral de obtenção de poliuretano (Adaptado de Kloss, 2007). .. 33
- Figura 3.8. Micrografias dos filmes de poliuretano, denominado PCLH50PU, em vários tempos de degradação: 0W=0 semanas; 1W=1 semana; 2W=2 semanas; 4W=4 semanas; 8W=8 semanas e 12W=12 semanas. Com aumento de 2000x (Zhou, 2012). 35
- Figura 3.9. Histologia das artérias carótidas de rato coletadas após 14 dias de implantação; a) artéria tratada com controle e b) artéria tratada com o fármaco rapamicina. As setas indicam lâmina elástica externa (EEL) – camada de tecido rosado – e as pontas de seta indicam lâmina elástica interna (IEL), esta última referente à formação intimal – camada de tecido vermelho (Zhou, 2012). 38
- Figura 3.10. Estrutura química do fármaco rapamicina (Kahn, 2012). 39
- Figura 4.2. Câmara de evaporação de solvente. 44
- Figura 5.1. Espectro de infravermelho típico de poliuretano (Cabral, 2012). 53

Figura 5.2. Espectro de RMN- ¹ H do poliuretano sintetizado	55
Figura 5.3. Espectro de RMN- ¹ H de poliuretano sintetizado a partir do diisocianato HDI.	56
Figura 5.4. Micrografia das superfícies de PU poroso com magnificação de (a) 1000 x e (b) 8000 x.	57
Figura 5.5. Micrografia das superfícies de PU denso com magnificação de (a) 1000 x e (b) 8000 x.	58
Figura 5.6. Micrografia das superfícies de PU lixiviado com magnificação de (a) 1000 x e (b) 8000 x.	58
Figura 5.7. Morfologia dos esferulitos da blenda de PLLA/PHBV 20/80 (Jiang, 2015).	60
Figura 5.8. Micrografias das secções transversais das membranas de PU: a) PU poroso e b) PU denso; com magnificação de 1000x.	60
Figura 5.9. Micrografias das secções transversais das membranas de PU lixiviado com (a) magnificação de 1000x e (b) magnificação de 100x.	61
Figura 5.10. Curva de tensão-deformação das membranas poliméricas de PU poroso, PU denso e PU lixiviado.	62
Figura 5.11. Comportamento de inchamento nas amostras das membranas de PU poroso, denso e lixiviado com o tempo de análise.	64
Figura 5.12. Micrografias das superfícies das membranas de PU após 30 dias de teste de inchamento: a) PU poroso e b) PU denso (magnificação de 1000x).	65
Figura 5.13. Micrografia da superfície da membrana de PU lixiviado após 30 dias de teste de inchamento (magnificação de 1000x).	66
Figura 5.14. Micrografia da superfície da membrana de PU denso com rapamicina (a) antes e (b) após 30 dias de teste de inchamento (magnificação de 1000x).	67
Figura 5.15. Ângulo de contato das membranas de PU denso, lixiviado e poroso entre 0 e 30 segundos.	68
Figura 5.16. Gota de água na superfície das membranas de PU: a) PU denso após 0 segundo, b) PU denso após 30 segundos, c) PU lixiviado após 0 segundo, d) PU lixiviado após 30 segundos, e) PU poroso após 0 segundos e f) PU poroso após 30 segundos.	70

Figura 5.17. Ângulo de contato das membranas de PU denso com e sem rapamicina.	71
Figura 5.18. Gota de água na superfície das membranas de PU: a) PU denso após 0 segundo, b) PU denso após 30 segundos, c) PU denso com rapamicina após 0 segundo e d) PU denso com rapamicina após 30 segundos.....	72
Figura 5.19. Micrografias obtidas por AFM das membranas de PU denso: (a) sem rapamicina e área de 60 μm^2 , (b) sem rapamicina e área de 5 μm^2 , (c) com rapamicina e área de 60 μm^2 e (d) com rapamicina e área de 5 μm^2 .	73
Figura 5.20. Micrografias das superfícies das membranas após 30 dias de teste de calcificação <i>in vitro</i> do (a) PU poroso, (c) PU lixiviado e (e) PU denso (magnificação de 1000x), (b), (d) e (f) são os espectros de EDS das membranas (a), (c) e (e), respectivamente.	75
Figura 5.21. Micrografia da superfície da membrana de PU denso com rapamicina (a) antes e (b) após 30 dias de teste de calcificação <i>in vitro</i> (magnificação de 1000x).	77
Figura 5.22. Curvas DTG das membranas poliméricas de PU poroso, PU denso e PU lixiviado.....	78
Figura 5.23. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU poroso, PU denso e PU lixiviado com as representações da T_g e T_f	80
Figura 5.24. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU poroso, PU denso e PU lixiviado com os picos referentes a T_c	80
Figura 5.25. Curvas TG e DTG da membrana polimérica de PU denso sem o fármaco rapamicina.....	82
Figura 5.26. Curvas TG e DTG da membrana polimérica de PU denso com o fármaco rapamicina.....	83
Figura 5.27. Curvas DSC e TG/DTG da rapamicina obtidas a 20 °C/min sob atmosfera de nitrogênio (Campos, 2015).	84
Figura 5.28. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU denso com e sem rapamicina: (a) picos referentes a T_g e T_f e (b) picos referentes a T_c	85
Figura 5.29. Curvas DTG das membranas poliméricas de PU poroso antes e após os testes de inchamento e calcificação.....	87
Figura 5.30. Curvas DTG das membranas poliméricas de PU denso antes e após os testes de inchamento e calcificação.....	87

Figura 5.31. Curvas DTG das membranas poliméricas de PU lixiviado antes e após os testes de inchamento e calcificação.	88
Figura 5.32. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU poroso antes e após os testes de inchamento e calcificação.	89
Figura 5.33. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU denso antes e após os testes de inchamento e calcificação.	90
Figura 5.34. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU lixiviado antes e após os testes de inchamento e calcificação.	90
Figura 5.35. Funcionalidade mitocondrial após 24, 48 e 72 horas de cultura em contato com 50 e 100% do ME da membrana de PU poroso.	92
Figura 5.36. Funcionalidade mitocondrial após 24, 48 e 72 horas de cultura em contato com 50 e 100% do ME da membrana de PU denso.	92
Figura 5.37. Microscopia ótica das células Vero expostas ao ME contendo membrana denominada PUHM10+CB. a) Grupo controle; b) 24h – 100%; c) 24h – 50%; d) 48h – 100%; e) 48h – 50%; f) 72h – 100% e g) 72h – 50%.	94
Figura 5.38. Porcentagem de viabilidade celular das substâncias de referência (controle positivo e negativo) e do material teste (PU denso).	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Materiais e reagentes utilizados neste trabalho.....	42
Tabela 5.1. Atribuições das bandas referentes ao espectro do poliuretano sintetizado (Cabral, 2012).	54
Tabela 5.2. Módulo elástico, tensão máxima, alongação máxima, tensão na ruptura e alongação na ruptura para as membranas poliméricas.....	62
Tabela 5.3. Valores dos ângulos de contato das membranas de PU denso, PU lixiviado, PU poroso e PU denso/rapamicina em relação ao tempo de análise.....	69
Tabela 5.4. Temperatura inicial (T_i) e final (T_{fi}) de decomposição da 1ª e 2ª etapas, temperaturas de pico (T_{pico}) e % de perda de massa para as membranas poliméricas.	79
Tabela 5.5. Temperatura de fusão (T_f), cristalização (T_c), transição vítrea (T_g) e entalpia de fusão (ΔH_f).	79
Tabela 5.6. Temperatura inicial (T_i) e final (T_{fi}) de decomposição da 1ª e 2ª etapas, % de perda de massa e temperatura de pico (T_{pico}) para as membranas poliméricas de PU denso com e sem rapamicina.....	83
Tabela 5.7. Temperatura inicial (T_i) e final (T_{fi}) de decomposição da 1ª e 2ª etapas e as temperaturas de pico (T_{pico}) para as membranas poliméricas de PU poroso, denso e lixiviado após 30 dias de teste de inchamento.....	88
Tabela 5.8. Temperatura de fusão (T_f), cristalização (T_c), transição vítrea (T_g) e entalpia de fusão (ΔH_f).	91

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ΔH_f	Entalpia de fusão	
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês, <i>atomic force microscopy</i>)	
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>	
CaCl_2	Cloreto de cálcio	
CB	Celulose bacteriana	
CO_2	Dióxido de carbono	
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal	
DMA	Analisador dinâmico-mecânico (do inglês, <i>dynamic mechanical analyser</i>)	
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	
DMSO	Dimetilsulfóxido	
DSC	Calorimetria exploratória diferencial (do inglês, <i>differential scanning calorimetry</i>)	
DTG	Termogravimétrica derivada (do inglês, <i>derivative thermogravimetry</i>)	
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (do inglês, <i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>)	
H_{12}MDI	Diciclohexilmetileno diisocianato	
HDI	Hexametileno diisocianato	
ISO	<i>International Standard Organization</i>	
KCl	Cloreto de potássio	
LDI	Lisina diisocianato	
ME	Meio de extração	
MEV	Microscopia eletrônica de varredura	
M_n	Massa molar numérica média	g/mol
MTT	[3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio]	
M_w	Massa molar ponderal média	g/mol
NaCl	Cloreto de sódio	
PBS	Solução tampão fosfato (do inglês, <i>Phosphate Buffer Solution</i>)	
PCL	Poli (caprolactona)/ poli (ϵ -caprolactona)	
PCLH	Poli (ϵ -caprolactona)-hidrazona-poli(etilenoglicol)	
PCNU	Poli (carbonato-uretano)	

PDTC	Poli (carbonato dimetiltrimetileno)	
PEAD	Polietileno de alta densidade	
PEG	Poli (etilenoglicol)	
PET	Poli (tereftalato de etileno)	
PEU	Poli (éter-uretano)	
PGA	Poli (ácido glicólico)	
PHB	Poli (hidroxibutirato)	
PHBV	Poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)	
PHO	Poli (hidroxioctanoato)	
PLA	Poli (ácido láctico)	
PLGA	Poli (lactide-co-glicolide)	
PLLA	Poli (L-ácido láctico)	
PTFE	Poli (tetrafluoroetileno)	
PU	Poliuretano bioestável	
PVDF	poli (fluoreto de vinilideno)	
SFB	Soro Fetal Bovino	
TG	Curva termogravimétrica	
TGA	Análise termogravimétrica (do inglês, <i>thermogravimetric analysis</i>)	
THF	Tetrahidrofurano	
T_c	Temperatura de cristalização	°C
T_f	Temperatura de fusão	°C
T_{fi}	Temperatura final	°C
T_g	Temperatura de transição vítrea	°C
T_i	Temperatura inicial	°C
$T_{máx}$	Temperatura máxima	°C
UV	Ultravioleta	
VN	Vermelho neutro	
W_0	Peso inicial	g
W_w	Peso úmido	g

RESUMO

GRACIOLI, Emanuelli Lourenço Cabral. **Desenvolvimento de membranas de poliuretano com rapamicina e seu potencial uso na regeneração vascular.** Porto Alegre. 2016. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O uso de biopolímeros que possam substituir ou restaurar tecidos danificados no corpo humano é necessário para a melhoria na qualidade e expectativa de vida da população. Neste sentido, o presente projeto visa o estudo e desenvolvimento de diferentes membranas baseadas em poliuretano bioestável, a incorporação da rapamicina, um fármaco antitrombogênico que pode auxiliar na inibição do estreitamento dos vasos sanguíneos, e a avaliação para verificar sua potencial aplicação na área vascular. Sendo assim, as membranas obtidas apresentaram três morfologias distintas, uma membrana com superfície totalmente porosa (tamanho médio de poros de $3,3 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$) – denominada PU poroso – outra com irregularidades em sua superfície, porém sem poros – PU denso – e por fim, uma membrana com interconexões internas – PU lixiviado. Para cada membrana foram realizados ensaios como teste de inchamento e análise do ângulo de contato. O PU lixiviado apresentou maior média de absorção de fluido corpóreo e o PU poroso apresentou maior hidrofiliicidade, contudo, após a adição da rapamicina o PU denso mostrou-se mais hidrofílico. Em relação ao teste de calcificação, as três membranas apresentaram depósito de minerais, o que não ocorreu para o PU denso após a adição do fármaco. As caracterizações térmicas das membranas mostraram-se de acordo com a literatura para poliuretanos, assim como o comportamento mecânico. Por fim, os estudos de citotoxicidade mostraram que as membranas não são citotóxicas, podendo ser utilizadas dentro do nosso organismo. Dessa maneira, as membranas obtidas mostram-se interessantes e com grande potencial de uso e aperfeiçoamento.

Palavras-Chaves: membranas, poliuretano, rapamicina, vascular.

ABSTRACT

GRACIOLI, Emanuelli Lourenço Cabral. **Development of membranes of polyurethane with rapamycin and their potential use in vascular regeneration.** Porto Alegre. 2016. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The use of biomaterials that can replace or restore damaged tissues in the human body is necessary to improve the quality and life expectancy of the population. In this sense, the present project aims the study and development of different membranes based on biostable polyurethane, the incorporation of rapamycin, an antithrombogenic drug that can help about the inhibition of blood vessel narrowing, and the evaluation to verify its potential application in vascular area. Therefore, the obtained membranes showed three different morphologies, a membrane with porous surface (average pore size $3,3 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$) – named porous PU – other membrane with an irregular surface, but without porous – dense PU – and for the last, a membrane with internal interconnections – leached PU. There were realized for each membrane the tests of wettability and contact angle. The leached PU showed higher average of body fluid absorption and porous PU showed higher hydrophilicity, however after the addition of rapamycin, dense PU showed more hydrophilicity. About calcification test, both of three membranes showed minerals deposition, but this did not happen with dense PU after incorporation of drug. The thermal characterizations of the membranes were according with literature for polyurethanes, as the mechanical behavior. Lastly, the membranes did not showed in vitro cytotoxicity, which means that they could be used within our bodies. Thus, the obtained membranes showed their interesting and high potential for use and improvement.

Key-words: membranes, polyurethane, rapamycin, vascular.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o campo da medicina regenerativa tem buscado soluções para a regeneração completa de tecidos no corpo humano, empregando células vivas, biomateriais ou uma combinação destes para restaurar a estrutura e propriedades funcionais do tecido normal (Bouten, 2011).

O uso de biomateriais tem sido investigado extensivamente, sendo que, para um material ser usado como um biomaterial, algumas condições devem ser cumpridas (Dubois, 1991; Nair, 2007; Vert, 2008). Possuir biocompatibilidade é uma destas condições, podendo produzir um impacto significativo a curto e longo prazo no biomaterial implantado (Anderson, 2008). Os biomateriais devem também ser isentos de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja, o material deve ser não tóxico, não carcinogênico, não antigênico e não mutagênico. Em aplicações sanguíneas, eles devem também ser não trombogênicos (Hench, 1993), pois podem levar à hiperplasia intimal e restenose do enxerto (Filova, 2011).

Uma abordagem inicial para testar a biocompatibilidade de novos materiais é testar sua citotoxicidade *in vitro* (Nogueira, 2010), pois o cultivo de células constitui uma valiosa ferramenta para se conhecer os mecanismos pelos quais os biomateriais podem produzir reações adversas em nível celular, sendo aceito como um ótimo método sensível para testes de biocompatibilidade (Viezza *apud* Briganti, 2006; Bhatia, 2008).

Um procedimento secundário seria testar o material *in vivo*, ou seja, em modelos experimentais, a fim de avaliar o potencial imunogênico, como em testes de irritação dérmica, implantação subcutânea ou intraóssea, podendo ser utilizados animais de pequeno porte como ratos, camundongos, porquinhos da Índia e coelhos

(ISO 10993-6, 2007).

Os biomateriais podem ser formados por materiais biológicos, naturais, sintéticos, metálicos, cerâmicos, compósitos, poliméricos, entre outros diversos tipos. Sendo que, os materiais poliméricos apresentam vantagens como a versatilidade de processamento e modelagem, pois possibilitam a síntese de polímeros em diferentes composições químicas e, conseqüentemente, a obtenção de materiais com diferentes propriedades mecânicas e graus variados de biocompatibilidade, adequando-se a diferentes aplicações (Jahno, 2009; Venkatraman, 2008; Soares, 2008).

Um exemplo conhecido é o polímero poliuretano, que tem sido utilizado em várias aplicações médicas, desde válvula cardíaca, dispositivos de recuperação cartilaginosa, óssea e de meniscos de joelho, assim como na regeneração nervosa (Cohen, 2009; Jahno, 2009; Laschke, 2009; Ligabue, 2009; Meyer, 2007; Fujimoto, 2007). São considerados materiais adequados para estas aplicações devido às suas excelentes propriedades mecânicas em combinação com sua alta biocompatibilidade (Jahno, 2009). Em aplicações vasculares, quando associado a um fármaco antitrombogênico/antiproliferativo, como os fármacos sirolimos (rapamicina), tacrolimos e dexametasona, que podem inibir vias que conduzem ao estreitamento dos vasos sanguíneos (Kahn, 2012; Filova, 2011).

Dentro deste contexto, o presente estudo visa apresentar membranas poliméricas de poliuretano bioestável com diferentes morfologias que possuam comportamento adequado para aplicações vasculares, quando associadas ou não ao fármaco rapamicina. Este estudo mostra-se de grande importância para a população e para a sociedade como um todo, pois além de combinar um fármaco e um material polimérico com potencial uso na área vascular, utiliza ensaios *in vitro* em detrimento a experimentos *in vivo*, levando em consideração técnicas alternativas à utilização de animais de experimentação em pesquisa, os quais não deixam de ser necessários.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral a preparação de diferentes membranas de poliuretano bioestável com potencial aplicação na área vascular, associadas ou não ao fármaco rapamicina.

2.1. Objetivos específicos

Como objetivos específicos deste trabalho têm-se:

- Preparar membranas de poliuretano bioestável com diferentes morfologias a partir das técnicas de evaporação de solvente (método *casting*) e lixiviação de partículas;
- Incorporar/impregnar o fármaco rapamicina utilizando a técnica de imersão da membrana polimérica em uma solução concentrada de rapamicina;
- Avaliar o comportamento de inchamento das membranas de poliuretano bioestável por meio de teste de absorção de fluido corpóreo simulado e verificação do ângulo de contato, antes e após a impregnação do fármaco rapamicina;
- Avaliar a calcificação *in vitro* das membranas de poliuretano bioestável por meio de teste de calcificação antes e após a impregnação do fármaco rapamicina utilizando uma solução rica em minerais;

- Avaliar os efeitos do inchamento e calcificação das membranas de poliuretano bioestável por meio de análise morfológica, mecânica e térmica, antes e após a impregnação do fármaco rapamicina;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das membranas do poliuretano bioestável em células fibroblásticas provenientes de mamífero (linhagem celular Vero) e de células epiteliais derivadas de ovário de *hamster* chinês (linhagem celular CHO-K1 – ATCC CCL-61);

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomateriais poliméricos

Quando a estrutura biológica de órgãos ou de tecidos não pode ser reparada, uma das alternativas viáveis para o restabelecimento das funções normais do paciente é repô-la com um implante feito de um biomaterial (Barbanti, 2005). Os biomateriais são materiais usados em contato com os tecidos vivos no intuito de restaurar ou substituir tecidos danificados, podendo ser definidos como substâncias de origem natural ou sintética, utilizadas como um todo ou parte de um sistema que avalia, restaura ou substitui algum órgão, tecido ou função do corpo (Helmus, 2008), tendo biofuncionalidade e biocompatibilidade com mínima reação adversa ou rejeição pelo organismo (Cohen, 2009).

Vários são os critérios que um material precisa atender para ser enquadrado como um biomaterial. Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982 entende-se por biomaterial: “Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais”. Isto significa que, no sentido mais amplo, são enquadrados nesta categoria todos os materiais empregados na medicina, odontologia, medicina veterinária e farmacologia, além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com o tecido do corpo (Williams, 1987; Jahno, 2009). A classificação de biomateriais está descrita na Figura 3.1.

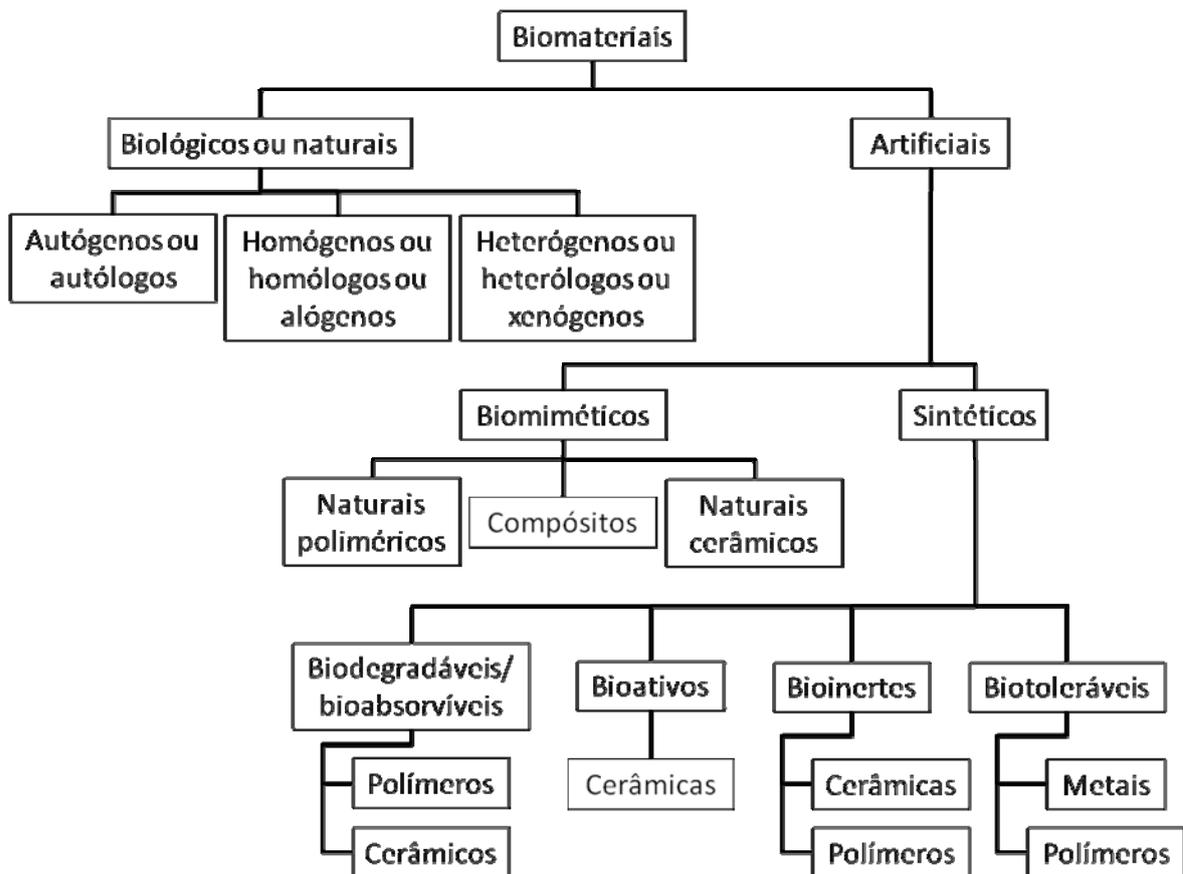


Figura 3.1. Classificação dos materiais de acordo com a sua origem (Adaptado de Olsson, 2008).

Em função do tempo de permanência no corpo humano, os implantes podem ser classificados ainda em dois grandes grupos, permanentes ou temporários. Implantes permanentes quase sempre geram fenômenos crônicos de inflamação, sendo uma resposta tipicamente benigna a um corpo estranho, mas que podem conduzir a complicações clínicas mais severas, como a contração dos tecidos (Barbanti, 2005). Os implantes temporários também podem causar processos inflamatórios devido a outros fatores, mas estes têm sido cada vez mais estudados e minimizados (Barbanti, 2005; Jahno, 2009).

Além da biocompatibilidade necessária (Nair, 2007; Vert, 2008), esses materiais devem ser isentos de induzir qualquer resposta biológica adversa – sendo não tóxicos, não carcinogênicos, não antigênicos e não mutagênicos – e dispor de boas propriedades mecânicas (Nair, 2007; Vert, 2008; Ghasemi-Mobarakeh, 2010; Bouten, 2011; McBane, 2011). Em aplicações sanguíneas, eles devem ser também resistentes à calcificação além de não trombogênicos, (Hench, 1993; Bouten, 2011).

A biocompatibilidade do substrato é influenciada pelas propriedades do tecido hospedeiro como pH, taxa de transporte de sangue, presença de lipídeos e tipo de tecido, assim como, pelas características do material: topografia, carga e estrutura química. Por exemplo, a eficácia clínica de substratos cardiovasculares sintéticos é limitada pela trombose, rejeição e inflamação crônica, gerando a calcificação, que frequentemente causa falha nas próteses de válvula cardíaca (Bouten, 2011), devido ao acúmulo de minerais na sua superfície que altera o fluxo sanguíneo.

Outra característica determinante de biomateriais é sua hidrofiliicidade/hidrofobicidade, a qual é afetada diretamente pela interação entre a superfície sintética e o sistema biológico, especialmente no ambiente aquoso como o sistema vascular, ocorrendo acumulações de peptídeos, adesão celular e depósito mineral na superfície sintética (Ghanbari, 2010), mas também por muitos outros fatores como rugosidade da superfície, heterogeneidade química, camadas adsorvidas, orientação molecular e inchamento (Pegoretti, 2008).

Dentre os materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos (Barbanti, 2005; McKenna, 2012; Zhou, 2012). Dessa maneira, se mostram como materiais biocompatíveis que são utilizados na engenharia de tecidos, servindo como uma matriz para substâncias bioativas para a liberação de drogas ou para incorporação de células (Kunert-Keil, 2012; Peng, 2010; Ghasemi-Mobarakeh, 2010).

Como alguns exemplos, o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e poli (lactide-co-glicolide) (PLGA) têm sido propostos para aplicações em ossos, vasos sanguíneos e curativos (McKenna, 2012; Bouten, 2011). O poli (etilenoglicol) (PEG) é comumente utilizado como uma fonte de hidrofiliicidade quando aplicado na área biomédica e biotecnológica. E o poli (carbonato de dimetiltrimetileno) (PDTC) exibe uma taxa de degradação lenta sob condições fisiológicas e alta cristalinidade (Peng, 2010).

A poli (caprolactona) (PCL) também tem sido considerada como um polímero biodegradável compatível com o tecido e com boas propriedades mecânicas. Este material tem sido apresentado como membranas e *scaffolds* de PCL que suportam a adesão, crescimento e diferenciação de células, desempenhando um papel vital para o sucesso da engenharia de tecidos (Kunert-Keil, 2012; Ghasemi-Mobarakeh, 2010). Biomateriais em *scaffolds* são aqueles que possuem arcabouços tridimensionais porosos e que servem de molde para a formação do novo tecido (Oliveira, 2010).

Biomateriais poliméricos que possuam taxas variadas de biodegradabilidade são vantajosos, pois dessa maneira, após certo período de tempo em contato com os tecidos acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante (Hench, 1993).

O modo de degradação de biomateriais poliméricos envolve a quebra hidrolítica ou enzimática (Anderson, 2008) de suas cadeias. Biopolímeros degradados hidroliticamente são afetados pelo tamanho, hidrofobicidade e cristalinidade dos polímeros (Ashton, 2011), tendo como grupos funcionais suscetíveis à hidrólise, como ésteres, carbonatos, amidas, entre outros (Nair, 2007). Enquanto que a estabilidade e o comportamento dos materiais frente à ação enzimática variam com o local de implante dependendo da concentração e viabilidade das enzimas (Ashton, 2011) encontradas quando o material é implantado *in vivo* (Chan-Chan, 2010).

Muitos fatores determinam a resposta inflamatória e a taxa de degradação de polímeros biodegradáveis, entre eles: local de implante, solitação mecânica, massa molar, distribuição da massa molar, composição química, cristalinidade, morfologia, envolvendo o tamanho e geometria do suporte desenvolvido, porosidade, rugosidade da superfície, pH, presença de aditivos e outros (Barbanti, 2005).

Em estudo realizado por Ghasemi-Mobarakeh e colaboradores (2010), foi avaliado o efeito de 4 horas de hidrólise alcalina em *scaffolds* de PCL, concluindo

que este período de hidrólise aumentou a hidrofiliicidade deste material sem mudanças na morfologia ou diminuição significativa da resistência à tração, produzindo *scaffolds* com propriedades adequadas para a regeneração nervosa. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo com poliuretanos sintetizados a partir de PCL mostraram estabilidade durante o período em que foram expostos aos testes de degradação hidrolítica e enzimática. Na qual mantiveram suas propriedades térmicas e demonstraram ser não citotóxicos, podendo ser utilizados dentro do nosso organismo (Cabral, 2012).

Contudo, sua morfologia superficial em comparação com materiais comerciais comumente utilizados na área cardiovascular, como o PTFE, sofreu modificações durante o período de degradação enzimática, como mostra a Figura 3.2.

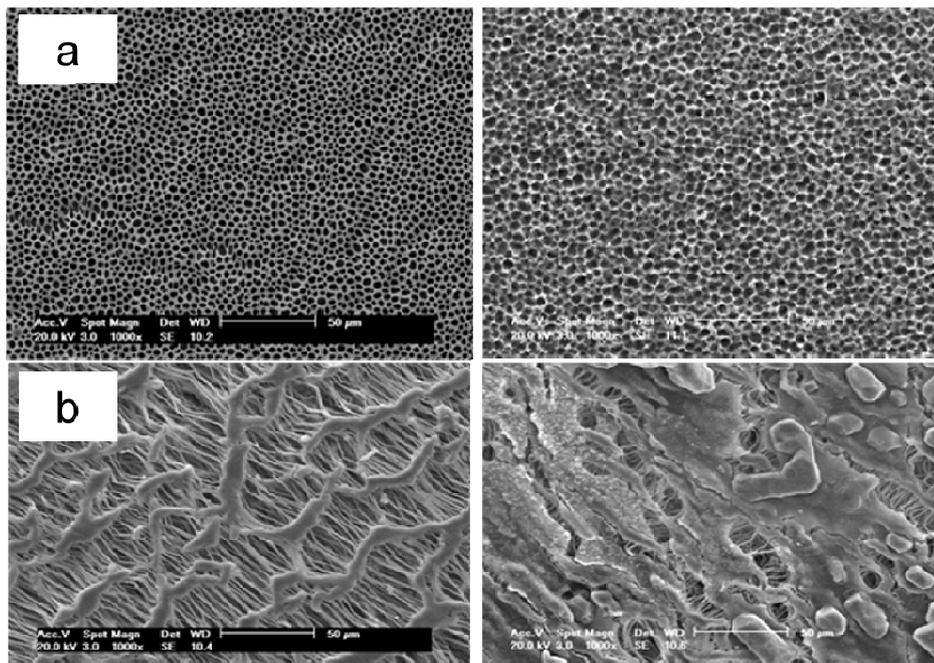


Figura 3.2. Micrografia dos materiais a) poliuretano e b) PTFE antes (esquerda) e após (direita) 30 dias de degradação enzimática; com aumento de 1000x (Cabral, 2012).

A enzima lipase degrada primeiro a parte amorfa na camada externa dos materiais (Gorna, 2002), o que pode ter ocorrido com o material comercial PTFE, que teoricamente é mais estável à degradação.

Dessa maneira, levando em consideração todos os diversos fatores que influenciam no comportamento de um biomaterial polimérico dependendo da

aplicação desejada, membranas obtidas a partir destes biomateriais podem ser preparadas por alguns métodos, como mostra a Figura 3.3 partindo do polímero PCL.

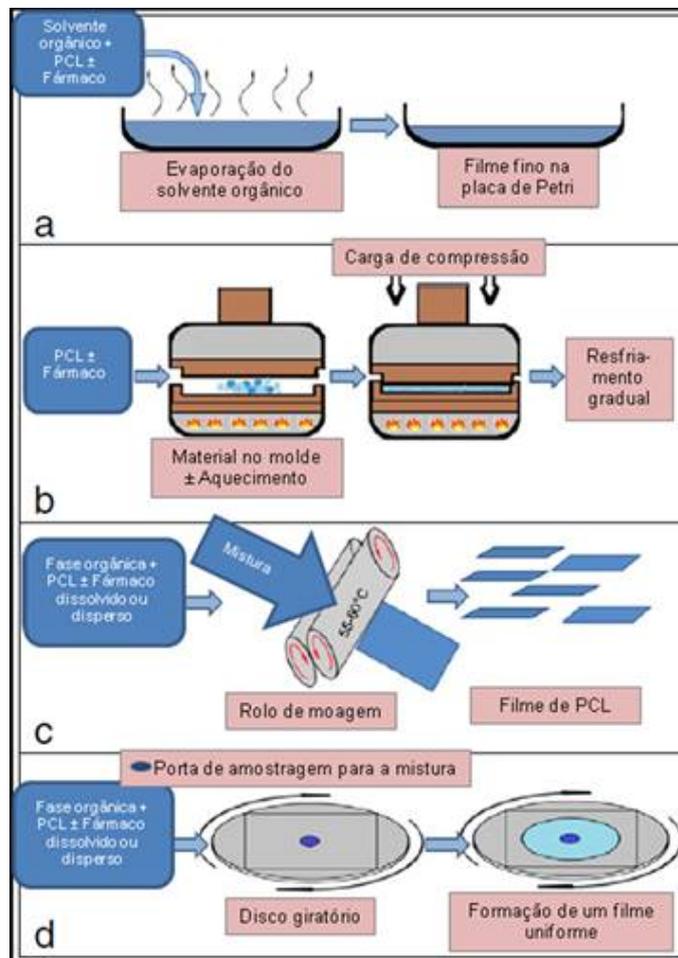


Figura 3.3. Preparação de membranas; a) evaporação de solvente, b) moldagem por compressão, c) rolo de moagem e d) método de disco giratório (Dash, 2012).

Essas membranas preparadas são avaliadas em relação à morfologia da superfície, espessura, grau de inchamento e comportamento na degradação, pois desempenham um papel vital para o sucesso da engenharia de tecidos, como a interação que ocorre entre as células e o *scaffold*, devido a sua estrutura porosa (Ghasemi-Mobarakeh, 2010; Dash, 2012). Assim, também se avaliam parâmetros como a porosidade, propriedade mecânica, citocompatibilidade e crescimento celular. Muitos estudos demonstraram a eficácia em liberação de drogas em longo prazo, aplicabilidade vascular e como carreadores de fatores de crescimento para acelerar a regeneração do tecido ou a cura/prevenção de infecções (Dash, 2012).

Assim como o uso de *scaffolds* poliméricos juntamente com células e estímulos bioativos, como os gerados pela elastina, que podem ser utilizados no controle da proliferação e migração de células musculares lisas para dentro da artéria (Blit, 2012; Pasa, 2011). A Figura 3.4 apresenta vários métodos para a obtenção de *scaffolds*, também partindo do polímero PCL.

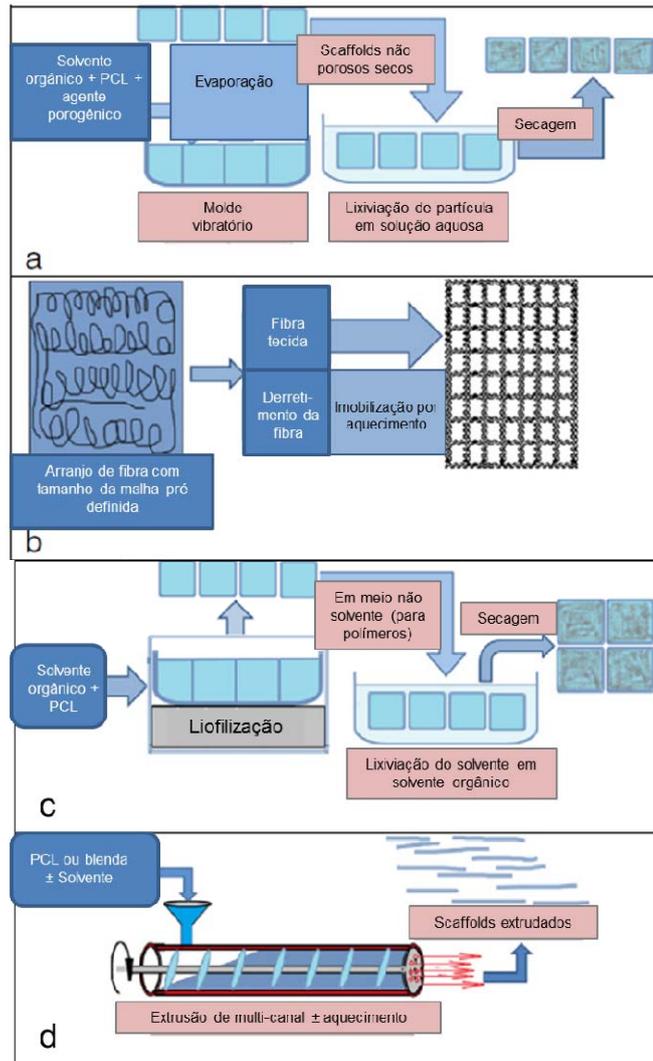


Figura 3.4. Preparação de *scaffolds*; a) evaporação de solvente e lixiviação de partícula, b) *scaffold* fibroso, c) liofilização e d) extrusão (Dash, 2012).

Dessa maneira, o desenvolvimento de materiais sintéticos que preencham todos os critérios necessários para aplicações clínicas bem sucedidas de tecidos vasculares mostra-se um extenso campo de pesquisa.

3.1.1. Membranas Cardiovasculares

O Dacron® (produzido comercialmente pela DuPont™) e PTFE (produzido comercialmente pela DuPont™ – Teflon® PTFE e pela Gore – Gore-tex) são usados como membranas vasculares (McKenna, 2012), porque são materiais biologicamente inertes, flexíveis, resistentes e não sofrem degradação biológica (Wong, 2008). Contudo, estes materiais comerciais possuem algumas limitações como trombogenicidade, calcificação e oclusão do enxerto ou infecção (Xue, 2003; Iwai, 2004; Tillman, 2009; Ghanbari, 2010; Nogueira, 2010; McBane, 2011).

De acordo com Ozawa e colaboradores (2002), em estudo no reparo do ventrículo direito do coração de ratos utilizando PTFE e polímeros baseados em PGA, PLLA e PCL, as células hospedeiras não migraram para o biomaterial PTFE, ao contrário do ocorrido com os outros materiais que favoreceram o crescimento celular em suas matrizes, proporcionando a regeneração tecidual, como mostra a Figura 3.5.

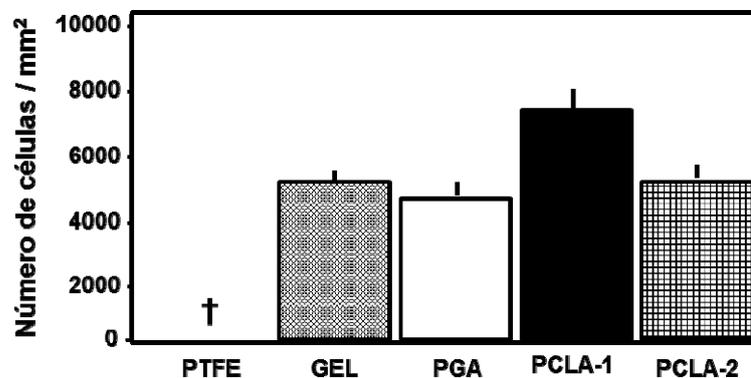


Figura 3.5. Número de células após 8 semanas de implantação no ventrículo direito de ratos adultos. As membranas estudadas foram de PTFE, gelatina (GEL), PGA e poli (caprolactona-lactide) (PCLA1 e PCLA2) (Ozawa, 2002).

Adamus e colaboradores (2012) descreveram o uso de blendas de poli (hidroxibutirato) (PHB) com poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) e poli (hidroxioctanoato) (PHO), eficazes na redução da impermeabilidade quando revestidos em próteses vasculares, como a prótese comercial DALLON®H (baseada em poliéster) a partir da técnica de *electrospinning*, mantendo sua elasticidade após o revestimento.

Enquanto que Fujimoto e colaboradores (2007) demonstraram que a aplicação na região de uma membrana cardíaca de poliuretano elástico impediu a dilatação do ventrículo esquerdo e a função contrátil, melhorando um modelo de infarto subagudo em rato, como apresentado na Figura 3.6, em que apresenta cortes histológicos da parede miocárdica do coração destes ratos antes e depois de 8 semanas de implantação.

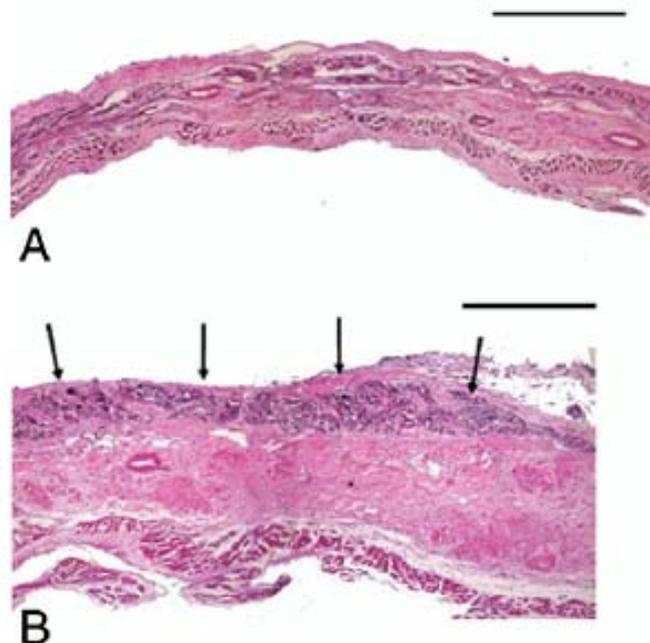


Figura 3.6. Cortes histológicos da parede do miocárdio de ratos com infarto (a) e com a membrana de poliuretano (b) após 8 semanas de implantação; corados com hematoxilina e eosina. As setas pretas indicam a área de PU implantado (Fujimoto, 2007).

Biomateriais sintéticos têm as propriedades físicas e mecânicas controláveis, sendo altamente reprodutíveis e facilmente fabricados em larga-escala (McKenna, 2012). Além disso, a capacidade de materiais poliméricos manterem ou simularem a hemodinâmica natural baseia-se no fato de terem uma estrutura flexível, que simula a rigidez exibida pelo tecido natural da válvula do coração e permite que eles se contraiam e expandam livremente em conformidade com o movimento da raiz da aorta durante o ciclo cardíaco para permitir um fluxo natural do sangue (Mohammadi, 2011).

Assim, os implantes de prótese vascular têm sido usados como forma de minimizar ou reparar doenças cardiológicas como obstruções e lesões das válvulas cardíacas através da revascularização efetiva ou temporária até a neovascularização na área atingida além do processo obstrutivo (Chouin, 2008).

3.1.2. Poliuretanos

Dentro deste contexto e, devido a sua biocompatibilidade, versatilidade química e excelentes propriedades mecânicas, os poliuretanos têm sido muito usados em vários dispositivos implantáveis (Loh, 2008; Nair, 2007). Durante os últimos anos, tem ocorrido um aumento no interesse em poliuretanos biodegradáveis para aplicações na engenharia de tecidos, e seu mecanismo de degradação tem sido estudado (Zhou, 2012), onde a taxa de degradação deve combinar com a taxa de regeneração tecidual (McBane, 2011).

Um poliuretano pode ser definido como um polímero resultante da reação entre um isocianato e um composto hidroxilado, em que ambos podem ser di ou polifuncionais, formando a ligação uretânica, apresentada na Figura 3.7.

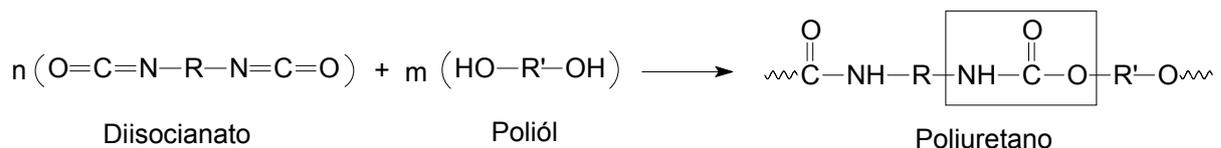


Figura 3.7. Reação geral de obtenção de poliuretano (Adaptado de Kloss, 2007).

A cadeia uretânica de um polímero poliuretano consiste de uma sequência alternada de segmentos flexíveis (formada por polióis) e segmentos rígidos (formada por diisocianatos e extensores de cadeia) (Xue, 2003; Kloss, 2007; Cabral, 2012).

Um poliuretano pode possuir uma configuração regular ou aleatória, linear ou com ligações cruzadas, fornecendo produtos com as mais variadas características desde macios e flexíveis a rígidos e insolúveis. A variação na estrutura dos poliuretanos implica também uma variação nas propriedades finais do produto, ou seja, quando se deseja obter um material com propriedades específicas, os

segmentos de cadeia devem ser escolhidos atentamente. Além disso, a variação na composição química dos poliuretanos também influencia a sua morfologia (Marcos-Fernández, 2006; Kloss, 2007).

Estes polímeros são excelentes candidatos para aplicações na engenharia de tecidos vasculares, desde que eles tenham características adequadas em termos de propriedades químicas, como orientação molecular, cristalinidade, ligações cruzadas e bioestabilidade, levando a uma boa compatibilidade com os tecidos circundantes, crescimento celular, citocompatibilidade, entre outros. Além disso, devem apresentar propriedades mecânicas favoráveis (resistência à tração, módulo elástico, entre outras), taxas de degradação controláveis, que permitam a retenção de propriedades físicas durante o período de remodelamento do novo tecido, mesmo com alta porosidade e a não calcificação, que consiste no acúmulo de minerais de fosfato de cálcio cristalinos e outros cristais de cálcio dentro do tecido ou em sua superfície (Guan, 2005; Kloss, 2007; Ghanbari, 2010; Nogueira, 2010; Bouten, 2011; McBane, 2011; Dash, 2012).

A primeira geração de enxertos vasculares de PU foi desenvolvida utilizando poliéster, resultando em dispositivos como Vascugraft, fabricado por B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Alemanha), mostrando boa biocompatibilidade. Quando comparado com enxertos de PTFE, o enxerto de PU não mostrou nenhuma diferença significativa na formação neointimal no modelo de aorta canina (Xue, 2003), apresentando rápido crescimento tecidual sem reações adversas (Gunatillake, 2003).

Em relação a taxa de degradação, poliuretanos com poliésteres como segmento flexível são altamente suscetíveis à hidrólise, devido as suas ligações ésteres, ou seja, sua degradação é dependente da natureza química do seu segmento flexível. Por outro lado, poli (éter-uretano)s (PEUs) são menos suscetíveis à hidrólise, mas são mais inclinados a degradação oxidativa. Outra classe de poliuretanos, os poli (carbonato-uretano)s (PCNUs) são conhecidos por serem mais resistentes a degradação oxidativa em relação a ambos os materiais PEU e poli

(éster-uretano)s, entretanto, dependendo da natureza química do seu segmento rígido, podem ser propensos a degradação hidrolítica (McBane, 2011).

Zhou e colaboradores (2012) realizaram um estudo para verificar a biodegradação *in vivo* de poliuretanos biodegradáveis sensíveis ao pH ($M_n=21000$ g/mol, $M_w=29000$ e $IP=1,4$) – sintetizados a partir de lisina diisocianato (LDI), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e hidrazona – através da implantação intramuscular em modelos experimentais de ratos Sprague-Dawley. Após 1 semana de ensaio observaram-se evidências de degradação pela presença de pequenos buracos na superfície (Figura 3.8). Após 2 semanas, rachaduras se formaram na maior parte da superfície do implante, sendo que, esse fenômeno pode ser atribuído a remoção de fragmentos da região amorfa do polímero. Os defeitos na superfície tornaram-se mais evidentes com o aumento do tempo de implantação, sendo esperado devido a concentração de enzimas, como as lipases, dentro do organismo humano. E, após 12 semanas, a diminuição da massa molar M_n pôde ser observada em torno de 55%, pois a quebra hidrolítica e/ou enzimática das cadeias de ligações ésteres causaram a diminuição na massa molar e nas regiões cristalinas do PCL (Zhou, 2012).

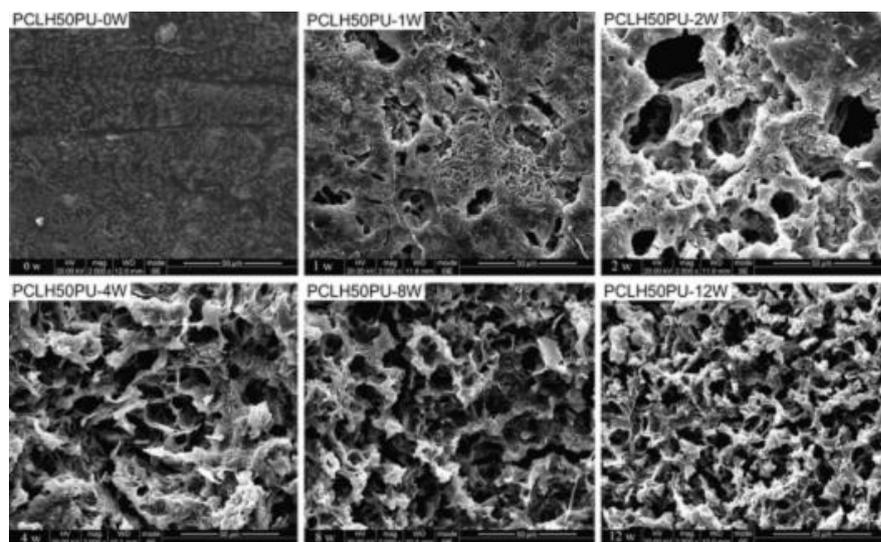


Figura 3.8. Micrografias dos filmes de poliuretano, denominado PCLH50PU, em vários tempos de degradação: 0W=0 semanas; 1W=1 semana; 2W=2 semanas; 4W=4 semanas; 8W=8 semanas e 12W=12 semanas. Com aumento de 2000x (Zhou, 2012).

Dependendo dos materiais utilizados na síntese desses biopolímeros, o processo de formação do novo tecido e de degradação destes poliuretanos pode ser

modulado ou inibido (Anderson, 2008), pois a estrutura molecular é responsável pelas suas diferentes propriedades (Canevarolo, 2007).

Ashton e colaboradores (2011) avaliaram que poliuretanos são mais complacentes, permitindo a permanência do implante em longo prazo, enquanto materiais que degradam rapidamente poderiam agir com sucesso na liberação controlada de drogas.

Um exemplo disto foi o estudo sobre a bioestabilidade de poliuretanos sintetizados com base em PCL, realizado pela avaliação da degradação hidrolítica *in vitro* durante um período de 270 dias, com o intuito de simular o tempo necessário de regeneração vascular, e por 30 dias para avaliação da degradação enzimática. Este estudo mostrou que os mesmos apresentaram perda de massa abaixo de 20% em um período de 270 dias e abaixo de 5% em um período de 30 dias. Enquanto que o material comercial Dacron (baseado em PET) apresentou perda de massa inicial em torno de 50% (degradação hidrolítica e enzimática), enquanto que o PTFE mostrou perda de massa em até 1% (Gracioli, 2013).

Chan-Chan e colaboradores (2010) mostraram em seu estudo que algumas amostras de poliuretano também baseado em PCL, sofreram ação da degradação hidrolítica, sugerindo que além da degradação do segmento flexível houve também degradação do segmento rígido. Enquanto que a taxa de degradação enzimática de polímeros baseados em PCL não foi catalisada pela ação da enzima lipase pancreática de porco (Peng, 2010), mostrando ser um material com boa estabilidade, apresentando perda de massa, devido ao ataque enzimático, de aproximadamente 12% em 45 meses (Ashton, 2011). Estes estudos corroboram com os resultados favoráveis citados anteriormente para a utilização destes novos poliuretanos na área vascular.

3.2. Utilização de fármacos

Pesquisas em torno de biomateriais poliméricos já são de grande destaque no mercado, no entanto, a aplicação destes biopolímeros que exerçam uma função

adequada dentro de uma área médica específica pode ser melhorada pela utilização de fármacos, os quais podem propiciar melhores resultados clínicos.

Na área vascular, o uso de fármacos no local de implantação, modulando sua liberação para o tecido vascular e inibindo uma ou mais vias bioquímicas que conduzem ao estreitamento dos vasos sanguíneos, é visto como uma solução a estas limitações. Podem ser classificados como anti-inflamatórios, antitrombogênicos, antiproliferativos e imunossupressores, sendo reportados como: eficazes, benéficos e de segurança na prática clínica (Kahn, 2012).

A restauração de uma nova camada de células endoteliais, geralmente, dura semanas, o que resulta na exposição direta de células musculares lisas para a corrente sanguínea por longo prazo. As plaquetas e macrófagos presentes no sangue começam a aderir à superfície do enxerto, levando à agregação plaquetária e liberação de fatores de crescimento e migração, o que estimula a proliferação excessiva de células musculares lisas e sua produção de matriz extracelular, resultando em hiperplasia intimal seguida de estenose (Filova, 2011).

Lesões ou alguns processos patológicos, como por exemplo, a aterosclerose e trombose também podem ser causadores da estenose, que significa estreitamento congênito ou adquirido de um conduto natural, e da hiperplasia intimal, que significa desenvolvimento excessivo de um tecido por multiplicação de células, danos ou estenose de uma válvula cardíaca (Filova, 2011).

Sistemas baseados em polímeros sintéticos biodegradáveis carregados com fármacos sendo continuamente liberados ao mesmo tempo em que o polímero degrada podem ser vantajosos. Esta degradação é, geralmente, hidrolítica e não mediada por células, pois assim, o sistema pode ser removido espontaneamente do organismo do paciente. Entretanto, deve-se ter um ajuste entre a cinética de degradação polimérica e liberação do fármaco para um período suficiente para que ocorra a regeneração da camada de células endoteliais (Filova, 2011).

Stents farmacológicos disponíveis comercialmente, como o BX Velocity™ e Cypher™, citados por Filova e colaboradores (2011), e *stents* impregnados com o fármaco sirolimus têm provado reduzir a formação neo-intimal em veias, assim como, a taxa de restenose, sendo reduzida de 20 a 30% para 1 a 3% em um ano. A Figura 3.9 mostra a diferença de espessura da parede de artérias carótidas de rato quando tratadas com um controle (polímero) e com um fármaco.

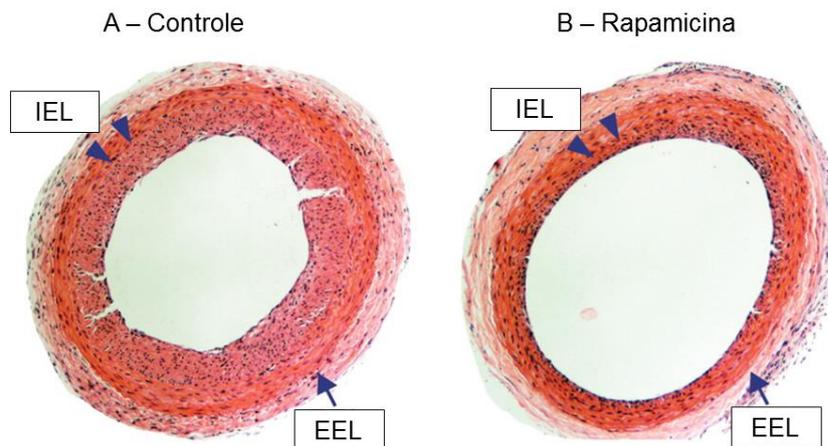


Figura 3.9. Histologia das artérias carótidas de rato coletadas após 14 dias de implantação; a) artéria tratada com controle e b) artéria tratada com o fármaco rapamicina. As setas indicam lâmina elástica externa (EEL) – camada de tecido rosado – e as pontas de seta indicam lâmina elástica interna (IEL), esta última referente à formação intimal – camada de tecido vermelho (Zhou, 2012).

Dentre inúmeros fármacos, o sirolimus, também conhecido como rapamicina, é um antibiótico macrocíclico com propriedades imunossupressoras potentes e efeito antiproliferativo, agindo como um pró-fármaco que se liga a proteínas citosólicas específicas bloqueando a proliferação de células, assim como, inibindo a inflamação e a formação de hiperplasia neointimal (Filova, 2011; Kahn, 2012). A Figura 3.10 apresenta sua estrutura química.

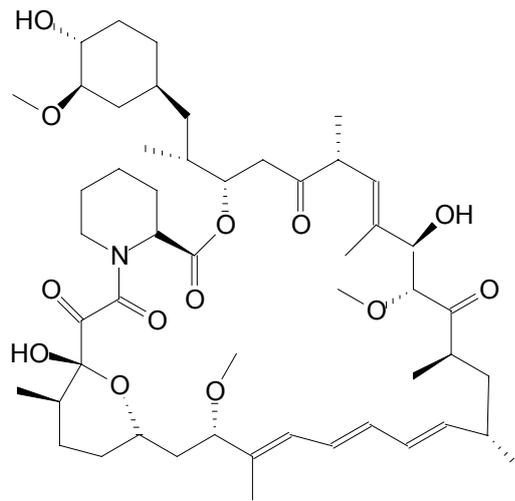


Figura 3.10. Estrutura química do fármaco rapamicina (Kahn, 2012).

Dessa maneira, o fármaco rapamicina apresenta potencial para uso na regeneração vascular quando utilizado sozinho ou impregnado em um biomaterial polimérico, sendo esta última opção como uma de nossas intenções de estudo.

Algumas pesquisas também têm sido realizadas utilizando anticorpos bloqueadores específicos, assim como, outros fármacos, como por exemplo, o paclitaxel e actinomicina D (inibidores de proliferação celular), tacrolimus (agente imunossupressor) e dexametasona (anti-inflamatório), avaliando sua cinética de liberação, dosagem com maior eficácia e segurança na prática clínica (Kahn, 2012).

3.3. Avaliações *in vitro*

A intenção de utilizar um novo material na área médica vem agregada a uma série de estudos necessários. Dentre eles sua caracterização físico-química, repetibilidade na produção, como também estudos que atestem que esse novo material possa realmente ser utilizado em reparação ou substituição a um órgão do corpo humano.

Esses estudos incluem avaliações *in vitro* do novo material por meio da cultura de células, seguidos de ensaios pré-clínicos, conhecidos como testes *in vivo*, os quais utilizam animais de experimentação, finalizados por testes clínicos, os quais são realizados em humanos.

Recentemente o CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – apresentou a Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014, reconhecendo métodos alternativos com a finalidade de redução, substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil (Brasil, 2014). Dessa maneira, estudos mais complexos, como ensaios pré-clínicos, podem ser evitados e/ou postergados.

A norma ISO 10993:2003, por exemplo, traz diferentes capítulos/partes que são utilizadas para a avaliação biológica de dispositivos médicos. A mesma é constituída por partes que trazem ensaios para verificação de efeitos locais após a implantação do material, identificação e quantificação de produtos de degradação de dispositivos poliméricos, testes de avaliação de irritação e hipersensibilidade, princípios e métodos de ensaios imunotoxicológicos, entre outros.

O estudo sobre as respostas celulares dos biomateriais também pode ser feito por meio da verificação da morfologia celular, de teste de adesão, proliferação e diferenciação, os quais fornecem informações sobre o comportamento celular em relação a um material controle. Assim, o fato das células proliferarem mais ou menos sobre o material do que no controle, indica que o material pode afetar o comportamento celular de alguma maneira (Nogueira, 2010; Anselme, 2000).

Em relação à viabilidade celular, existem também diferentes tipos de ensaios como o teste de MTT – [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio] – ensaio colorimétrico quantitativo que mensura a viabilidade mitocondrial pela redução do sal de formazan (Mossman, 1983; Guan, 2005; Silva, 2010), teste Azul de Tripán, o qual verifica a integridade da membrana plasmática pela concentração do corante de suas células viáveis e proliferação celular, e o teste Vermelho Neutro (VN), que analisa a viabilidade lisossomal (Borenfreundr, 1984; Svendsen, 2004). Assim como, diferentes testes para avaliar a genotoxicidade e carcinogenicidade, como o ensaio *Salmonella*/microsoma, conhecido como teste de Ames (ISO 10993-3, 2003), o qual emprega linhagens de *S. Typhimurium*, especialmente construídas para detectar mutações genéticas.

Dessa maneira, uma avaliação mais específica dependendo do local de intenção de uso do novo material por meio de ensaios *in vitro* se mostra necessária, sendo que são vários os ensaios possíveis de serem realizados que irão trazer respostas importantes acerca do novo material.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas, primeiro foi sintetizado e caracterizado o polímero a base de poliuretano e a partir dele foram preparadas diferentes membranas. Na segunda etapa foram avaliados os aspectos de morfologia, propriedades térmicas, mecânicas, hidrofiliicidade/hidrofobicidade e citotoxicidade *in vitro*. A Tabela 4.1 apresenta os materiais e reagentes utilizados neste estudo.

Tabela 4.1. Materiais e reagentes utilizados neste trabalho.

Produto	Origem	MM (g/mol)	Densidade (g/cm ³)
Clorofórmio deuterado (CDCl₃)	Sigma	120,38	1,49
Diciclohexilmetileno diisocianato (H₁₂MDI)	Bayer	262,34	1,07
Cloreto de sódio (NaCl)	Vetec	58,44	-
Hexametileno diisocianato (HDI)	Aldrich	168,20	1,05
Metanol (grau HPLC)	Merck	32,04	0,79
Poli (caprolactona) (PCL)	Aldrich	10.000	-
Rapamicina (Sirolimus)	Sigma	914,17	-
Solução tampão fosfato (PBS)	Sigma e LGCBio	-	-
Tetrahidrofurano (THF)	Merck	72,11	0,89

*Os reagentes foram usados como recebidos.

4.1. Síntese e caracterização do poliuretano bioestável

O poliuretano bioestável utilizado nesta tese foi baseado no poliól poli (caprolactona) (PCL) e nos diisocianatos hexametileno (HDI) e dicitclohexilmetileno (H_{12} MDI), conforme descrito na literatura (Ligabue, 2009). Sendo que, a utilização destes diisocianatos na fabricação de novos poliuretanos gerou uma patente para o grupo de pesquisa no qual pertence esta tese (Ligabue, 2012).

4.1.1. 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. As amostras foram preparadas através de uma solução do PU em tetrahidrofurano (THF) com uma concentração de 5 mg/mL.

4.1.2. Espectroscopia de infravermelho (IV)

Os espectros de Infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer Instruments Spectrum One FT-IR, modo ATR, no intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} , utilizando célula de SeZn.

4.1.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear – 1H (1H -RMN)

Os espectros de 1H -RMN foram obtidos em um espectrofotômetro Varian INOVA-300 de 300 MHz usando clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) como solvente e $SiMe_4$ como padrão interno. As atribuições foram feitas em relação ao sinal do $CDCl_3$ em 7.27 ppm.

As técnicas descritas nos itens 4.2 e 4.3 foram realizadas no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Faculdade de Química (FAQUI) da PUCRS.

4.2. Preparação das membranas de poliuretano bioestável

As membranas poliméricas de poliuretano bioestável (PU) foram obtidas utilizando duas metodologias, (a) uma consiste na evaporação de solvente (método *casting*), enquanto que (b) a outra é obtida pela lixiviação de partículas usando agente porogênico. Estas duas técnicas elucidadas a seguir são fáceis, rápidas, de baixo custo e são bem descritas na literatura (Agrawal, 2001; Sin, 2010; Dash, 2012).

- a) A membrana feita pelo método de evaporação de solvente foi preparada através de uma solução com 16% m/m de polímero PU em solvente tetrahidrofurano (THF), aplicado sobre placas de vidro. A membrana foi seca a temperatura ambiente sob atmosfera de gás nitrogênio ou ar comprimido durante 24 horas **sem controle do fluxo** em uma câmara de evaporação de solventes com um reservatório de solvente THF para promover a saturação da câmara com vapor de solvente (Figura 4.2). A membrana produzida por este método apresenta poros e foi denominada como “PU poroso” ou membrana porosa.

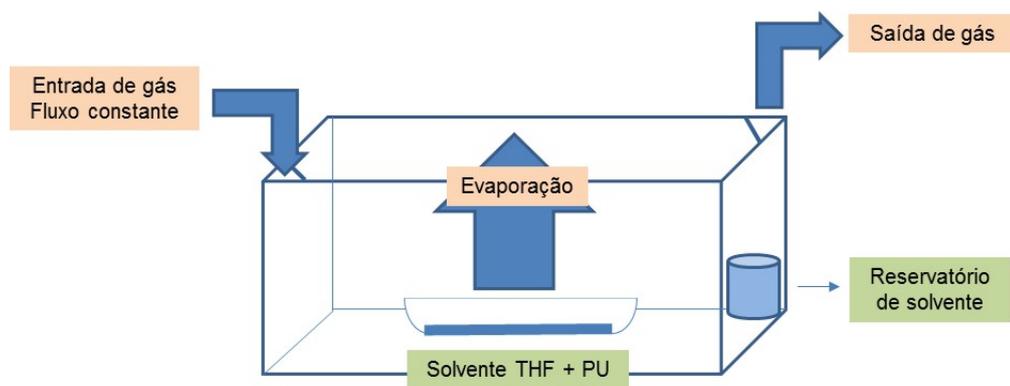


Figura 4.2. Câmara de evaporação de solvente.

- b) A membrana confeccionada pela técnica de evaporação de solvente e lixiviação de partícula foi produzida através da solubilização de 16% (m/m) do PU em THF a temperatura ambiente. Após a total dissolução do polímero no solvente, foi adicionado à solução o sal cloreto de sódio peneirado, com granulometria em torno de 74 μm como agente porogênico na proporção mássica 1:4 (polímero/sal). Essa suspensão foi vertida em uma placa de vidro e mantida durante 48 horas dentro da câmara de

evaporação de solvente. Após a evaporação do solvente e obtenção da membrana polimérica com a presença de cloreto de sódio, foi realizada a lixiviação das partículas para retirada do sal e obtenção de uma estrutura com interconexões internas. Assim, a membrana foi imersa em um béquer contendo água deionizada por um período de 2 horas em ultrassom, após foi seca sob pressão reduzida durante 6 horas à temperatura ambiente. Esta membrana foi denominada “PU lixiviado” ou membrana lixiviada.

- c) Também foi preparado outro tipo de membrana pelo método de evaporação de solvente, assim como descrito no item 4.1a, através de uma solução com 16% de polímero em THF aplicado sobre placas de vidro. Contudo, as membranas foram secas a temperatura ambiente sem a utilização da câmara de evaporação de solventes. Dessa maneira, foi obtida uma membrana denominada “PU denso” ou membrana densa.

4.3. Impregnação do fármaco rapamicina nas membranas poliméricas

As membranas de PU impregnadas com rapamicina foram obtidas utilizando técnica baseada na literatura, que consiste na imersão da membrana polimérica em uma solução concentrada do fármaco (Filova, 2011; Skalský, 2012; Yu, 2014).

De acordo com esta técnica, as membranas de PU denso, as quais foram utilizadas neste ensaio por encontrarem-se em maior quantidade em relação às outras membranas obtidas, foram cortadas nas dimensões de 0,5 cm² de área e imersas em 10 mL de solução de rapamicina em metanol na concentração de 150 µg/mL, em triplicatas, sendo retiradas após 2 horas de imersão e secas sob pressão reduzida.

4.4. Ensaio e caracterizações nas membranas poliméricas

4.4.1. Rugosidade

A rugosidade das membranas de PU denso com e sem rapamicina e de PU poroso foi avaliada com o rugosímetro SJ 201 da Mitutoyo, utilizando 0,25 de *cut-off* (comprimento de amostragem) no Laboratório de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da PUCRS. A medida foi realizada em dez pontos das membranas e os dados foram expressos pela rugosidade média (R_a).

Para a membrana de PU lixiviado não foi possível realizar essa medida devido a sua alta rugosidade na superfície, fazendo com que a ponta do rugosímetro, conhecida como *stylus*, não conseguisse percorrer a superfície.

4.4.2. Microscopia de força atômica (AFM)

A rugosidade das membranas de PU denso com e sem rapamicina também foi caracterizada por microscopia de força atômica usando o equipamento Bruker (pertencente ao LabCEMM/PUCRS), modelo Dimension Icon PT no modo Peak Force, utilizando uma sonda com ponta triangular de nitreto de silício modelo Scanasyt-Air com constante elástica nominal de 4 nN e frequência de ressonância de aproximadamente 70 kHz. Para o tratamento das imagens foi utilizado o software NanoScope Analysis.

4.4.3. Teste de inchamento

O teste de inchamento das membranas de poliuretano é baseado na norma ASTM D570 (2010), a fim de verificar o comportamento hidrofílico/hidrofóbico dos polímeros por meio da absorção de fluido corpóreo simulado – solução tampão fosfato, antes e após a impregnação do fármaco rapamicina e foi realizado no LOR/FAQUI/PUCRS.

Para tanto, as amostras, em triplicatas, foram imersas em tubos de ensaio contendo solução tampão fosfato (PBS) e mantidas em um banho termostatizado a 37 °C (similar à temperatura do corpo). Após tempos pré-determinados (3, 5, 15, 20 e 30 dias) as amostras foram retiradas e toda a solução da superfície das amostras

foi removida, para posterior medida de peso e verificação da morfologia da superfície por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A absorção de PBS foi calculada utilizando o peso úmido (após o período de imersão) (W_w) e peso inicial (antes do período de imersão) (W_0) como mostra a Equação 4.1:

$$\text{Absorção (\%)} = [(W_w - W_0)/W_0] \times 100 \quad (4.1)$$

4.4.4. Ângulo de contato

A análise de ângulo de contato realizada nas membranas de PU denso e PU lixiviado utilizou o equipamento OCA 15EC Dataphysics pertencente ao Laboratório de Estudos Avançados em Materiais da Universidade Feevale, programa SCA20_U à temperatura ambiente e o modo de gota séssil. Através do depósito de uma gota (3 μL) de água deionizada na superfície das membranas com o auxílio de uma seringa, foram realizadas medidas em quintuplicata e verificadas após 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 segundos. A área de cada membrana foi de 2 cm^2 , com espessura variando entre 0,03 a 0,10 mm. Para análise das membranas de PU poroso e PU denso com rapamicina foi utilizado o equipamento Phoenix 301 da SEO pertencente à FAQUI/PUCRS e nas mesmas condições do equipamento anterior.

4.4.5. Teste de calcificação *in vitro*

O teste de calcificação *in vitro* das membranas de poliuretano foi baseado em métodos descritos na literatura (Ghanbari, 2010; Nogueira, 2010) e realizados antes e após a impregnação do fármaco rapamicina no LOR/FAQUI/PUCRS. As membranas dos polímeros foram imersas em tubos contendo 10 mL de uma solução sintética, simulando o fluido corpóreo e rica em minerais, com uma concentração iônica de (em mM): 142,0 Na^+ , 5,0 K^+ , 2,5 Ca^{2+} , 1,5 Mg^{2+} , 148,8 Cl^- , 4,2 HCO_3^- , 1,0 HPO_4^{2-} , 0,5 SO_4^{2-} . As amostras foram mantidas sob agitação de 75 rpm em um banho termostatizado a 37°C durante tempos pré-determinados de 3, 5, 15, 20 e 30 dias. Após os tempos de análise, as amostras foram retiradas do banho e lavadas

com água deionizada para posterior análise de MEV e espectroscopia de energia dispersiva de raio-X (EDS).

4.4.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As membranas poliméricas foram analisadas antes e após a impregnação do fármaco rapamicina por microscopia eletrônica de varredura através do equipamento PHILIPS modelo XL30 (pertencente ao LabCEMM/PUCRS) com resolução de 3,5 nm (no modo secundário) e faixa de aumentos de 100 a 8000 vezes, tensão de aceleração de 20,0 kV, utilizando ouro para metalização das amostras. Assim como, pelo equipamento JEOL, Modelo JSM-6510LV (pertencente ao Laboratório de Estudos Avançados em Materiais/FEEVALE). As micrografias transversais citadas ao longo do texto foram obtidas por meio de cortes realizados nas membranas por criogenia.

A análise de EDS foi realizada para identificar elementos químicos elementares presentes nas amostras de PU após os tempos de teste, usando um espectrômetro acoplado ao equipamento PHILIPS modelo XL30, citado acima. A medida da porosidade das membranas porosas foi realizada com o auxílio do programa IMAGE J com n amostral de 20.

4.4.7. Ensaio de resistência à tração

Foram realizados ensaios de tração nas membranas de PU apenas antes da impregnação do fármaco rapamicina, devido ao tamanho de cada amostra usada nos testes de impregnação não ser adequado para este ensaio. Utilizou-se um analisador dinâmico-mecânico (DMA) da marca TA Instruments modelo Q800, a temperatura ambiente, rampa de força de 1 N/min e tensão máxima de 18 N, com corpos de prova de dimensões de 0,5 cm x 3 cm (largura e comprimento). As análises foram feitas em quadruplicata e no Laboratório de Caracterização de Materiais da FAQUI/PUCRS.

4.4.8. Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas utilizando um equipamento SDT modelo Q600 da TA Instruments pertencente ao Laboratório de Caracterização de Materiais da FAQUI/PUCRS, com programação de temperatura variando da temperatura ambiente até 800 °C, taxa de aquecimento de 20 °C/min em atmosfera de nitrogênio. Esta análise foi feita com as membranas sem e com o fármaco rapamicina impregnado.

4.4.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram feitas utilizando um equipamento de DSC modelo Q20 da TA Instruments, com programação de temperatura de -90 a 200 °C, taxa de aquecimento/resfriamento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Esta análise foi feita com as membranas sem e com o fármaco rapamicina impregnado.

4.4.10. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

4.4.10.1. Ensaio de citotoxicidade em células fibroblásticas

Estes ensaios foram realizados utilizando meios de extração (ME), soluções obtidas a partir da permanência de 1 cm² da amostra polimérica em 5 mL do meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com soro fetal bovino (SFB), em proporções de 50 e 100%, produzidos 24 horas antes da primeira exposição.

A linhagem celular utilizada foi a Vero, células fibroblásticas provenientes de mamífero, cultivadas em garrafas de 25 cm² contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (estreptomicina e penicilina). A cultura foi mantida em estufa de atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C. Os tempos de exposições foram de 24, 48 e 72 horas para os dois ensaios realizados.

Para a realização do ensaio de MTT – [3-(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio] – ensaio colorimétrico quantitativo que mensura a viabilidade mitocondrial pela redução do sal de formazan, adicionou-se em cada poço 4 µL de MTT (5 mg/mL). Após 2 horas de incubação, removeu-se o meio de cultivo e lavou-se duas vezes com dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilizar os cristais de formazan, transferindo-se 200 µL desta solução a uma microplaca de 96 poços para a posterior leitura em espectrofotômetro (*Molecular Devices, SpectraMax M3*) em 570 nm.

Para a realização do teste de Azul de Tripán, primeiramente lavou-se cada poço da placa de 24 poços com solução salina tamponada. As células foram semeadas em uma concentração de 20.000 células por poço, foram descoladas da parede do poço e homogeneizadas com Tripsina, sendo neutralizadas em DMEM com 10% de SFB e 50 µL de azul de tripan a 0,4%. Após, foi realizada a contagem das células em hemocitômetro.

Paralelamente, foram mantidas culturas apenas no meio de cultivo padrão, utilizadas como controle. Sendo que, todas as avaliações de citotoxicidade foram realizadas em triplicatas e os dados obtidos foram tratados com teste estatístico ANOVA de 1 via e as diferenças foram avaliadas pelo pós-teste de Duncan (software SPSS), considerando resultados estatisticamente significativos se $p < 0,05$.

Os ensaios descritos acima foram realizados no Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Feevale.

4.4.10.2. Ensaio de citotoxicidade em células epiteliais

Para a condução deste ensaio utilizaram-se células epiteliais, derivadas de ovário de *hamster* chinês – CHO-K1 (ATCC CCL-61) – por serem células comerciais, pré-estabelecidas, de linhagem permanente e fácil proliferação. As células foram mantidas em cultura até serem utilizadas no teste.

Este ensaio, denominado Corante Vital, foi realizado para determinar qual concentração de poliuretano-bioestável (membrana de PU denso) – material teste –

não é tóxica, assim como, a partir de qual concentração inicia-se um processo de toxicidade, a qual é determinada pela porcentagem de células que permanecem viáveis, após a exposição da população celular a diferentes concentrações do extrato do material teste.

Para calcular essa porcentagem utilizou-se um corante vital e um agente acoplador de elétrons que, ao ser incorporado pela célula, produziu um composto de coloração específica que pode ser detectado por um espectrofotômetro. A intensidade da cor resultante da incorporação celular é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura. Uma amostra é considerada citotóxica se a viabilidade celular resultante da exposição das células ao extrato de maior concentração for menor do que 70% (V.C.<70%).

Como controle negativo foi utilizado *pellets* de PEAD (polietileno de alta densidade), onde 0,94 g de PEAD foram pesados em suporte específico, esterilizado em luz UV (ultravioleta) por no mínimo 15 minutos de cada lado da amostra, totalizando no mínimo 30 minutos de esterilização. O PEAD foi utilizado para preparar um extrato na concentração de 0,2 g/mL, adicionando 4,7 mL de meio DMEM, de acordo com a quantidade de amostra pesada. O extrato foi preparado em 5 concentrações (6,25%, 12,5%, 25,0%, 50,0% e 100,0%) com fator de diluição 1:2.

Também foi utilizado um controle positivo, o látex natural, onde, após ser fragmentado, este foi pesado 0,92 g em suporte de pesagem e esterilizado em luz UV (ultravioleta) por no mínimo 15 minutos de cada lado da amostra, totalizando no mínimo 30 minutos de esterilização. O látex foi utilizado para preparar um extrato na concentração de 0,2 g/mL, adicionando 4,6 mL de meio DMEM, de acordo com a quantidade de amostra pesada. O extrato foi preparado em 5 concentrações (6,25%, 12,5%, 25,0%, 50,0% e 100,0%) com fator de diluição 1:2.

Para a aplicação e preparação do material teste, a área das amostras da substância teste foi medida e dentro do fluxo laminar 96 amostras com 0,25 cm² de área cada foram transferidas para um tubo de 15 mL estéril, a fim de obter a área total de 24 cm². O material teste foi utilizado para preparar um extrato na

concentração de 6 cm²/mL, adicionando 4,0 mL de meio DMEM. O extrato foi preparado em 5 concentrações (6,25%, 12,5%, 25,0%, 50,0% e 100,0%) com fator de diluição 1:2.

O ensaio descrito acima foi realizado pela empresa Biosintesis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados de caracterização do poliuretano obtido a partir do PCL e da mistura dos diisocianatos HDI/H₁₂MDI (na proporção 2:1), bem como as caracterizações das membranas produzidas a partir deste polímero.

5.1. Caracterização do poliuretano bioestável

O poliuretano bioestável sintetizado foi inicialmente caracterizado pela técnica de espectroscopia de infravermelho, a qual possibilitou a identificação e determinação dos grupos funcionais confirmando a síntese do poliuretano. A Figura e Tabela 5.1 apresentam o espectro de IV característico de um poliuretano e as atribuições do mesmo, respectivamente.

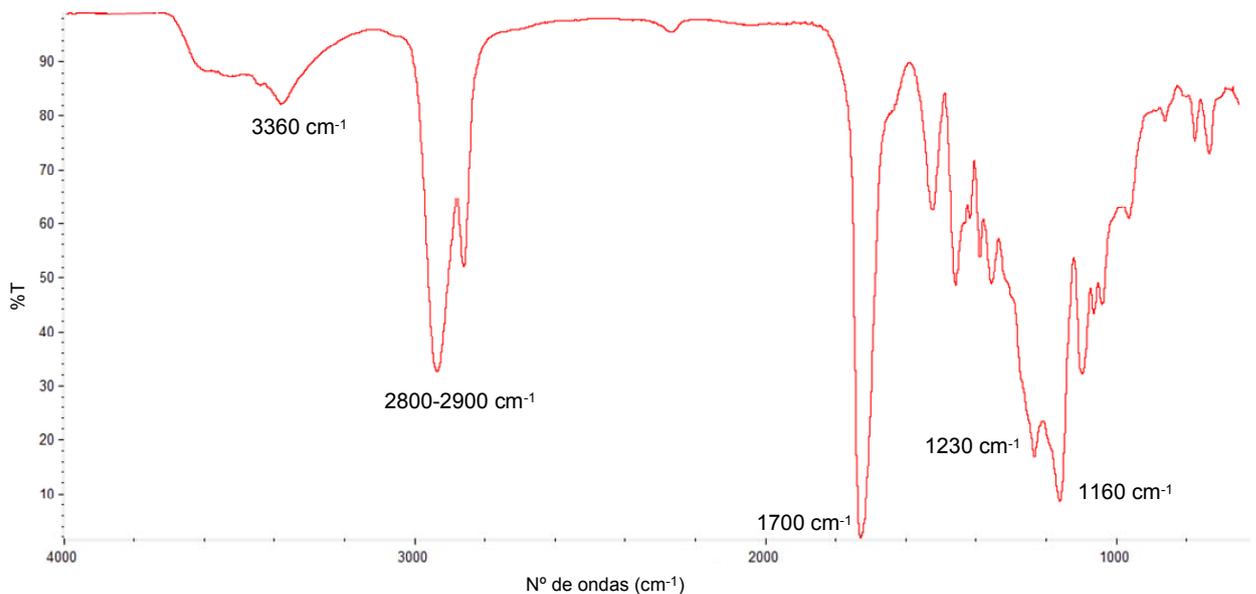


Figura 5.1. Espectro de infravermelho típico de poliuretano (Cabral, 2012).

Tabela 5.1. Atribuições das bandas referentes ao espectro do poliuretano sintetizado (Cabral, 2012).

Grupo funcional	Nº de ondas (cm ⁻¹)	Atribuição
N—H	~3360	v _s NH (uretano)
—CH ₂	~2900	v _{as} CH ₂
—CH ₂	~2800	v _s CH ₂
C=O	~1700	v C=O (uretano e éster)
—CH ₂	~1450	δ _{as} CH ₂
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C}-\text{O} \end{array}$	~1230	v CO-O (éster)
C—O	~1160	v C-O (éster)

v=estiramento; s=simétrica; as=assimétrica; δ=deformação.

Foram observadas bandas em torno de 3368-3449 cm⁻¹ que caracteriza o grupo NH pertencente ao grupo uretano, banda entre 2936-2870 cm⁻¹, característica, respectivamente, da vibração assimétrica e simétrica do grupo CH₂, banda em torno de 1723-1731 cm⁻¹ atribuída ao grupo C=O dos grupos uretano e éster, banda entre 1455-1470 cm⁻¹ característica da vibração assimétrica da ligação CH₂, banda em torno de 1232-1242 cm⁻¹ atribuída ao grupo CO-O do éster, como também, banda entre 1162-1165 cm⁻¹ característica da ligação C-O do éster, corroborando com os resultados encontrados por Chen (2000), Nagle (2007) e Silva (2010).

Também como forma de caracterizar estruturalmente o poliuretano sintetizado, o espectro de RMN-¹H foi obtido e apresentado a seguir na Figura 5.2. Enquanto que a Figura 5.3 apresenta um espectro de RMN-¹H para um poliuretano sintetizado partindo apenas do diisocianato HDI.

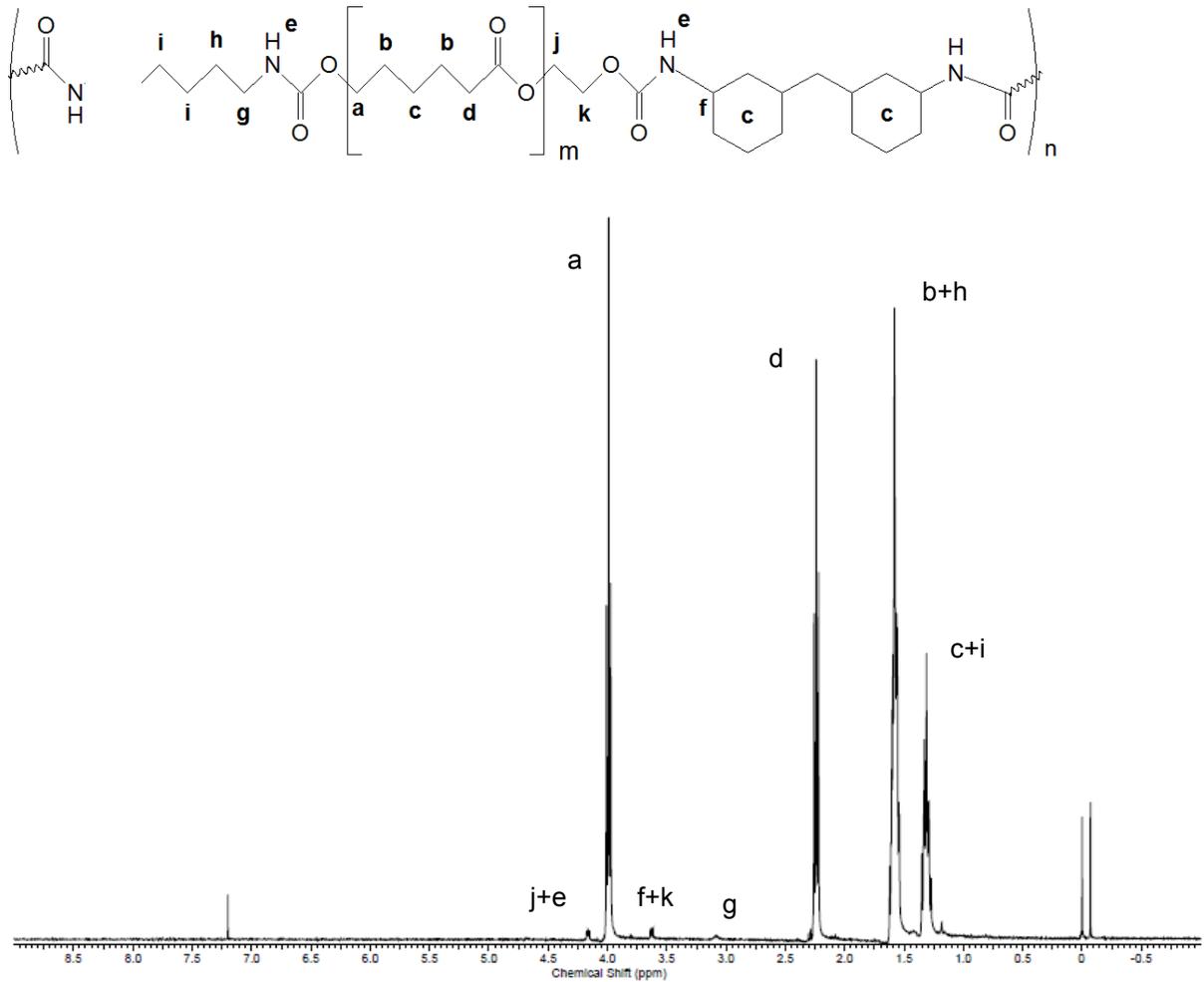


Figura 5.2. Espectro de RMN- ^1H do poliuretano sintetizado

Os deslocamentos químicos (δ) com as posições de pico característico do segmento de PCL (-CH₂-) apareceram em 1.38, 1.64, 2.30 e 4.05 ppm, enquanto que o pico referente ao grupo -CH₂-O- aparece em 3.69 e 4.23 ppm, similares aos picos descritos por Hu e colaboradores (2009).

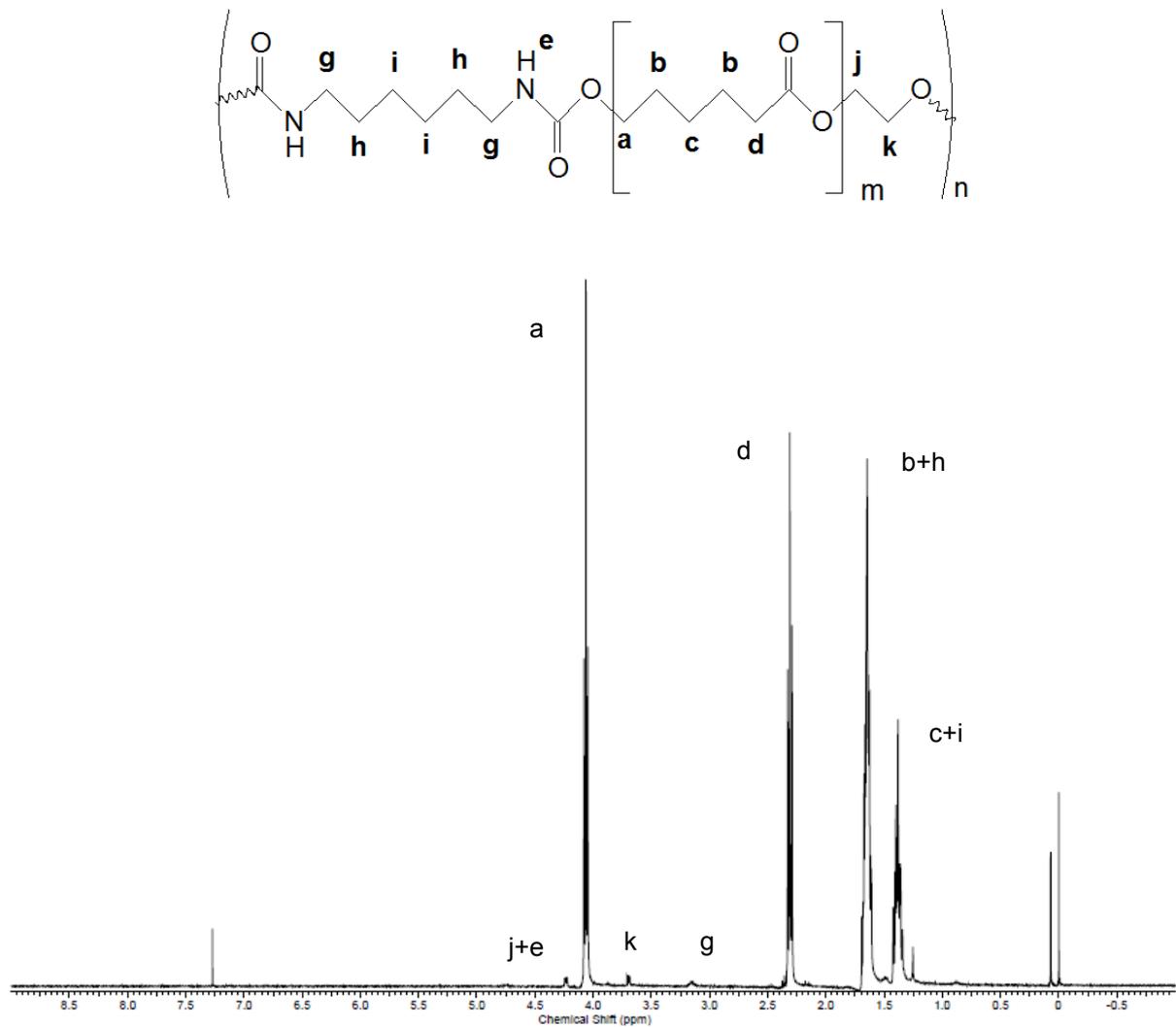


Figura 5.3. Espectro de RMN- ^1H de poliuretano sintetizado a partir do diisocianato HDI.

Em geral, os espectros dos poliuretanos mostraram-se semelhantes entre si considerando que, em ambos os casos, o poliól PCL foi o maior componente utilizado na síntese destes materiais, da mesma maneira como citado por Chan-Chan e colaboradores (2010).

Os espectros de RMN- ^1H também apresentaram deslocamentos químicos referentes ao diisocianato HDI (-CH $_2$ -), os quais apareceram em 1.38, 1.64 e 3.15 ppm, assim como, descrito por Wang e colaboradores (2011). Além disso, pode ser observado um pico em 4.23 ppm referente ao grupo -NH dos diisocianatos HDI e H $_{12}$ MDI, também evidenciado por Chan-Chan e colaboradores (2010). E em relação ao diisocianato H $_{12}$ MDI foi possível verificar mais dois deslocamentos químicos, em 1.38 ppm referente aos grupos -CH $_2$ - pertencentes ao ciclo e em 3.69 ppm referente

ao grupo -CH-. Enquanto que os sinais em 7.26, 0.06 e 0.01 ppm referem-se, respectivamente, ao CDCl_3 , possíveis impurezas e TMS.

O poliuretano sintetizado foi ainda caracterizado pela técnica de GPC, pela qual se obtiveram as massas molares de 225.571 g/mol (M_w) e 118.111 g/mol (M_n), resultando em uma polidispersidade de 1,90.

O aumento da massa molar de um poliuretano influencia as suas características mecânicas como flexibilidade e alongação, assim como a sua estabilidade em relação à biodegradação, entre outras características, podendo ser modificado em função de uma aplicação específica (Meyer, 2007).

Dessa maneira, optou-se pela continuidade do estudo por meio da obtenção de membranas poliméricas partindo do poliuretano sintetizado a fim de verificar seu comportamento para um possível uso em aplicações vasculares.

5.2. Obtenção das membranas poliméricas

As Figuras 5.4 a 5.6 apresentam as micrografias das membranas poliméricas obtidas pelas técnicas de evaporação de solvente associada ou não à técnica de lixiviação de partículas.

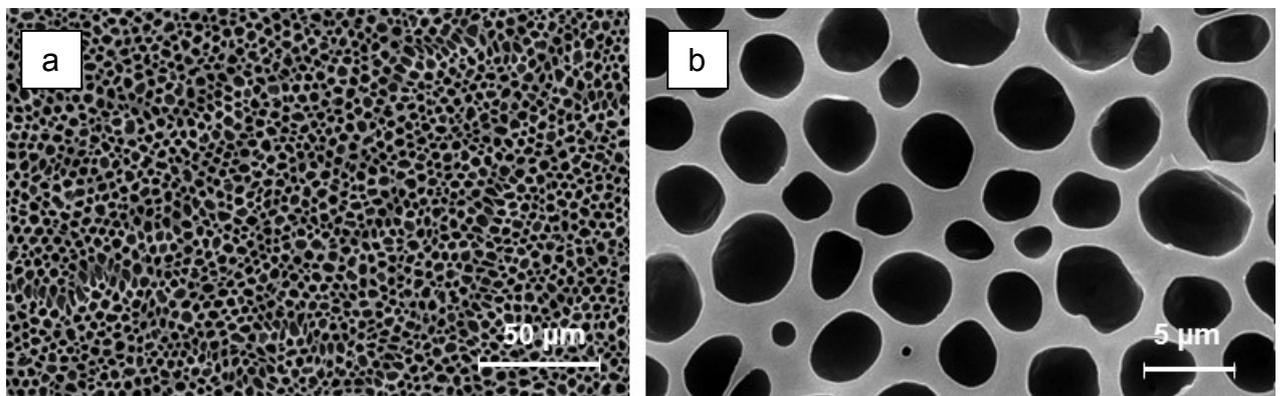


Figura 5.4. Micrografia das superfícies de PU poroso com magnificação de (a) 1000 x e (b) 8000 x.

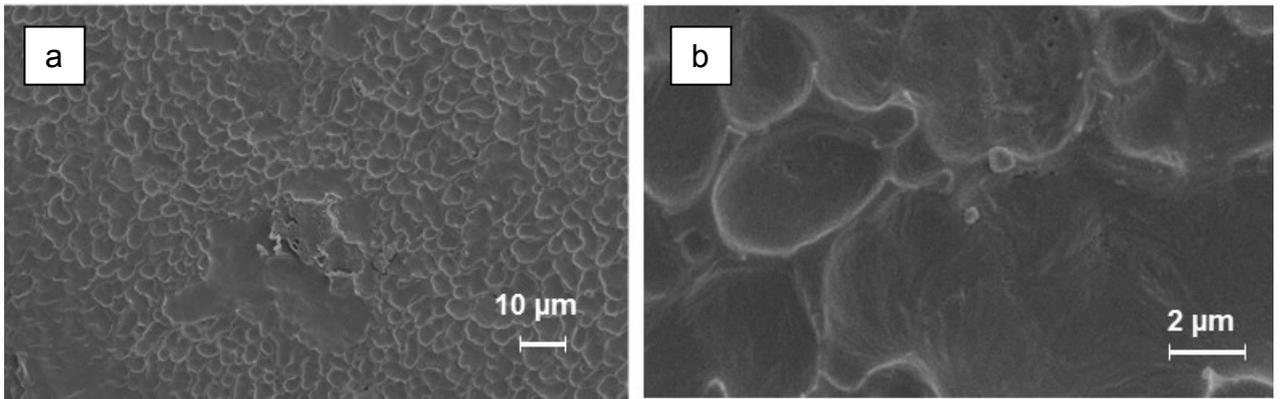


Figura 5.5. Micrografia das superfícies de PU denso com magnificação de (a) 1000 x e (b) 8000 x.

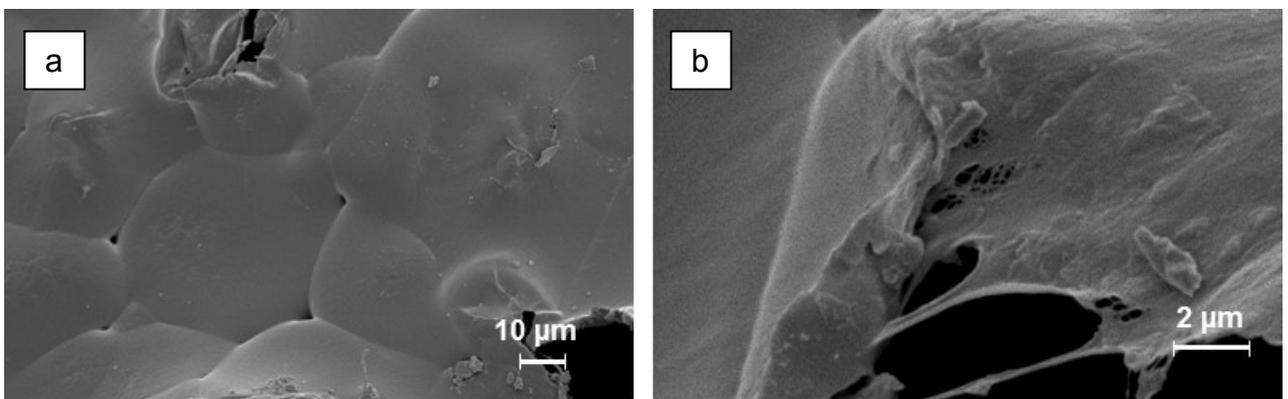


Figura 5.6. Micrografia das superfícies de PU lixiviado com magnificação de (a) 1000 x e (b) 8000 x.

As membranas preparadas por diferentes métodos apresentaram morfologias diferentes. A membrana preparada pela técnica de evaporação de solvente sob atmosfera de gás inerte (Figura 5.4) mostrou uma superfície totalmente porosa, com poros e uma distribuição homogênea com tamanho médio de poro de $3,3 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$. Uma outra membrana com uma superfície densa, ou seja, sem poros, mas com irregularidade foi obtida pela mesma técnica sem atmosfera de gás inerte (Figura 5.5). Já a membrana preparada pela técnica de evaporação de solvente e lixiviação de partículas apresentou uma morfologia densa, porém com interstícios (Figura 5.6), devido à segregação de fases formando os esferulitos. Essa separação de fases depende do polímero, de sua massa molar, do diluente, da presença de aditivos, entre outros, os quais influenciam no processo de formação da membrana polimérica (Shi, 2012).

A formação de poros, a qual está associada à forma de preparação das membranas foi realizada com o auxílio de uma câmara de evaporação de solventes. A formação deste tipo de membrana ocorre devido à evaporação lenta e gradual do solvente, pois a membrana sob efeito de um ambiente saturado de solvente e com um fluxo constante de gás inerte arrastando este solvente da membrana por um longo tempo, faz com que os poros sejam formados. Dessa maneira, foi obtida a membrana denominada de PU poroso, com tamanho de poros variando entre 2,5 a 4,1 μm e com espessura em torno de 0,07 mm (Figura 5.4).

Matrizes porosas são interessantes, pois promovem espaço adequado para a fixação das células e produção de matriz extracelular, além de crescimento interno de tecido, proporcionando a proliferação celular orientada e difusão de nutrientes, sendo capazes de controlar a forma do tecido regenerado (Sharifpoor, 2010; Sin, 2010).

A membrana com morfologia densa (Figura 5.5) foi obtida por meio da evaporação natural do solvente, isto é, sem ação de um gás de arraste e de um meio saturado de solvente. Dessa maneira, foi verificado que não ocorreu a formação de poros, contudo a superfície da membrana apresentou irregularidade. Essas membranas densas apresentaram espessura em torno de 0,07 mm.

Enquanto que a micrografia realizada da superfície da membrana obtida pela técnica de evaporação de solvente e lixiviação de partículas, denominada PU lixiviado, apresentou uma morfologia lisa, porém com regiões com interfaces bem definidas (Figura 5.6), conhecidas como esferulitos. Sua espessura mostrou-se em torno de 0,35 mm.

Shi e colaboradores (2012) citaram que a temperatura de resfriamento de polímeros tem influência nas propriedades morfológicas e de cristalinidade de membranas poliméricas, como por exemplo, nas obtidas a partir de poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF). As regiões de esferulitos das membranas de PVDF tornaram-se menores e mais uniformes devido à diminuição na temperatura de resfriamento, que

favorece a formação de núcleos cristalinos, pois os aglomerados possuem tempo suficiente para surgir, mas não crescer.

Em estudo de Jiang e Abe (2015) utilizando blendas de poli (L-lactide) (PLLA) e poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV), mostraram que ambos os componentes têm a possibilidade de cristalizarem simultaneamente, fazendo com que os esferulitos de um componente cresçam dentro dos esferulitos de outro componente. A Figura 5.7 apresenta a morfologia dos esferulitos de blenda de PLLA/PHBV em proporção 20/80.

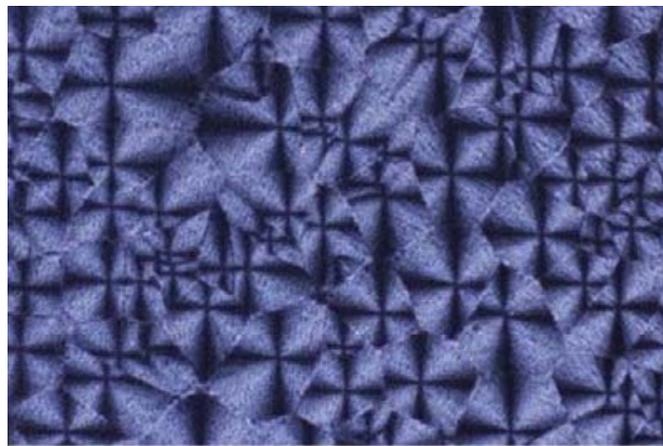


Figura 5.7. Morfologia dos esferulitos da blenda de PLLA/PHBV 20/80 (Jiang, 2015).

Também foram feitas análises morfológicas das secções transversais das membranas, as quais são apresentadas nas Figuras 5.8 e 5.9.

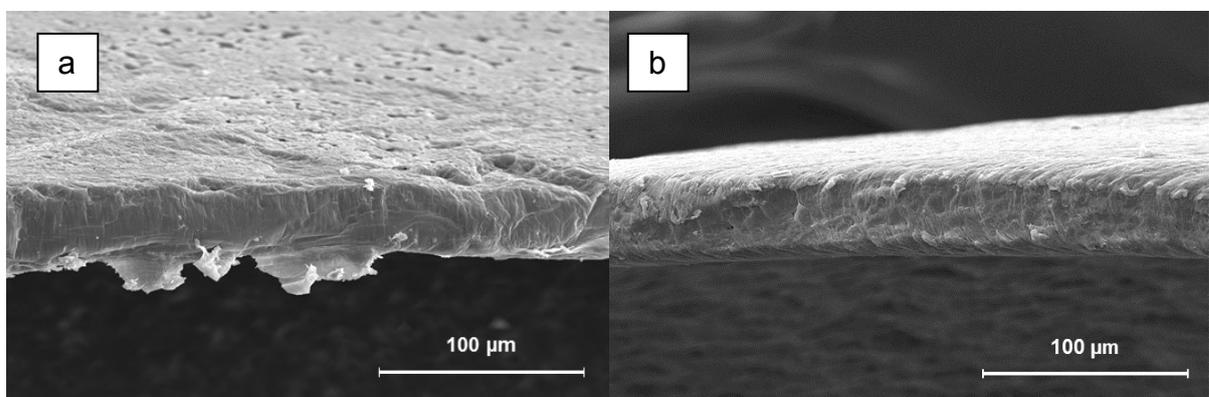


Figura 5.8. Micrografias das secções transversais das membranas de PU: a) PU poroso e b) PU denso; com magnificação de 1000x.

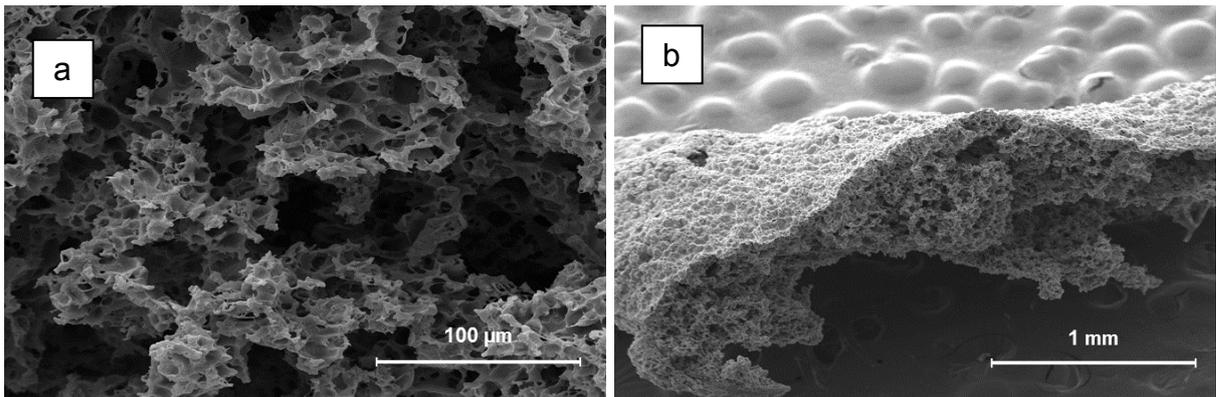


Figura 5.9. Micrografias das secções transversais das membranas de PU lixiviado com (a) magnificação de 1000x e (b) magnificação de 100x.

Pelas micrografias das secções transversais é possível observar que as membranas exibem morfologias internas diferentes. A membrana PU lixiviado (Figura 5.9) apresenta porosidade e interconexões, devido à lixiviação do agente porogênico. Enquanto que as membranas PU poroso (Figura 5.8a) e PU denso (Figura 5.8b), além de mostrar que possuem espessura similar entre si, em torno de 0,07 mm, e menor do que a da membrana PU lixiviado, em torno de 0,35 mm, apresentaram uma forma compactada, ou seja, sem porosidade interna.

A morfologia de membranas é um parâmetro importante e quando associada a outras características do material pode determinar sua possível aplicação como um biomaterial na restauração ou substituição de órgãos ou tecidos.

5.3. Ensaio de resistência à tração das membranas poliméricas

A Figura 5.10 apresenta as curvas de tensão-deformação obtidas para as membranas de PU poroso, PU lixiviado e PU denso. Assim como, a Tabela 5.2 mostra os valores de módulo elástico, tensão e alongação na ruptura e tensão e alongação máxima das membranas.

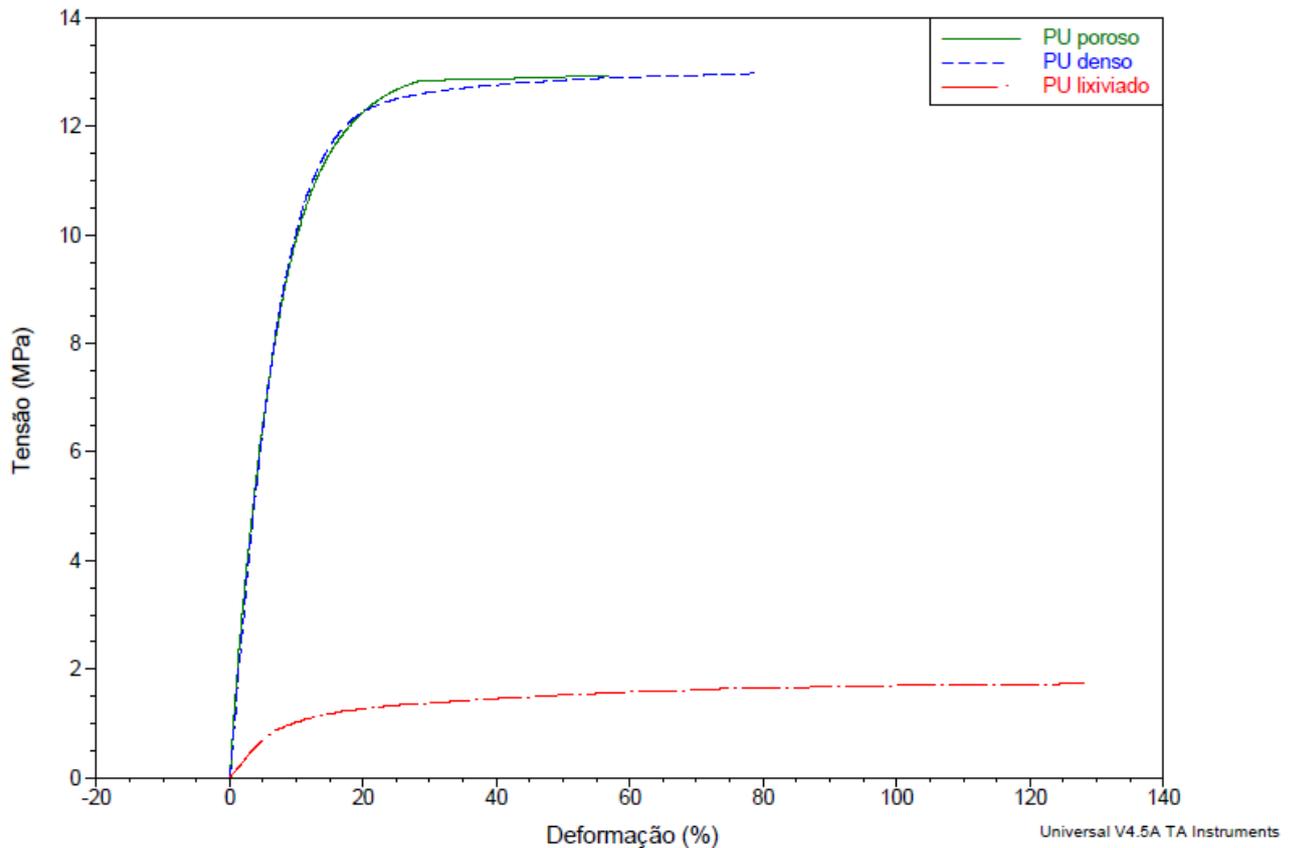


Figura 5.10. Curva de tensão-deformação das membranas poliméricas de PU poroso, PU denso e PU lixiviado.

Tabela 5.2. Módulo elástico, tensão máxima, alongação máxima, tensão na ruptura e alongação na ruptura para as membranas poliméricas.

Material	Módulo elástico (MPa)	Tensão Máxima (MPa)	Elongação Máxima (%)	Tensão na ruptura (MPa)	Elongação na ruptura (%)
PU poroso*	$1,49 \pm 0,20$	$12,9 \pm 0,90$	57 ± 3	-	-
PU denso	$1,35 \pm 0,12$	-	-	$13,0 \pm 0,16$	79 ± 27
PU lixiviado	$0,14 \pm 0,02$	-	-	$1,73 \pm 0,05$	128 ± 7

*Filme polimérico não rompeu.

A Figura 5.10 mostrou que as membranas de PU poroso e PU denso apresentaram comportamento mecânico de um material pseudoplástico. As membranas mostraram módulo elástico em torno de 1,4 MPa com alongação máxima de 57% para o PU poroso e uma alongação na ruptura de 79%, para a membrana de PU denso. Estes materiais tiveram comportamento semelhante ao descrito na literatura para membranas poliméricas comerciais à base de

polietilenotereftalato (PET) e politetrafluoretileno (PTFE) (Gracioli, 2013). Sendo que a membrana de PU poroso não sofreu ruptura com a força máxima aplicada de 18 N, ao contrário da membrana de PU denso.

Em relação ao comportamento mecânico da membrana de PU lixiviado, esta apresentou módulo elástico de 0,14 MPa e uma elongação na ruptura de 128%, isto é um comportamento tipicamente de elastômero. Ao ser comparada com as outras membranas, observou-se menor resistência (tensão na ruptura de 1,7 MPa) e possibilidade de deformações maiores, o que pode estar associado à estrutura interna da membrana e sua espessura, que se mostrou maior (0,35 mm) em relação às outras membranas (em torno de 0,07 mm).

Materiais de baixo módulo elástico, sob ação de altas tensões, podem estar sujeitos a graus indesejáveis de tensões, resultando em pouca durabilidade, como no caso de válvulas cardíacas, em que o material tem uma tendência a acumular tensão durante a abertura e fechamento da válvula (Cabral, 2012; Bernacca, 2002). Por outro lado, a preparação de membranas com dupla morfologia (poroso/lixiviado ou denso/lixiviado) pode agregar as melhores características mecânicas das membranas individuais.

5.4. Teste de inchamento

O teste de inchamento foi realizado utilizando as três membranas poliméricas obtidas, denominadas PU poroso, PU lixiviado e PU denso, a fim de verificar se ocorreram diferenças em seu comportamento devido às suas morfologias. Também foi avaliado o inchamento da membrana de PU denso impregnada com o fármaco rapamicina.

O gráfico da Figura 5.11 mostra a absorção de PBS (%) nas membranas antes da impregnação da rapamicina.

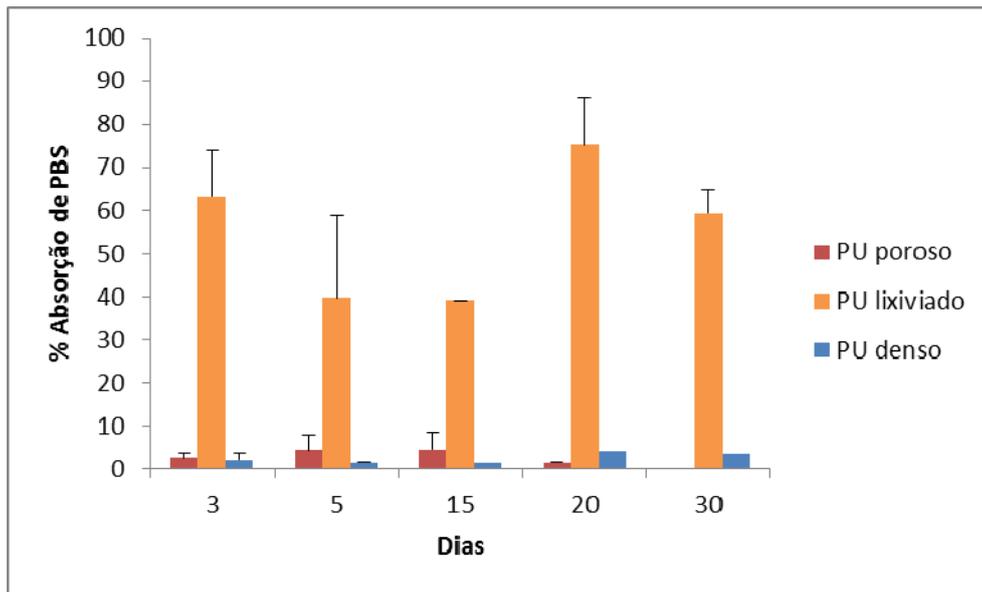


Figura 5.11. Comportamento de inchamento nas amostras das membranas de PU poroso, denso e lixiviado com o tempo de análise.

A Figura 5.11 mostra que a membrana de PU lixiviado apresentou maior percentual de absorção de fluido corpóreo simulado em relação às outras membranas, com uma média de absorção de PBS em torno de 55% ao longo do tempo de exposição. Entretanto, nas mesmas condições, as membranas de PU denso e poroso mostraram essa média de absorção em torno de 3%.

Neste caso, acredita-se que a morfologia da membrana lixiviada (Figuras 5.6 e 5.9) tenha ajudado na permanência da solução de PBS em sua superfície, devido a sua maior rugosidade e presença de pequenos poros. As outras membranas apresentaram uma morfologia porosa e lisa, fazendo com que o PBS passasse por através destes poros ou por cima da superfície densa sem permanecer.

Sendo que, apesar da similaridade de inchamento entre as membranas de PU poroso e denso, a rugosidade da superfície das mesmas mostrou-se diferente, como também é possível verificar pelas suas morfologias (Figura 5.4 e 5.5). A membrana de PU poroso apresentou uma rugosidade média em torno de $0,9 \mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$, enquanto que a rugosidade média da membrana de PU denso mostrou-se em torno de $0,3 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$.

Em estudo realizado por Peng (2010), foi mostrado que a hidrofiliçidade de membranas porosas (fabricadas utilizando a técnica de *electrospinning*) foi maior em relação às membranas fabricadas por compressão, devido à presença de poros em sua estrutura.

As Figuras 5.12 e 5.13 apresentam as micrografias das membranas após 30 dias de teste de inchamento.

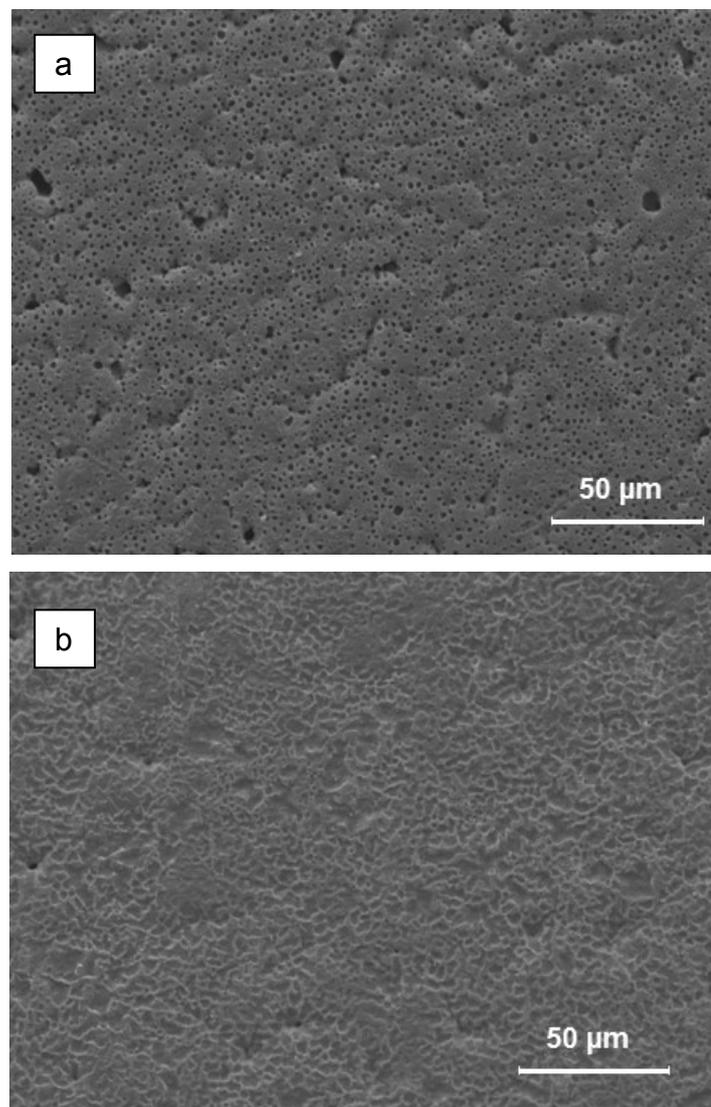


Figura 5.12. Micrografias das superfícies das membranas de PU após 30 dias de teste de inchamento: a) PU poroso e b) PU denso (magnificação de 1000x).

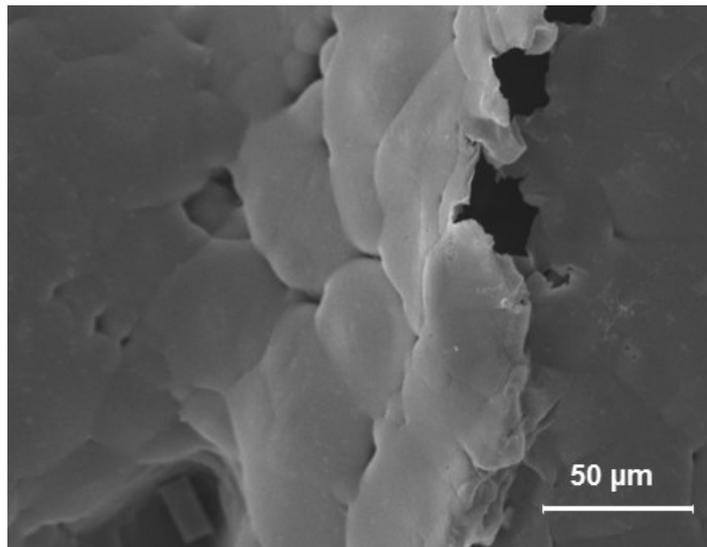


Figura 5.13. Micrografia da superfície da membrana de PU lixiviado após 30 dias de teste de inchamento (magnificação de 1000x).

A partir das micrografias apresentadas nas Figuras 5.12 e 5.13 foi possível verificar poucas diferenças nas superfícies das membranas poliméricas após 30 dias em teste de inchamento quando comparadas às micrografias das membranas antes de qualquer análise (Figuras 5.4 a 5.6). A perda de definição dos poros está bem definida para a membrana PU poroso (Figura 5.12a), levando a interação da mesma com o fluido corpóreo. Para as outras membranas, a diferença na sua morfologia superficial não é perceptível, embora tenham apresentado absorção de PBS.

Este mesmo ensaio foi realizado na membrana PU denso após a impregnação do fármaco rapamicina. A absorção de PBS ao longo do tempo de análise não foi significativa, embora após 30 dias a absorção tenha se apresentado em torno de 5%. Este comportamento mostrou-se um pouco diferente do apresentado pela membrana PU denso sem o fármaco, o qual apresentou hidrofobicidade ao longo do tempo do teste com uma média de absorção de PBS de 3%, e não apenas com 30 dias de análise. Sendo que, a rugosidade média da membrana PU denso com rapamicina apresentou um valor em torno de $0,4 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$, enquanto que a membrana sem o fármaco apresentou um valor em torno de $0,3 \mu\text{m}$. A Figura 5.14 apresenta a micrografia da membrana PU denso com rapamicina antes e após 30 dias de teste.

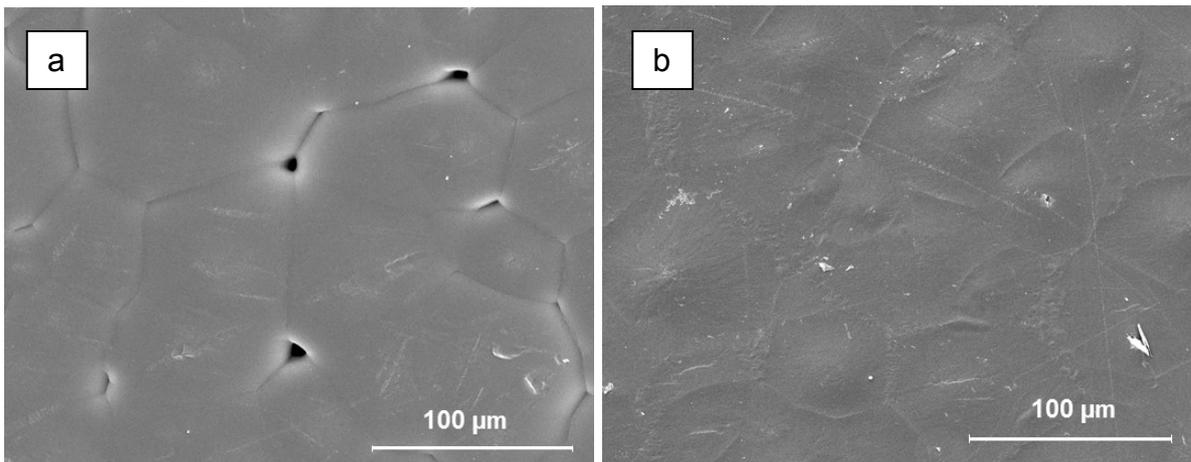


Figura 5.14. Micrografia da superfície da membrana de PU denso com rapamicina (a) antes e (b) após 30 dias de teste de inchamento (magnificação de 1000x).

Pode-se observar que, assim como sua rugosidade, sua morfologia também foi modificada em relação ao mesmo período de teste e a mesma membrana, porém sem o fármaco (Figura 5.12b), assim como em relação a membrana de PU com a rapamicina antes do teste (Figura 5.14a). Yu e colaboradores (2014) citaram que a morfologia rugosa da superfície de um filme de PCL poderia estar associada à rapamicina impregnada de uma maneira não homogênea.

Dessa maneira, verifica-se que a rugosidade da membrana permanece similar à sem a impregnação da rapamicina, podendo favorecer ou não a absorção de PBS na matriz polimérica, o que por sua vez, influencia sua característica hidrofílica/hidrofóbica.

5.5. Análise de ângulo de contato

A análise de ângulo de contato foi realizada nas três diferentes membranas obtidas, PU denso, PU lixiviado e PU poroso, a fim de confirmar a característica hidrofílica ou hidrofóbica destas membranas.

Uma membrana poderá ser considerada hidrofílica com um ângulo de contato de 10° , hidrofóbica com um ângulo de contato entre 90° e 150° e altamente hidrofóbica quando apresentar um ângulo de contato maior que 150° , similar ao descrito por Pegoretti e colaboradores (2008).

A Figura 5.15 apresenta um gráfico com o comportamento do ângulo de contato das membranas em relação ao tempo (0 a 30 segundos) de análise.

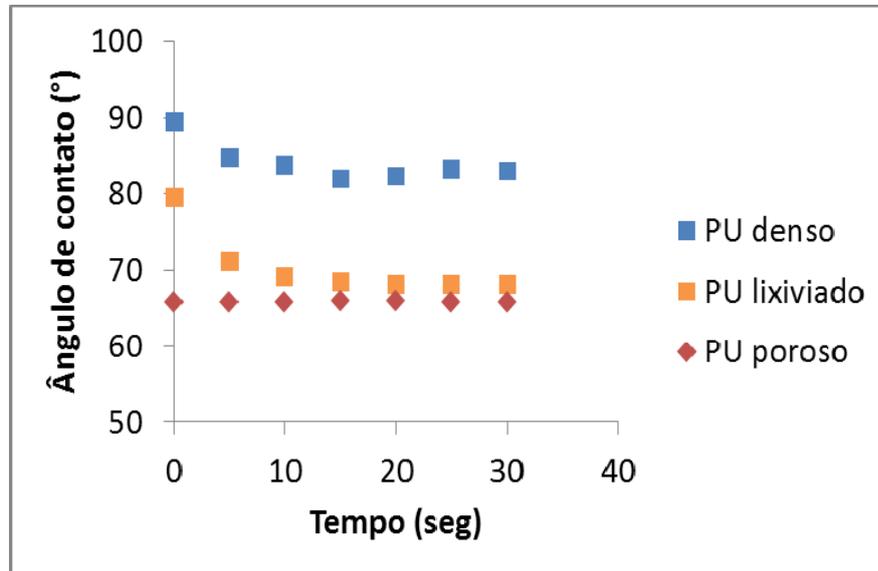


Figura 5.15. Ângulo de contato das membranas de PU denso, lixiviado e poroso entre 0 e 30 segundos.

De acordo com a Figura 5.15, pode-se observar que todas as membranas obtidas apresentaram ângulos de contato entre a gota e suas respectivas superfícies menores do que 90° , sendo consideradas predominantemente molhantes, ou seja, propensas à hidrofiliicidade (Pegoretti, 2008). Para as membranas de PU denso e lixiviado, foi possível verificar um decréscimo inicial em seus respectivos ângulos de contato, diferente do observado para a membrana PU poroso que se manteve constante.

A Tabela 5.3 apresenta os valores de ângulo de contato e seus respectivos desvios padrões em relação ao tempo de análise, de 0 a 30 segundos.

Tabela 5.3. Valores dos ângulos de contato das membranas de PU denso, PU lixiviado, PU poroso e PU denso/rapamicina em relação ao tempo de análise.

Tempo (seg)	Ângulo de contato (°)			
	PU denso	PU lixiviado	PU poroso	PU denso/rapamicina
0	90 ± 9	79 ± 7	65,8 ± 0,8	69,4 ± 0,6
5	85 ± 7	71 ± 1	65,8 ± 0,7	69,5 ± 0,7
10	84 ± 7	69 ± 2	65,8 ± 0,7	68,7 ± 0,6
15	82 ± 9	69 ± 2	65,9 ± 0,5	68,6 ± 0,6
20	82 ± 8	68 ± 2	65,9 ± 0,5	67 ± 1
25	83 ± 8	68 ± 2	65,8 ± 0,6	68,9 ± 0,1
30	83 ± 8	68 ± 1	65,8 ± 0,6	69,3 ± 0,3

A membrana de PU denso apresentou superfície mais hidrofóbica com uma média de ângulo de contato de 84°, em relação à membrana de PU lixiviado que apresentou uma média de ângulo de contato de 70°. Tal fato corrobora com o teste de inchamento (Item 5.4), em que as membranas de PU denso mostraram 3% de absorção de PBS, enquanto que as membranas de PU lixiviado apresentaram 55% de absorção do mesmo fluido. Isto pode ser explicado pelas diferenças entre suas superfícies, com e sem rugosidades, sendo que a membrana de PU denso apresentou uma rugosidade média de 0,3 µm enquanto que para a membrana de PU lixiviado não foi possível realizar esta medida devido à sua alta rugosidade superficial. Da mesma maneira como citado na literatura, filmes poliméricos porosos baseados no monômero polietilenoglicol (PEG) apresentaram rápida resposta a invasão de água e rápida queda no ângulo de contato (Peng, 2010).

Entretanto, a membrana de PU poroso que, assim como a membrana de PU denso, também apresentou uma absorção média de PBS em torno de 3% (Item 5.4), mostrou um comportamento de maior hidroflicidade em relação às outras membranas – com uma média de ângulo de contato de 65°. O fato da membrana apresentar poros em sua superfície, ou seja, espaços em que o fluido corpóreo pode penetrar e agir, aumenta essa hidroflicidade, sendo que a mesma apresentou uma rugosidade maior (em torno de 0,9 µm) em relação a membrana de PU denso (0,3 µm). Tanto a membrana de PU denso quanto a membrana de PU poroso apresentaram uma superfície menos heterogênea em relação à membrana de PU

lixiviado, que mostra, além de poros, regiões mais altas em sua superfície. Entretanto, de acordo com a micrografia transversal da membrana de PU lixiviado (Figura 5.9), a mesma apresenta maior espessura (0,35 mm em comparação com 0,07 mm) e mais regiões com interconexões propensas à entrada de fluido corpóreo, por isso o fato de apresentar uma maior absorção de fluido, mas um menor ângulo de contato do que a membrana de PU denso.

A Figura 5.16 apresenta a gota de água nas superfícies das membranas em diferentes tempos.

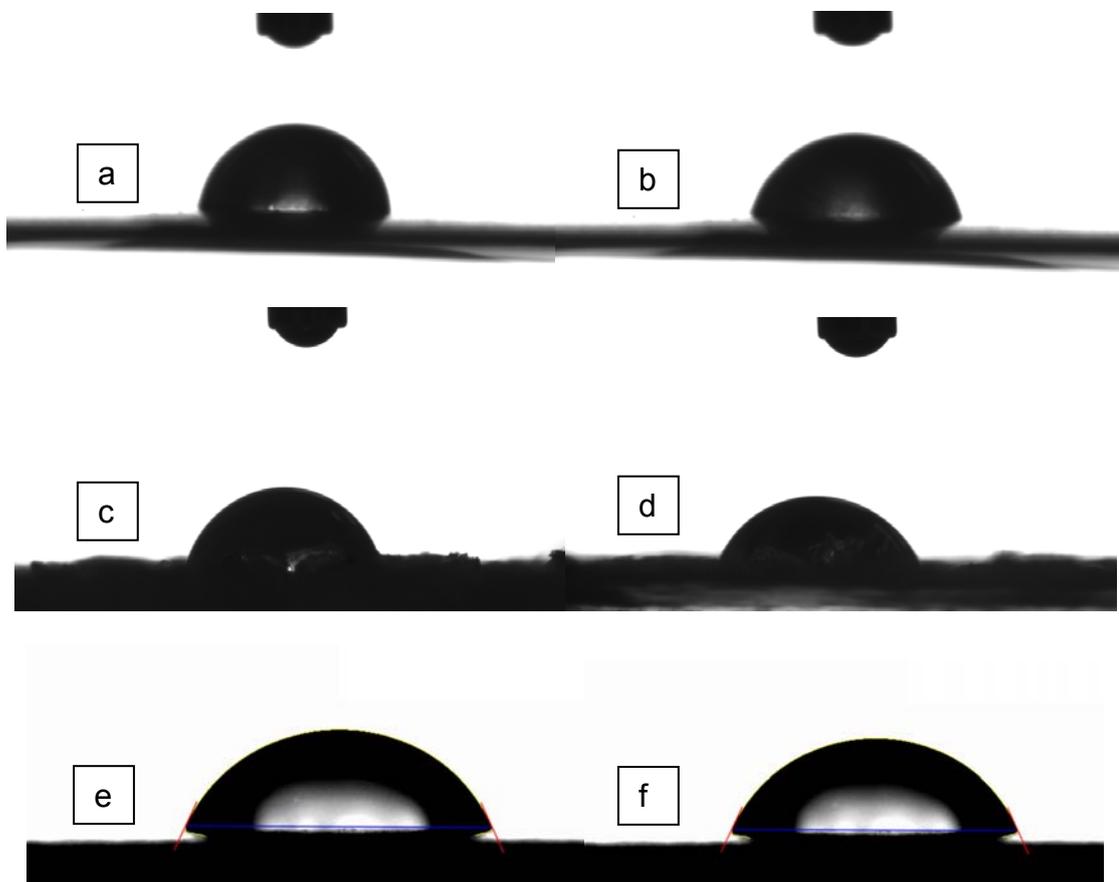


Figura 5.16. Gota de água na superfície das membranas de PU: a) PU denso após 0 segundo, b) PU denso após 30 segundos, c) PU lixiviado após 0 segundo, d) PU lixiviado após 30 segundos, e) PU poroso após 0 segundos e f) PU poroso após 30 segundos.

A hidroflicidade e a habilidade de absorção de água têm efeito negativo no processo de degradação de alguns materiais, sendo que, na Figura 5.16 é possível verificar que não há uma diferença significativa de ângulo de contato das mesmas membranas. Para a membrana de PU denso (Figura 5.16a/b), seu ângulo passou de

90° para 83° em 30 segundos. Enquanto que para a membrana de PU lixiviado (Figura 5.16c/d), seu ângulo mudou de 79° para 68°. Essa diferença pode indicar um aumento da hidrofiliabilidade da superfície da membrana após o tempo de 30 segundos. Já para a membrana de PU poroso (Figura 5.16e/f), os ângulos de contato permaneceram constantes em 66°, como já comentado anteriormente.

Sendo que, além desta análise ter sido realizada nas membranas obtidas com diferentes morfologias, foi também feita na membrana de PU denso impregnada com o fármaco antitrombogênico rapamicina para verificar seu comportamento de hidrofiliabilidade/hidrofobicidade.

A Figura 5.17 apresenta uma comparação dos valores dos ângulos de contato obtidos para a membrana de PU denso antes e após a impregnação da rapamicina.

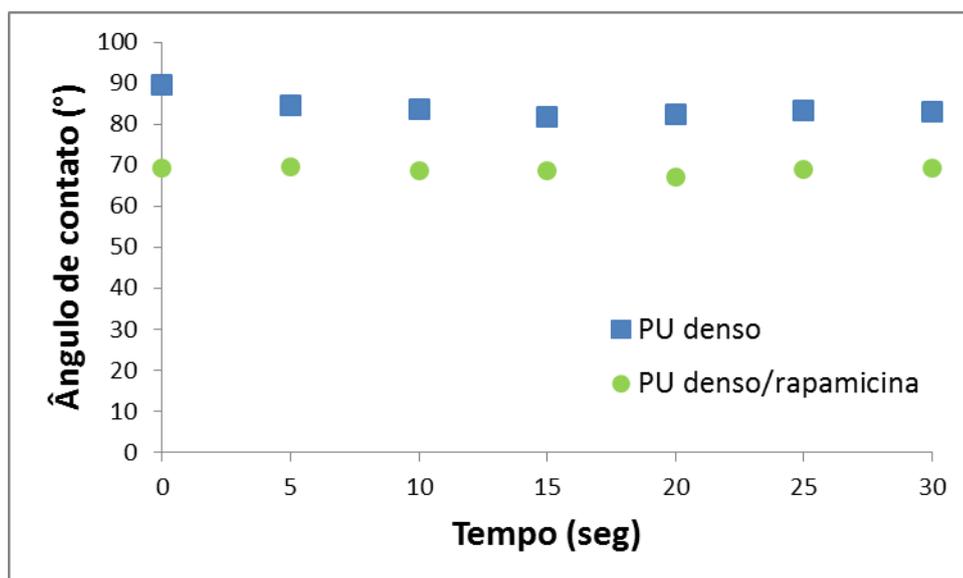


Figura 5.17. Ângulo de contato das membranas de PU denso com e sem rapamicina.

A partir da Figura 5.17 é possível verificar que houve diminuição dos valores de ângulos de contato da membrana de PU denso após a impregnação do fármaco rapamicina. A média do valor do ângulo de contato da membrana de PU denso era de 84° passando para 69° com a adição da rapamicina. Sendo que, sua rugosidade aumentou em relação à membrana sem o fármaco, de 0,3 μm para 0,4 μm , assim como citado na literatura em que a morfologia superficial de uma membrana com rapamicina apresentou irregularidades (Carvalho, 2014). O ângulo de contato em

superfícies não ideais é influenciado, entre outras características, pela heterogeneidade química, camadas adsorvidas, orientação molecular e inchamento (Pegoretti, 2008).

Esse comparativo também pode ser visto pela gota de água em suas superfícies, apresentada na Figura 5.18.

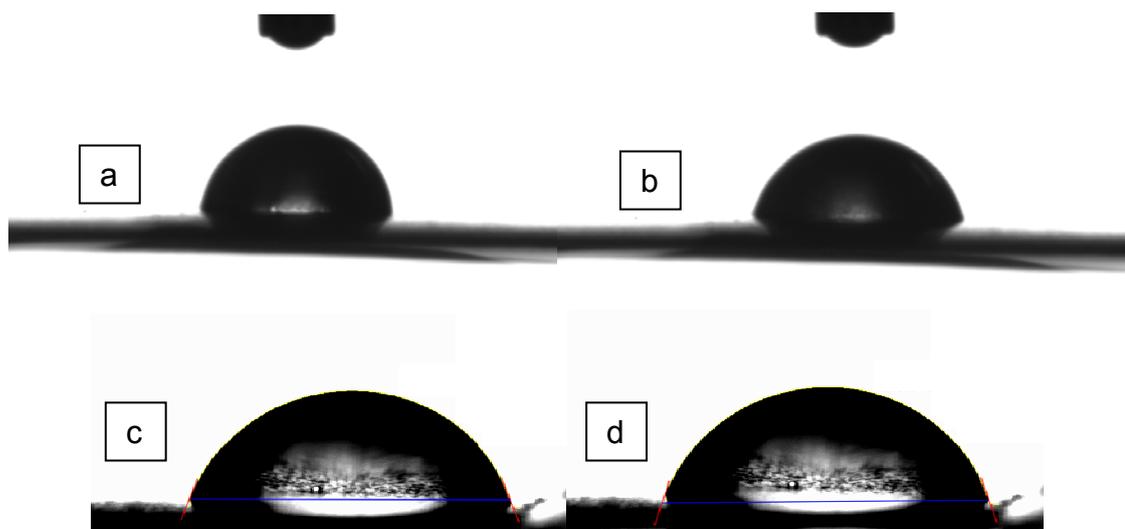


Figura 5.18. Gota de água na superfície das membranas de PU: a) PU denso após 0 segundo, b) PU denso após 30 segundos, c) PU denso com rapamicina após 0 segundo e d) PU denso com rapamicina após 30 segundos.

Também pela análise de AFM das membranas de PU denso com e sem rapamicina, pode-se verificar essa diferença em sua rugosidade superficial, como mostra a Figura 5.19.

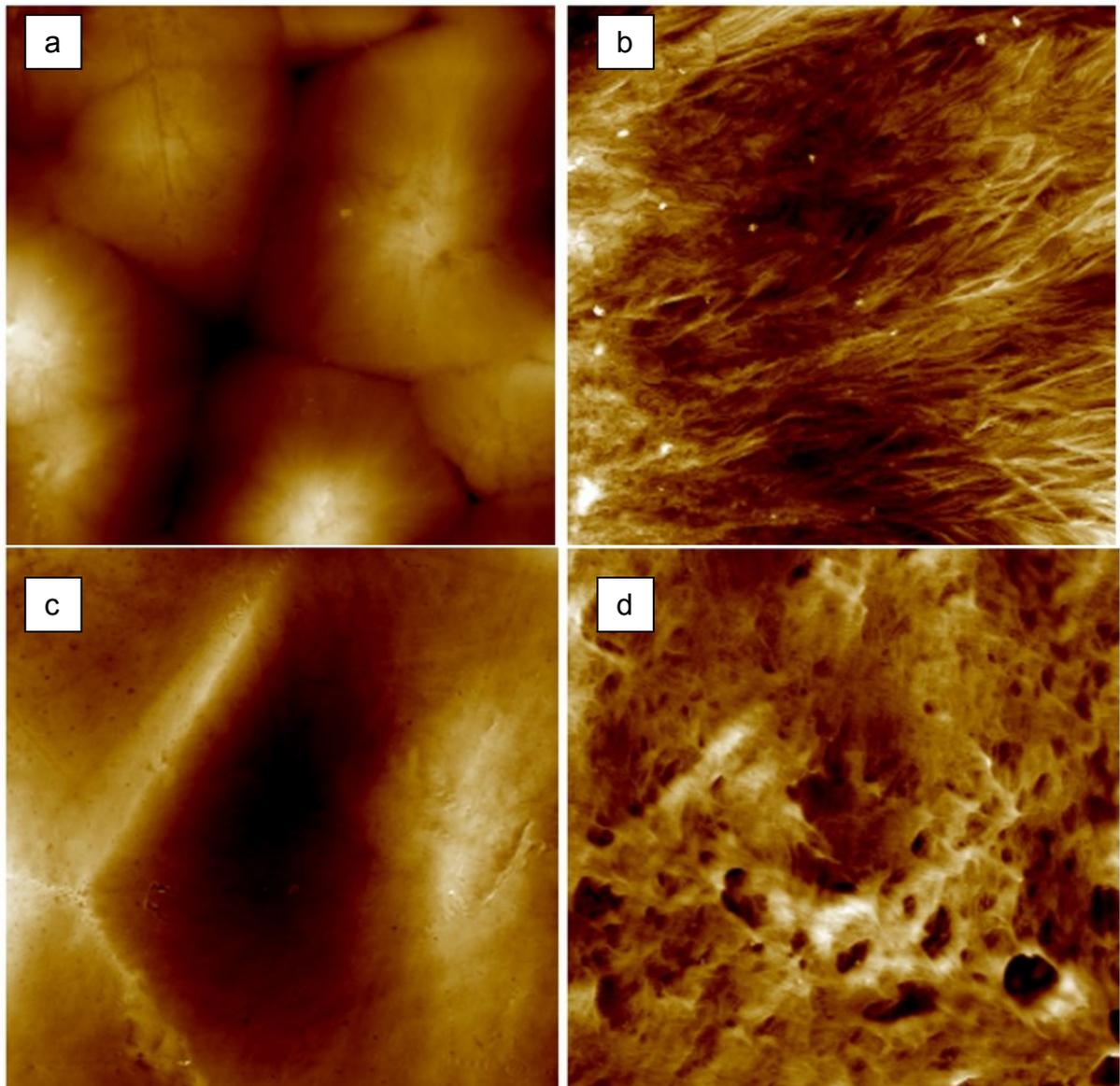


Figura 5.19. Micrografias obtidas por AFM das membranas de PU denso: (a) sem rapamicina e área de $60 \mu\text{m}^2$, (b) sem rapamicina e área de $5 \mu\text{m}^2$, (c) com rapamicina e área de $60 \mu\text{m}^2$ e (d) com rapamicina e área de $5 \mu\text{m}^2$.

Pela Figura 5.19 é possível observar que ambas as membranas possuem rugosidade, pois as áreas mais brilhantes representam pontos mais altos presentes na superfície da membrana, e as regiões mais escuras indicam a existência de poros ou vales.

O valor da rugosidade média da membrana de PU denso sem rapamicina em uma área de $60 \mu\text{m}^2$ foi de 383 nm, enquanto que para a membrana de PU denso com rapamicina medida nesta mesma área, sua rugosidade média diminuiu,

apresentando um valor em 115 nm. No teste de inchamento a absorção do fluido corpóreo diminuiu (Item 5.4), que pode ter sido influenciada pela diminuição da rugosidade, ou seja, a membrana com o fármaco pode ter se mostrado mais hidrofóbica. Contudo, quando as medidas foram realizadas em uma área menor, 5 μm^2 , a rugosidade média da membrana de PU denso sem rapamicina foi de 9,64 nm e a da membrana de PU denso com rapamicina foi de 11,5 nm. Este comportamento corrobora com a análise do ângulo de contato das membranas (Item 5.5), em que os valores do ângulo diminuíram quando na presença da rapamicina impregnada, ou seja, mostraram-se mais hidrofílicas.

O aumento da rugosidade também é uma das razões para o aumento da hidrofiliabilidade de membranas poliméricas, pois a molhabilidade de sua superfície também é efeito da rugosidade da mesma. Assim, não somente as modificações químicas das superfícies, como também as mudanças topográficas podem contribuir independentemente para as modificações na hidrofiliabilidade das membranas poliméricas (Ferreira, 2005).

Dessa maneira, pode-se concluir que além da morfologia de uma membrana influenciar no comportamento de hidrofiliabilidade de uma membrana polimérica, a sua composição superficial também influencia, como a adição de outro agente, que pode determinar sua capacidade de maior ou menor absorção de líquido, neste caso, a água.

5.6. Teste de calcificação *in vitro*

A calcificação de biomateriais quando implantados é um dos principais problemas relacionados com a falha de próteses, portanto, métodos rápidos para avaliar as interações entre a superfície do material e os íons presentes no plasma humano, verificando um possível processo de deposição para a formação da fase mineral no implante é de grande valia (Nogueira, 2010).

As micrografias das membranas de PU poroso, PU lixiviado e PU denso, após 30 dias de teste de calcificação *in vitro* são apresentadas na Figura 5.20.

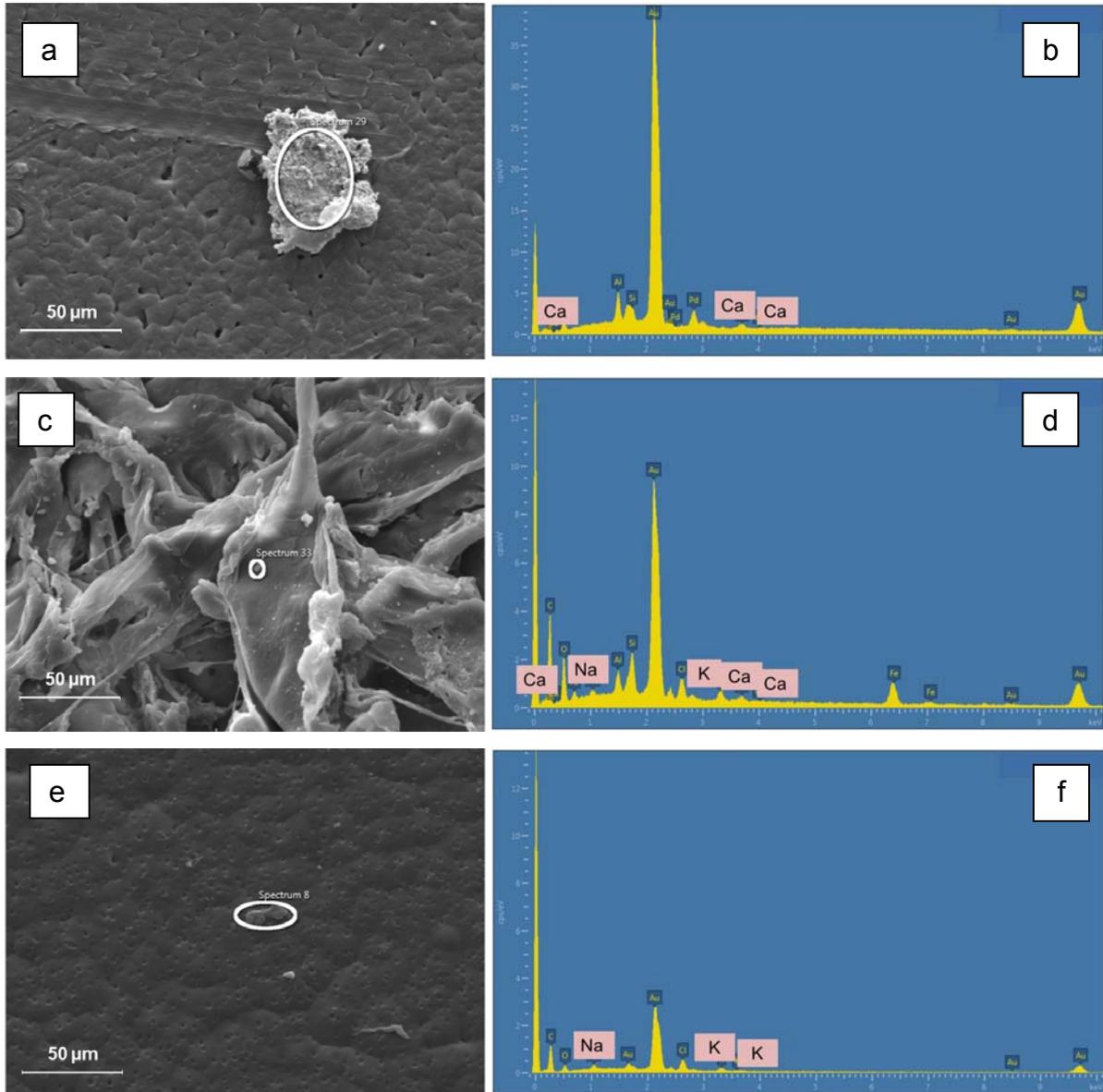


Figura 5.20. Micrografias das superfícies das membranas após 30 dias de teste de calcificação *in vitro* do (a) PU poroso, (c) PU lixiviado e (e) PU denso (magnificação de 1000x), (b), (d) e (f) são os espectros de EDS das membranas (a), (c) e (e), respectivamente.

As superfícies das membranas observadas nas micrografias apresentadas na Figura 5.20 mostraram em algumas regiões depósitos dos minerais cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl) após 30 dias de exposição à solução de calcificação altamente concentrada, confirmados pela técnica de EDS (Figura 5.20b/d/f). Entretanto, este método não simula as interações celulares e enzimáticas ou outro processo biológico que possa ocorrer no organismo após a implantação *in vivo* do material (Nogueira, 2010).

A membrana de PU poroso (Figura 5.20a/b) apresentou cloreto de cálcio na sua superfície e a membrana de PU denso (Figura 5.20e/f) mostrou cloreto de sódio e de potássio, enquanto que a membrana de PU lixiviado (Figura 5.20c/d) apresentou todos os minerais já citados: cloreto de cálcio, cloreto de sódio e cloreto de potássio. Visto que, a membrana polimérica lixiviada apresenta morfologia porosa e com interconexões, sua facilidade de depósito de minerais se torna maior, pois a redução de irregularidades pode fornecer uma superfície menos receptiva para ancoragem destes minerais (Nogueira, 2010).

As características da superfície do material consideravelmente influenciam no processo de calcificação, tanto devido a sua composição química, quanto a sua rugosidade, pois permitem a complexação de grupos químicos na superfície do material com íons de cálcio e fósforo, promovendo a fixação desses íons que podem agir como sítios de depósito mineral (Nogueira, 2010).

Além de que, o revestimento de biopolímeros pode apresentar a vantagem na incorporação de fármacos, como anticoagulantes e inibidores de calcificação, que pode controlar a liberação quando implantados (Nogueira, 2010).

Por exemplo, materiais biológicos como pericárdio bovino, que são utilizados em aplicações cardíacas, podem sofrer um processo de calcificação degenerativa, prejudicando sensivelmente o mecanismo de abertura e fechamento das biopróteses. Em que, o uso de anticalcificantes seria uma alternativa como forma de solucionar este problema (Goissis, 1998). Assim como, a adição de agentes biologicamente ativos como albumina de soro bovino e fibrinogênio aumentam a biocompatibilidade de membranas poliméricas, aumentando sua hidrofiliçidade, a qual também concede aceitação do material de poliuretano pelo tecido hospedeiro (Kucinska-Lipka, 2015).

Dessa maneira, também foi realizado o teste de calcificação *in vitro* na membrana de PU denso impregnada com rapamicina. A Figura 5.21 apresenta a

micrografia da superfície da membrana de PU denso impregnada com rapamicina antes e após 30 dias de teste de calcificação.

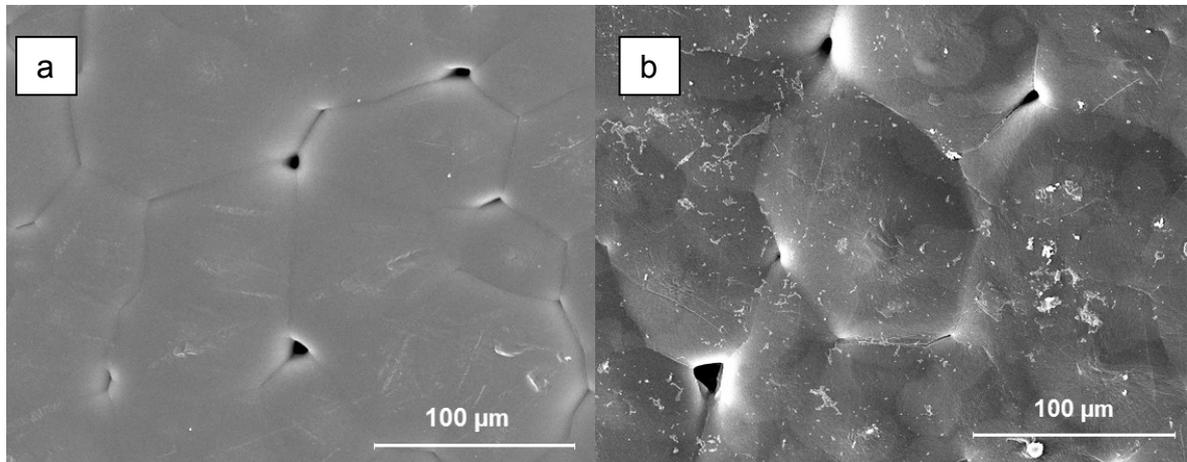


Figura 5.21. Micrografia da superfície da membrana de PU denso com rapamicina (a) antes e (b) após 30 dias de teste de calcificação *in vitro* (magnificação de 1000x).

A partir da micrografia mostrada na Figura 5.21, verifica-se que a superfície da membrana polimérica impregnada com o fármaco rapamicina permanece similar com a membrana antes do teste, apresentando a presença dos esferulitos.

Em estudo realizado por Nogueira e colaboradores (2010), amostras de pericárdio bovino, as quais apresentaram depósitos de fosfato de cálcio em sua superfície após 7 dias de exposição ao teste de calcificação *in vitro*, foram comparadas com amostras de pericárdio bovino revestidas com fibroína de seda e quitosana. Estes últimos apresentaram baixa quantidade de depósito de cálcio em sua superfície, indicando a eficiência na diminuição da ancoragem de minerais.

Também se observa que a impregnação da rapamicina na membrana de PU denso pode ter modificado sua superfície. Esse fato pode ser visto comparando a micrografia da membrana de PU denso sem o fármaco (Figura 5.5) em relação à micrografia da membrana de PU denso com o fármaco (Figura 5.21). O que também é mostrado pelas micrografias da análise de AFM (Figura 5.19), em que além da rugosidade apresentar-se diferente, também sua topografia.

Dessa maneira, verifica-se que a impregnação da rapamicina pode ter influenciado na redução da deposição de minerais na superfície das membranas, assim como citado por Filova e colaboradores (2011), em que *stents* impregnados com rapamicina provaram reduzir a formação neointimal em vasos sanguíneos.

5.7. Análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) das membranas poliméricas

Foram realizadas as análises Termogravimétrica e Calorimetria Exploratória Diferencial a fim de verificar o comportamento térmico das membranas poliméricas obtidas. A Figura 5.22 apresenta as curvas termogravimétricas (TG/DTG) das membranas de PU poroso, PU denso e PU lixiviado, enquanto que a Tabela 5.4 mostra os valores das temperaturas iniciais e finais de decomposição térmica, assim como, o percentual de perda de massa e temperatura de degradação máxima.

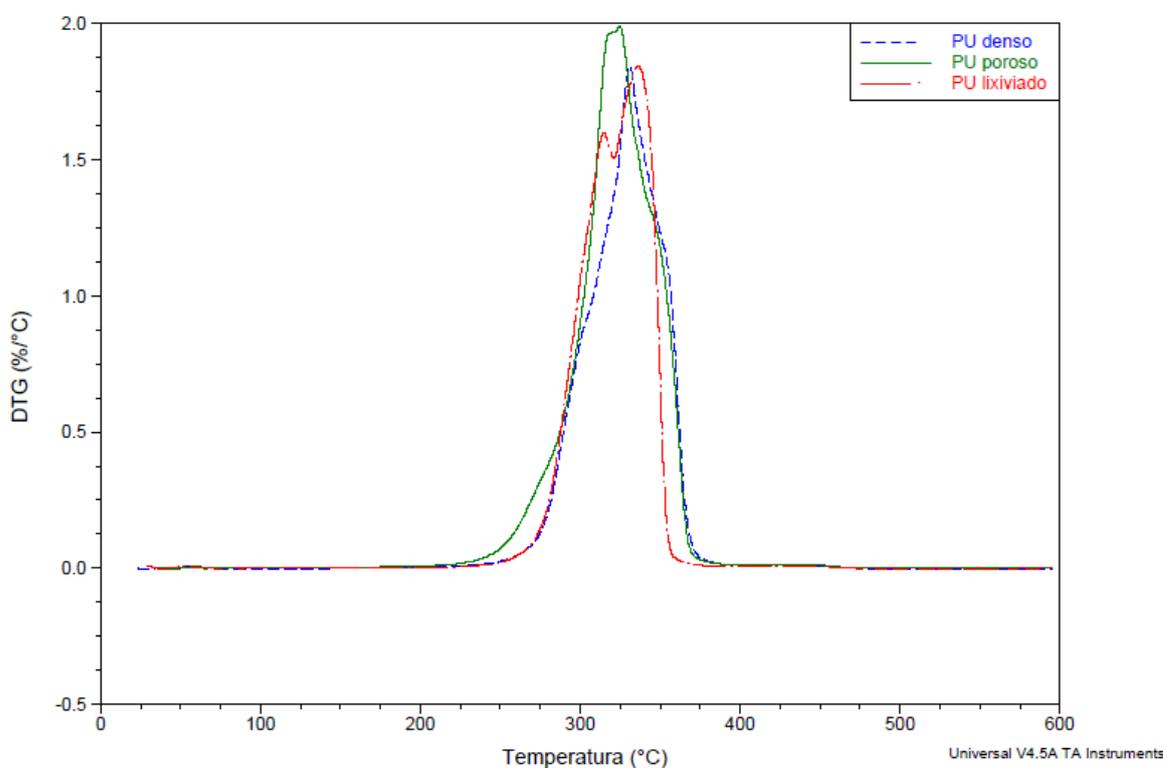


Figura 5.22. Curvas DTG das membranas poliméricas de PU poroso, PU denso e PU lixiviado.

Tabela 5.4. Temperatura inicial (T_i) e final (T_{fi}) de decomposição da 1ª e 2ª etapas, temperaturas de pico (T_{pico}) e % de perda de massa para as membranas poliméricas.

Material	1ª etapa			2ª etapa			Perda de Massa (%)
	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	T_{fi} (°C)	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	T_{fi} (°C)	
PU poroso	203	346	389	-	-	-	98,7
PU denso	217	332	389	-	-	-	95,0
PU lixiviado	221		321	321	336	374	93,5

Pela análise dos resultados apresentados na Figura 5.22 e Tabela 5.4, verificou-se que as membranas de PU poroso e PU denso apresentaram um comportamento de decomposição térmica semelhantes, ocorrendo em uma única etapa, com temperaturas iniciais de 203 °C para o PU poroso e 217 °C para o PU denso e temperaturas finais de 389 °C para ambas membranas. Enquanto que a membrana de PU lixiviado apresentou uma degradação térmica em duas etapas, verificada pela curva DTG, em que a primeira etapa ocorreu de 221 a 321 °C e a segunda etapa de 321 a 374 °C.

Já em relação aos dados obtidos partindo do DSC, a Tabela 5.5 apresenta os valores de temperatura de fusão (T_f), temperatura de cristalização (T_c), temperatura de transição vítrea (T_g) e entalpia de fusão (ΔH_f), enquanto que as Figuras 5.23 e 5.24 mostraram as curvas de DSC referentes ao comportamento térmico das membranas poliméricas.

Tabela 5.5. Temperatura de fusão (T_f), cristalização (T_c), transição vítrea (T_g) e entalpia de fusão (ΔH_f).

Material	T_f (°C)	T_c (°C)	T_g (°C)	ΔH_f (J/g)
PU poroso	51,5	21,6	-64,7	47,5
PU denso	52,8	20,5	-62,5	52,4
PU lixiviado	52,7	21,8	-61,8	46,0

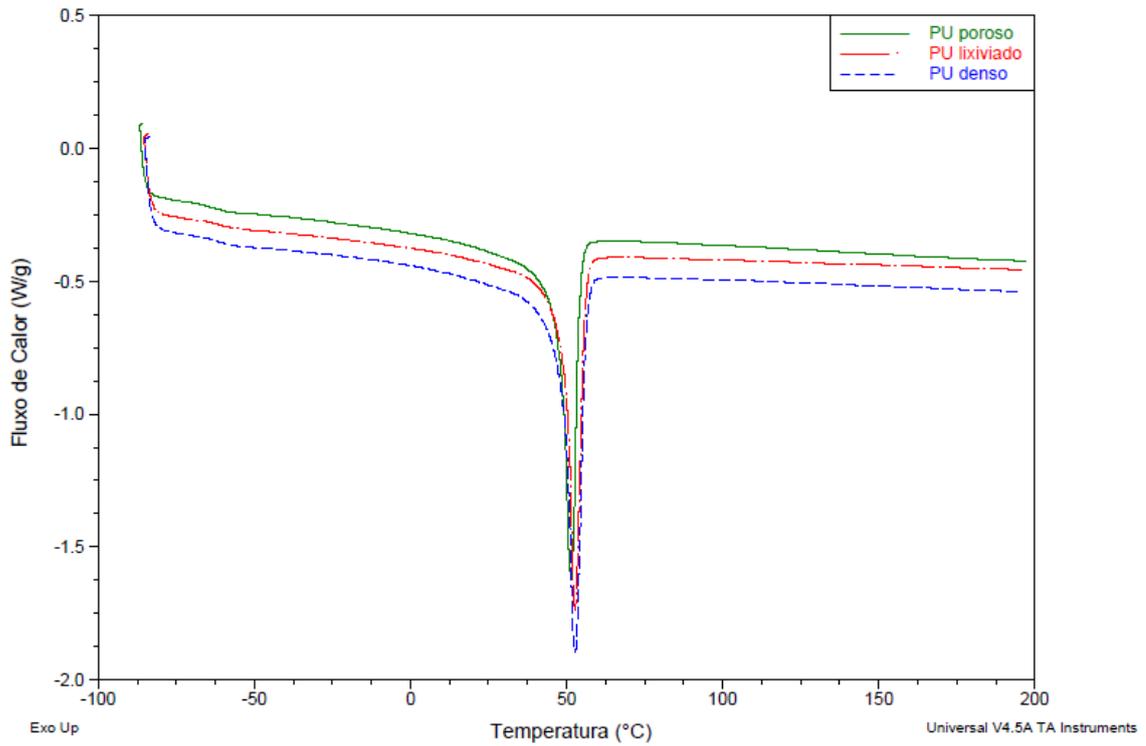


Figura 5.23. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU poroso, PU denso e PU lixiviado com as representações da T_g e T_f .

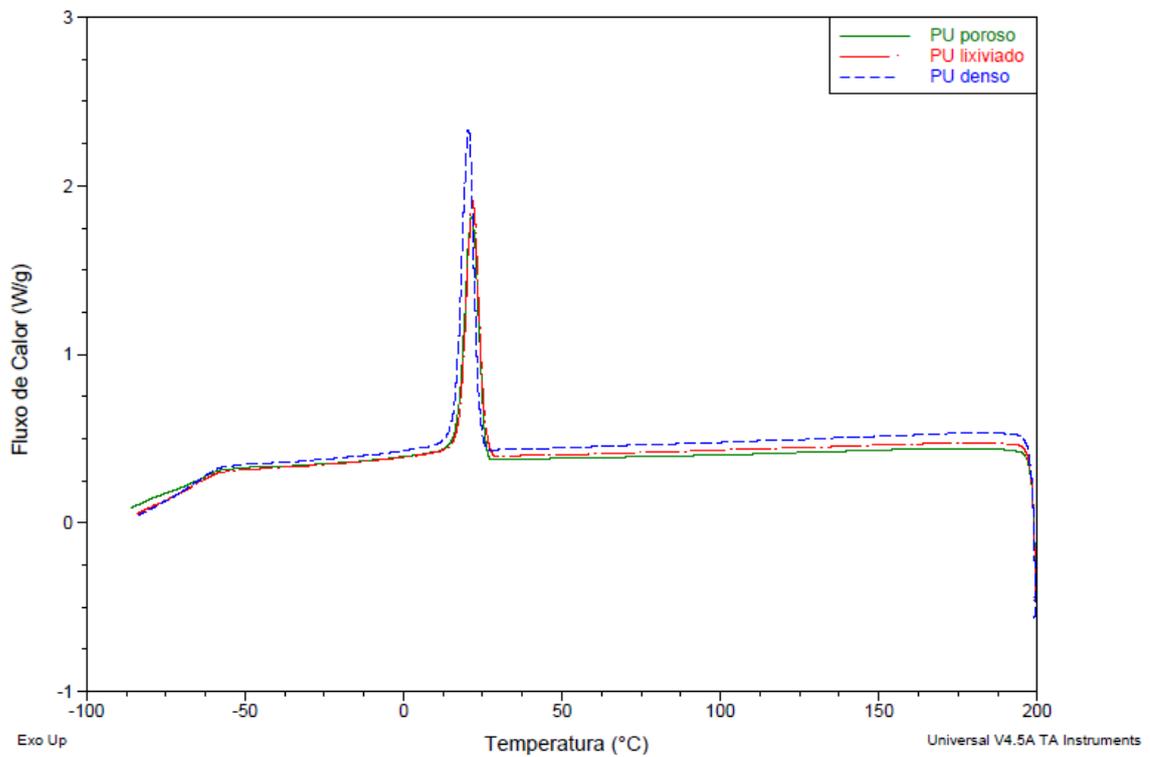


Figura 5.24. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU poroso, PU denso e PU lixiviado com os picos referentes a T_c .

Pela análise das Figuras 5.23 e 5.24, foi possível observar que todas as três membranas poliméricas mostraram comportamento térmico de materiais semicristalinos, ou seja, apresentaram regiões cristalinas e amorfas em sua estrutura, com picos de fusão e cristalização bem definidos e similares.

As membranas de PU poroso, denso e lixiviado, de acordo com a Tabela 5.5, apresentaram valores de temperatura de fusão em torno de 52 °C, de acordo com o esperado para materiais poliméricos como descrito por Gorna e colaboradores (2002), que obtiveram T_f para poliuretanos alifáticos lineares entre 30 e 55 °C.

Assim como, suas temperaturas de cristalização em torno de 21 °C, a qual é citada na literatura para poliuretanos sintetizados a partir do poliól PCL de massa molar 10.000 g/mol (Cabral, 2012). Sendo também possível observar que a T_c para a membrana de PU denso mostra-se mais definida em relação aos picos das outras membranas. A obtenção desta membrana foi realizada sem a adição de agente porogênico quando comparada à membrana de PU lixiviado e de maneira mais rápida em relação à membrana de PU poroso.

Suas temperaturas de transição vítrea apresentaram-se em torno de -63 °C, sendo que, de acordo com Gorna e colaboradores (2002), a utilização de poliól PCL com massa molar menor produz poliuretanos com T_g maior. Por exemplo, poliuretanos produzidos a partir de PCL de massa molar 2.000 g/mol e de massa molar 530 g/mol mostraram T_g em torno de -56 °C e -21 °C, respectivamente.

Em relação às regiões cristalinas das membranas poliméricas de PU poroso, denso e lixiviado, suas entalpias de fusão mostraram-se em torno de 49 J/g. Transições de baixa energia podem surgir a partir da fusão dos segmentos rígidos e/ou da fusão de cristais mal organizados formados após a síntese dos polímeros (Sheikhy, 2013). Sendo que, as entalpias de fusão mostram que, mesmo as membranas de PU poroso, denso e lixiviado apresentarem cristalinidades próximas, a estrutura das membranas é o que mais influenciou as suas propriedades mecânicas.

Polióis com estrutura linear possuem maior capacidade de reação com os grupos isocianatos para a formação de poliuretanos, sendo capazes de influenciar o seu módulo elástico e sua T_g devido à relação entre os segmentos rígido e flexível, pela diminuição dos espaços entre as cadeias da estrutura química polimérica, aumentando sua resistência mecânica (Sheikhy, 2013).

5.7.1. TGA e DSC da membrana polimérica com rapamicina

Também foi realizada a análise de TGA para a membrana de PU denso impregnada com rapamicina, a fim de verificar seu comportamento. As Figuras 5.25 e 5.26 apresentam as curvas termogravimétricas (TG/DTG) para a membrana polimérica impregnada com fármaco em comparação com a membrana sem impregnação.

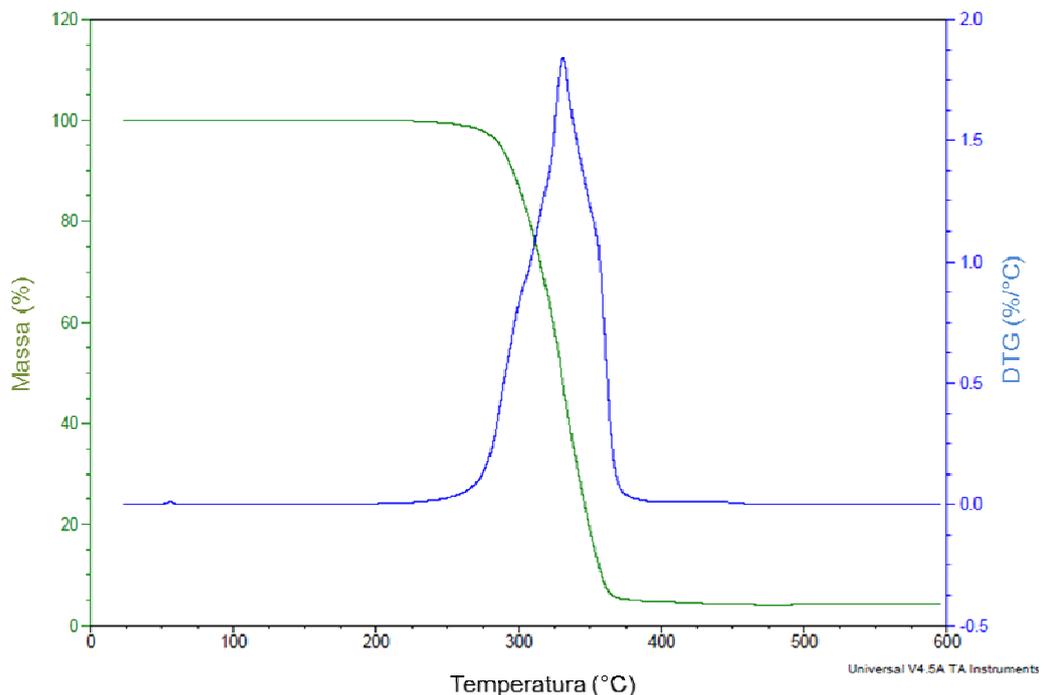


Figura 5.25. Curvas TG e DTG da membrana polimérica de PU denso sem o fármaco rapamicina.

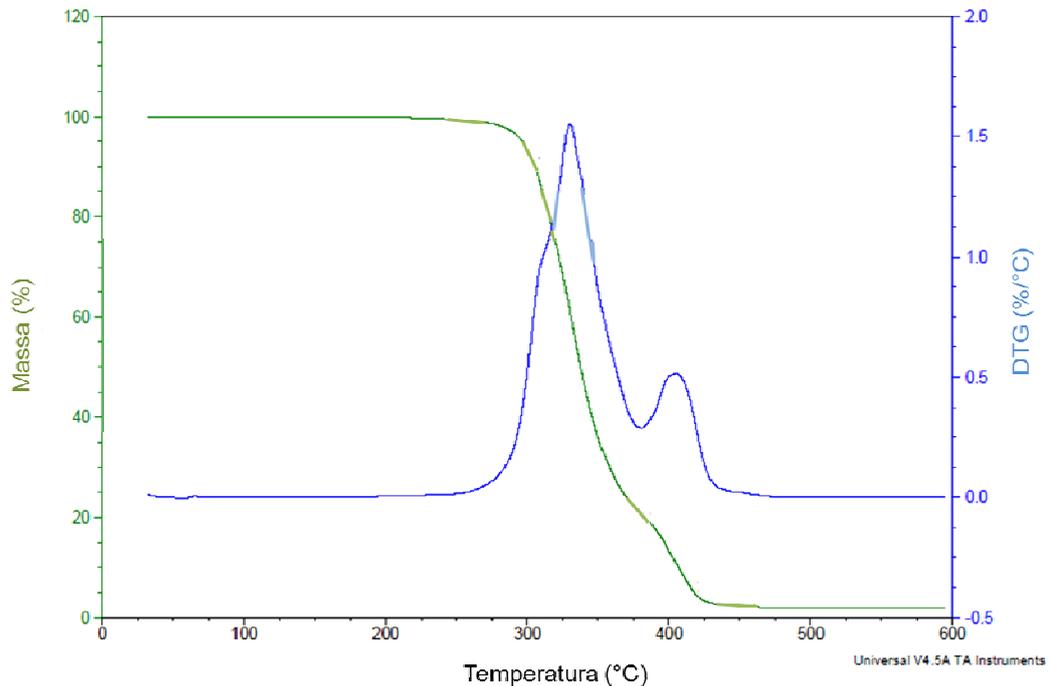


Figura 5.26. Curvas TG e DTG da membrana polimérica de PU denso com o fármaco rapamicina.

A Tabela 5.6 apresenta os valores das temperaturas iniciais e finais de decomposição térmica, assim como, a temperatura de pico e o percentual de perda de massa.

Tabela 5.6. Temperatura inicial (T_i) e final (T_{fi}) de decomposição da 1ª e 2ª etapas, % de perda de massa e temperatura de pico (T_{pico}) para as membranas poliméricas de PU denso com e sem rapamicina.

Material	1ª etapa			2ª etapa			Perda de Massa (%)
	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	T_{fi} (°C)	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	T_{fi} (°C)	
PU denso	217	332	389	-	-	-	95
PU denso/rapamicina	258	340	381	381	418	438	97

Analisando as Figuras 5.25 e 5.26 e a Tabela 5.6, pode-se observar que a impregnação do fármaco rapamicina gerou um comportamento diferente na sua curva termogravimétrica. A T_i de degradação mostrou-se maior em relação à membrana sem o fármaco, passando de 217 °C para 258 °C, um aumento em torno de 40 °C, além de apresentar mais um pico de degradação térmica, o que sugere ser referente ao fármaco rapamicina. O segundo pico de degradação iniciou em torno de 381 °C, temperatura próxima a qual a degradação térmica da membrana

sem o fármaco estava sendo finalizada, corroborando mais uma vez para que este seja referente ao fármaco.

Campos e colaboradores (2015) citaram que na curva TG da rapamicina foi observado que o fármaco é termicamente estável até a temperatura em torno de 196 °C, da mesma maneira como confirmado por Carvalho (2014) e Eloy (2016) para fármacos como a rapamicina e paclitaxel. Enquanto que a curva DTG da rapamicina indicou que o seu processo de decomposição térmica ocorre em duas etapas, sendo a primeira degradação de 196 °C até 211 °C e a segunda degradação até 489 °C, como mostrado na Figura 5.27.

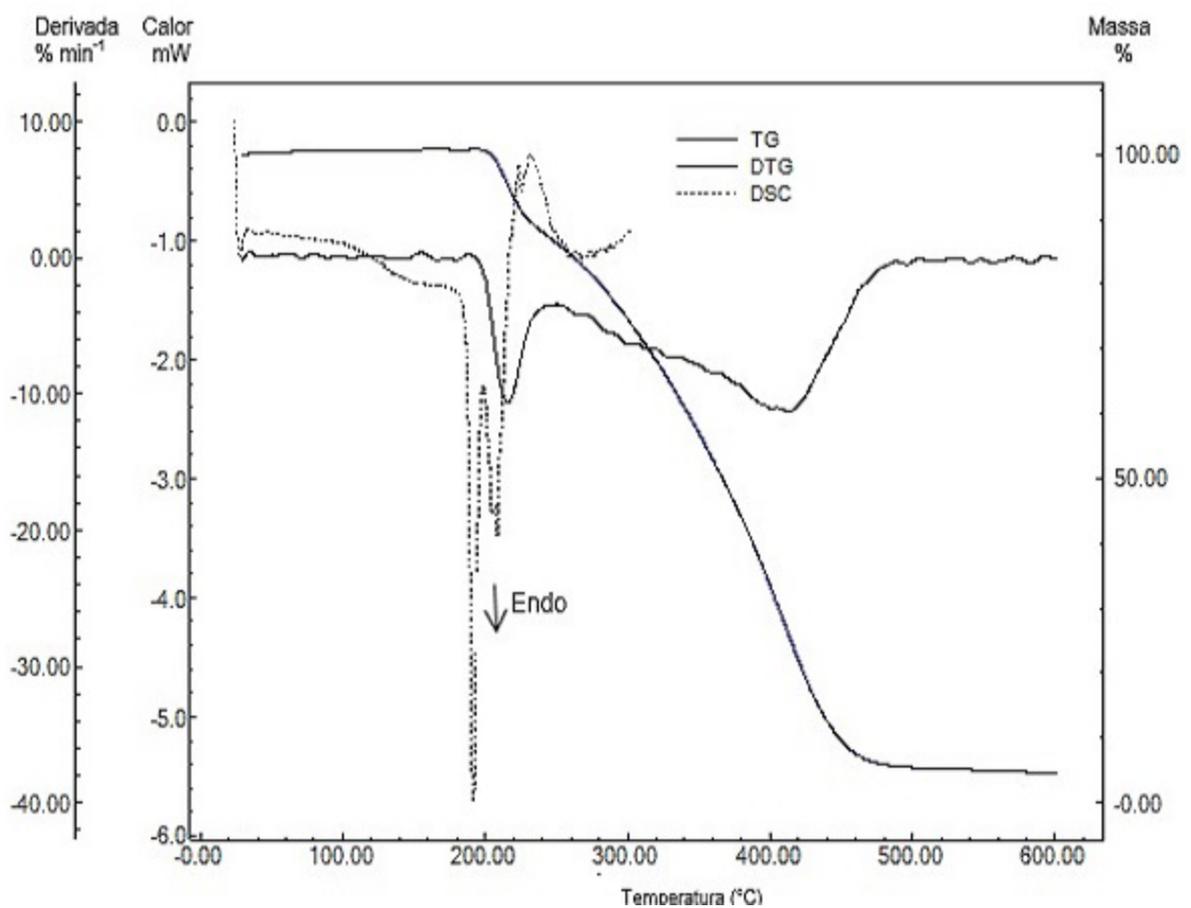


Figura 5.27. Curvas DSC e TG/DTG da rapamicina obtidas a 20 °C/min sob atmosfera de nitrogênio (Campos, 2015).

Em relação à análise de DSC para a membrana de PU denso impregnada com rapamicina, a Figura 5.28 apresenta os picos referentes à temperatura de fusão, transição vítrea e cristalização para a membrana polimérica impregnada com fármaco em comparação com a membrana sem impregnação.

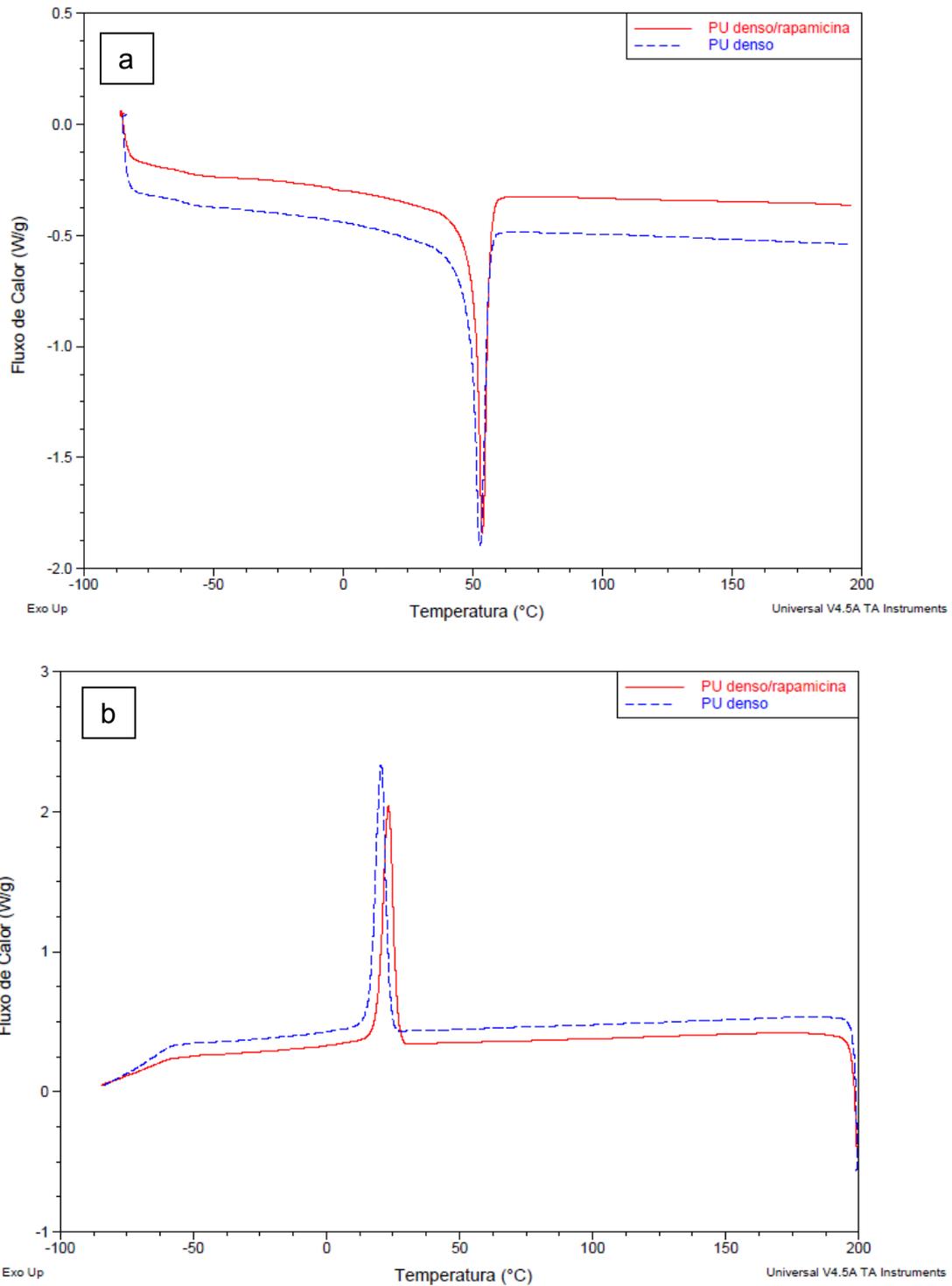


Figura 5.28. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU denso com e sem rapamicina: (a) picos referentes a T_g e T_f e (b) picos referentes a T_c .

A Figura 5.28 mostrou que a adição do fármaco rapamicina na membrana de PU denso não fez com que o comportamento térmico em relação T_f , T_g e T_c em comparação à membrana polimérica sem rapamicina sofresse alteração. Os picos de fusão e cristalização mantiveram-se definidos e com valores similares, em torno de 53 °C (T_f) e 22 °C (T_c). A temperatura de transição vítrea também manteve valores aproximados, em torno de -61 °C. Já em relação a suas entalpias de fusão, a membrana sem o fármaco apresentou valor em torno de 52 J/g, enquanto que a membrana impregnada com rapamicina apresentou valor em torno de 44 J/g, de acordo com o citado na literatura em que a entalpia de fusão de um nanocarreador polimérico aumentou com o grau de rapamicina incorporada (Zhao, 2014).

Também pela análise da Figura 5.27, o estudo demonstrou que a temperatura de fusão da rapamicina foi observada em torno de 191 °C, contudo quando Campos e colaboradores (2015) incorporou a rapamicina em implantes poliméricos, verificou-se a ausência dos eventos térmicos significativos observados apenas para o fármaco.

Dessa maneira, pode-se observar que o comportamento térmico das membranas poliméricas permanece após a adição da rapamicina apresentando um aumento da entalpia de fusão.

5.7.2. TGA e DSC das membranas após os testes de inchamento e calcificação

Foram também realizadas a análise termogravimétrica e de calorimetria exploratória diferencial das membranas poliméricas após os testes de inchamento e calcificação, a fim de comparar com seu comportamento térmico antes destes testes.

As Figuras 5.29, 5.30 e 5.31 apresentam as curvas DTG, respectivamente, das membranas de PU poroso, das membranas de PU denso e das membranas de PU lixiviado antes e após os testes de inchamento e calcificação.

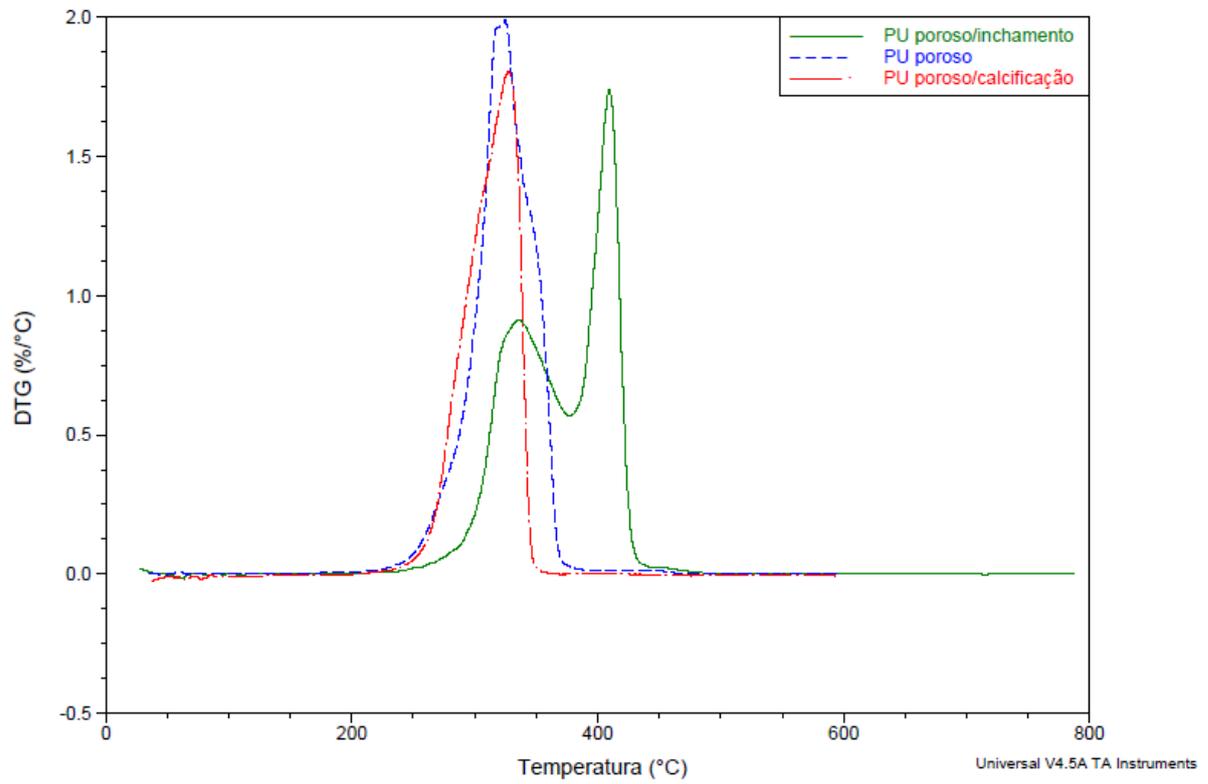


Figura 5.29. Curvas DTG das membranas poliméricas de PU poroso antes e após os testes de inchamento e calcificação.

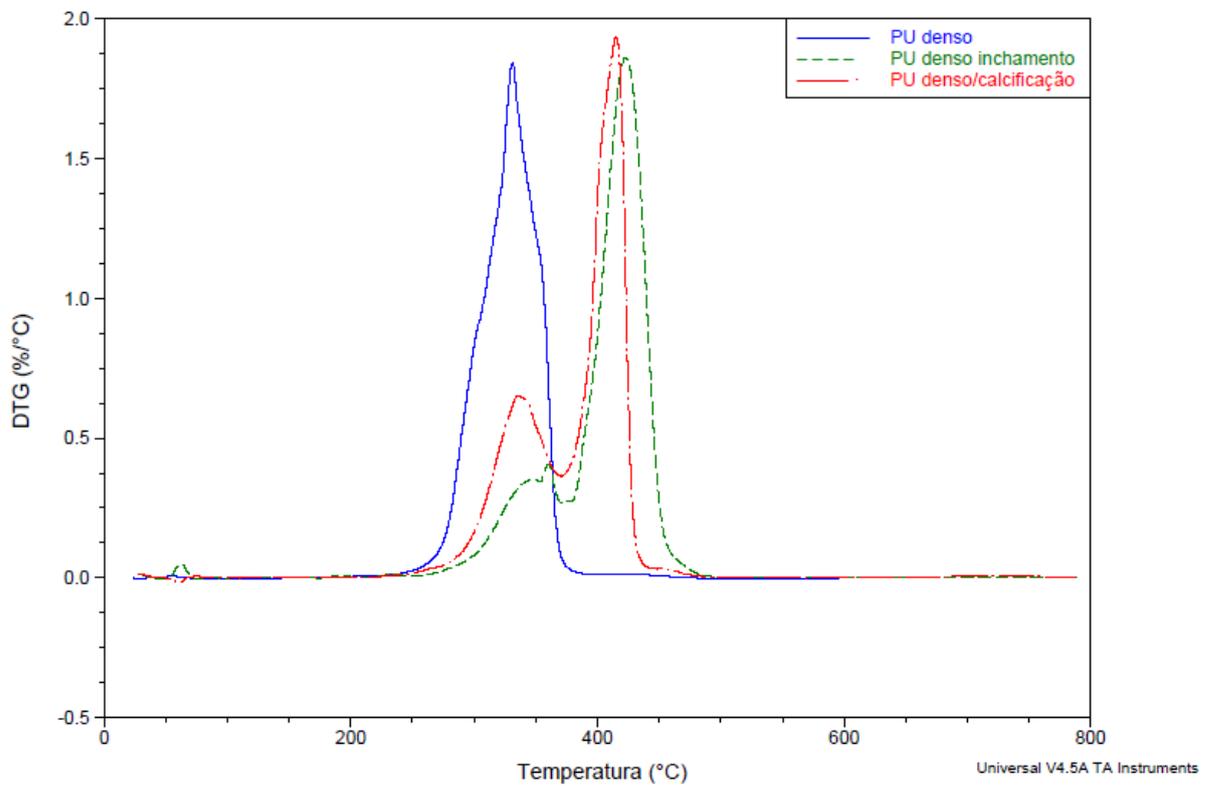


Figura 5.30. Curvas DTG das membranas poliméricas de PU denso antes e após os testes de inchamento e calcificação.

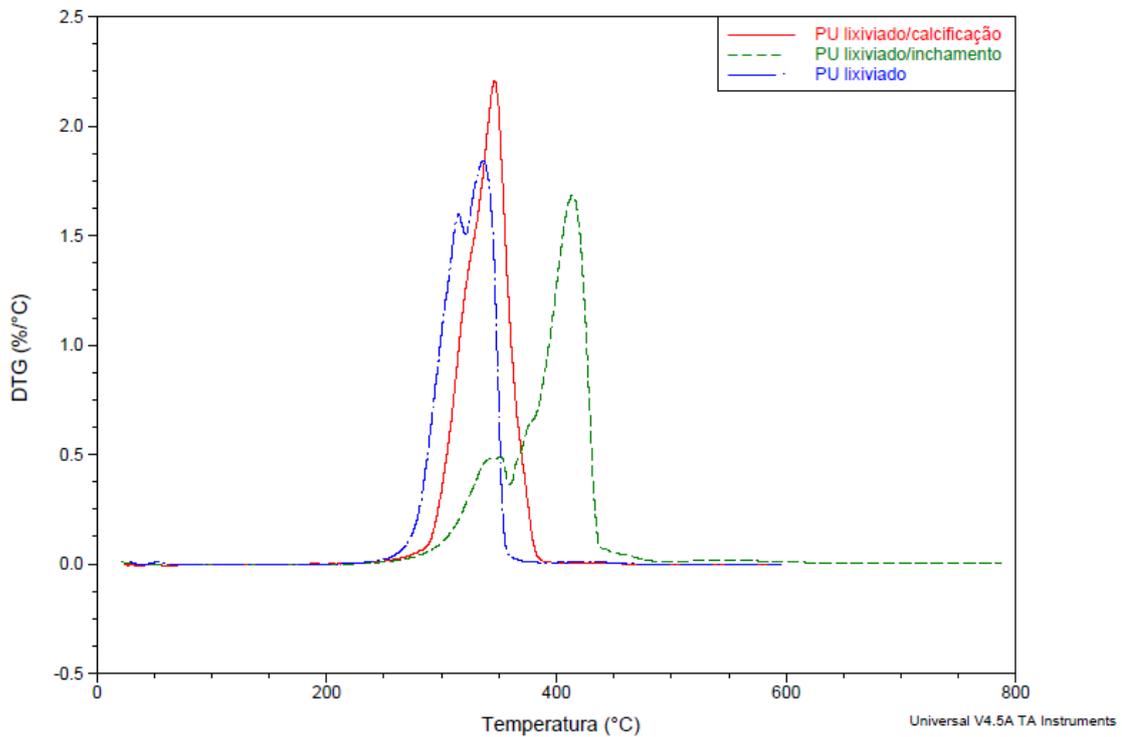


Figura 5.31. Curvas DTG das membranas poliméricas de PU lixiviado antes e após os testes de inchamento e calcificação.

Pode-se observar que o comportamento térmico das membranas de PU poroso e denso antes dos testes de inchamento e calcificação, como discutido anteriormente (Item 5.7), mostraram-se similar. Exceto para a membrana de PU lixiviado que apresentou duas etapas de decomposição térmica. O mesmo ocorreu para todas as três membranas após 30 dias de teste de inchamento mostrando também um aumento no valor de suas temperaturas quando comparadas aos valores das membranas antes do teste (Tabela 5.4). A Tabela 5.7 apresenta seus valores de temperatura.

Tabela 5.7. Temperatura inicial (T_i) e final (T_{fi}) de decomposição da 1ª e 2ª etapas e as temperaturas de pico (T_{pico}) para as membranas poliméricas de PU poroso, denso e lixiviado após 30 dias de teste de inchamento.

Material	1ª etapa			2ª etapa		
	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	T_{fi} (°C)	T_i (°C)	T_{pico} (°C)	T_{fi} (°C)
PU poroso	239	335	378	378	409	437
PU denso	266	349	376	376	422	466
PU lixiviado	251	347	359	359	414	433

Em relação ao teste de calcificação, a membrana de PU poroso mostrou que seu comportamento térmico após 30 dias do teste permaneceu similar ao comportamento da membrana antes da calcificação, com T_i de 247 °C, T_{fi} de 348 °C e T_{pico} de 328 °C. Para a membrana de PU lixiviado, seu comportamento térmico foi observado em uma única etapa, diferentemente da membrana antes do teste de calcificação, apresentando T_i de 286 °C, T_{fi} de 386 °C e T_{pico} de 346 °C. Enquanto que a membrana de PU denso após 30 dias de teste de calcificação também apresentou, assim como no inchamento, a decomposição térmica em duas etapas com os valores de T_i de 258 °C, T_{fi} de 370 °C e T_{pico} de 335 °C para a 1ª etapa. Para a 2ª etapa os valores observados foram de 370 °C (T_i), 440 °C (T_{fi}) e 416 °C (T_{pico}).

As Figuras 5.32, 5.33 e 5.34 apresentam os picos referentes à T_f , T_g e T_c das membranas de PU poroso, denso e lixiviado antes e após os testes de inchamento e calcificação.

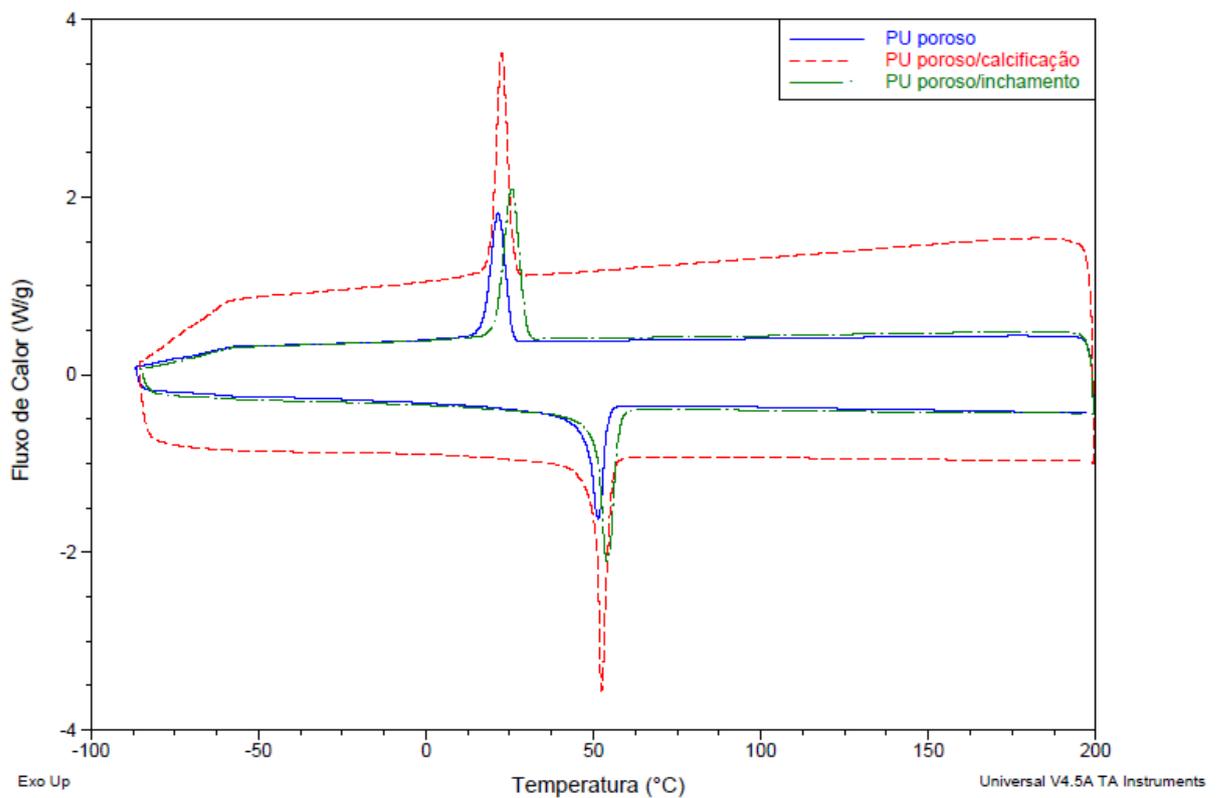


Figura 5.32. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU poroso antes e após os testes de inchamento e calcificação.

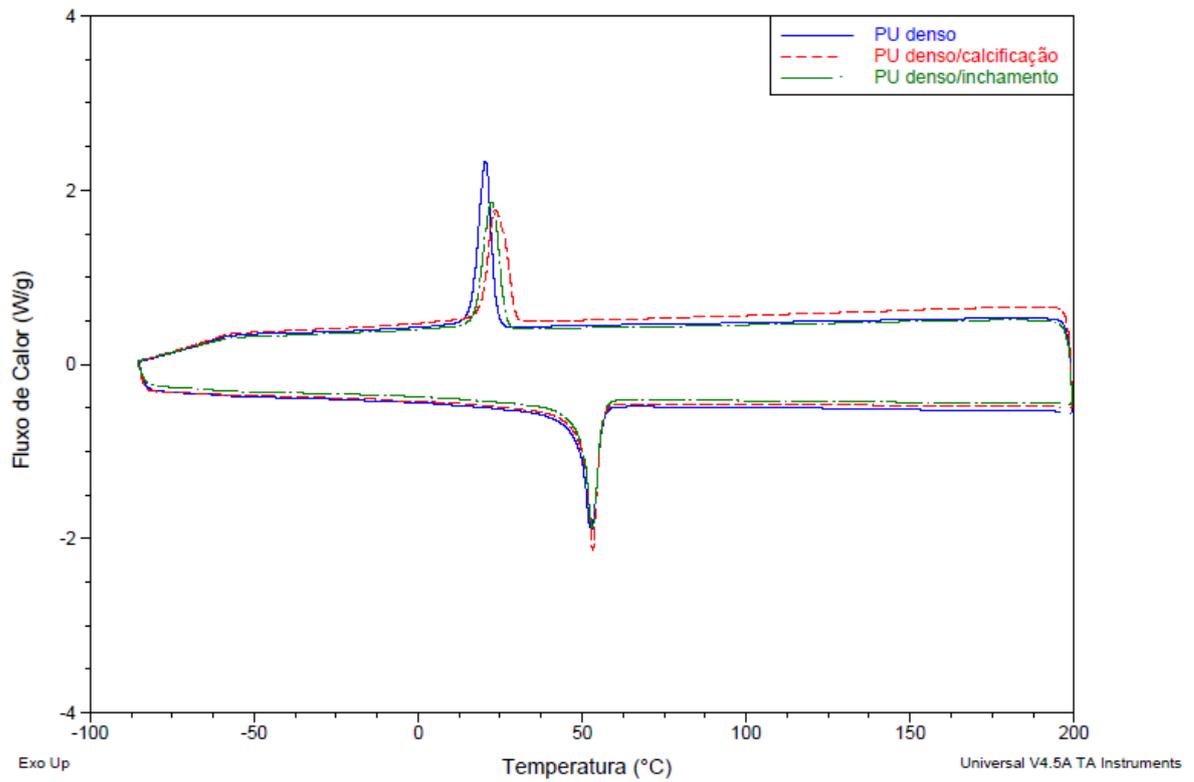


Figura 5.33. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU denso antes e após os testes de inchamento e calcificação.

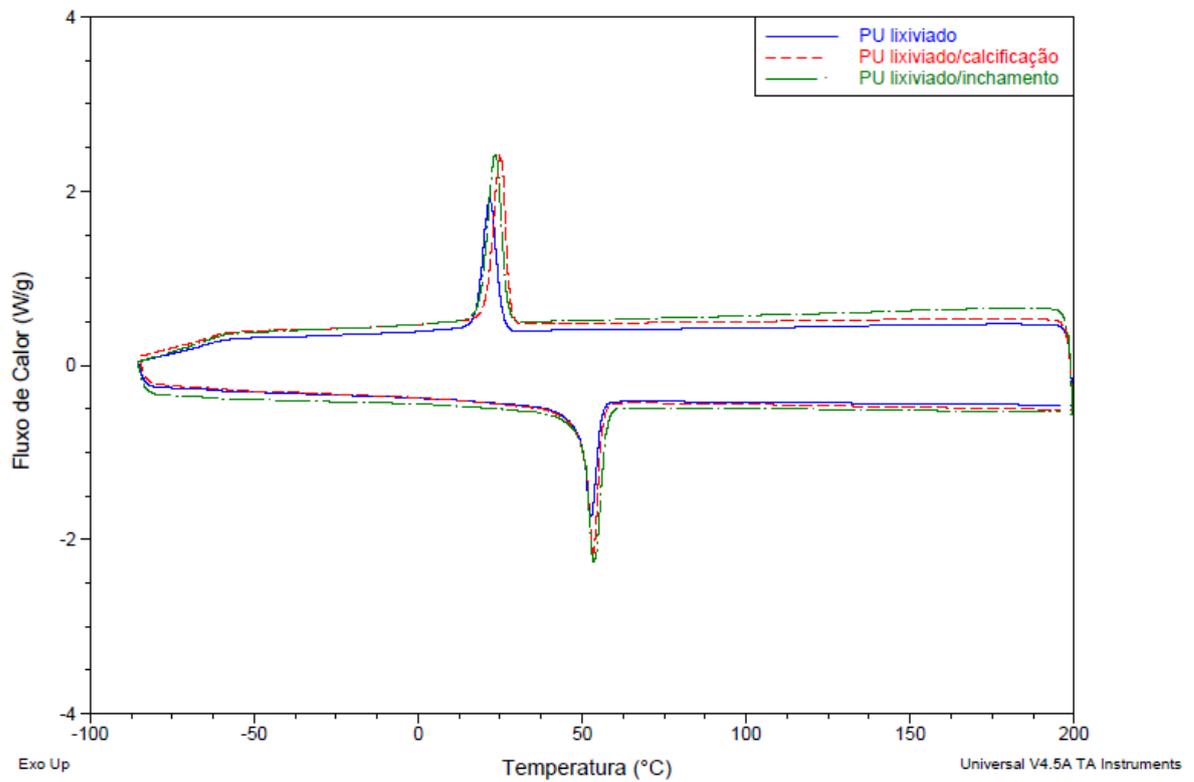


Figura 5.34. Curva de DSC das membranas poliméricas de PU lixiviado antes e após os testes de inchamento e calcificação.

Pelos gráficos das Figuras 5.32, 5.33 e 5.34 foi possível verificar que o comportamento em relação às suas temperaturas de fusão, cristalização e transição vítrea após 30 dias de teste de inchamento e calcificação permaneceram similares ao comportamento das membranas antes dos testes. A Tabela 5.8 apresenta os valores das temperaturas de T_f , T_c , T_g e (ΔH_f) para as membranas.

Já em relação aos dados obtidos partindo do DSC, a Tabela 5.5 apresenta os valores de temperatura de fusão (T_f), temperatura de cristalização (T_c), temperatura de transição vítrea (T_g) e entalpia de fusão, enquanto que as Figuras 5.23 e 5.24 mostraram as curvas de DSC referentes ao comportamento térmico das membranas poliméricas.

Tabela 5.8. Temperatura de fusão (T_f), cristalização (T_c), transição vítrea (T_g) e entalpia de fusão (ΔH_f).

Teste	Material	T_f (°C)	T_c (°C)	T_g (°C)	ΔH_f (J/g)
Inchamento	PU poroso	54,17	25,65	-58,95	49,88
	PU denso	53,10	22,42	-61,41	46,49
	PU lixiviado	53,60	23,48	-57,67	54,52
Calcificação	PU poroso	52,48	22,65	-54,94	56,19
	PU denso	53,25	23,56	-61,25	47,72
	PU lixiviado	53,38	25,05	-64,66	46,51

Dessa maneira, conclui-se que o comportamento térmico, tanto em relação à decomposição térmica como em relação às temperaturas de fusão, cristalização e transição vítrea mantiveram-se similares após os testes de inchamento e calcificação.

5.8. Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

5.8.1. Células fibroblásticas

Foram utilizadas concentrações de 50 e 100% do meio condicionado com as membranas poliméricas de PU poroso e PU denso, sendo sua viabilidade celular avaliada após 24, 48 e 72 horas com células fibroblásticas Vero.

Os gráficos apresentados nas Figuras 5.35 e 5.36 mostram os testes de MTT realizados, os quais verificam a funcionalidade mitocondrial das células.

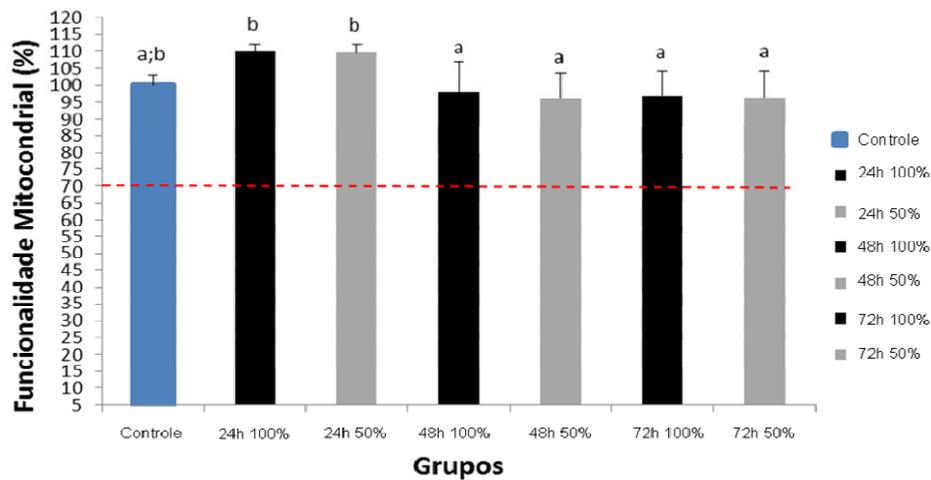


Figura 5.35. Funcionalidade mitocondrial após 24, 48 e 72 horas de cultura em contato com 50 e 100% do ME da membrana de PU poroso.

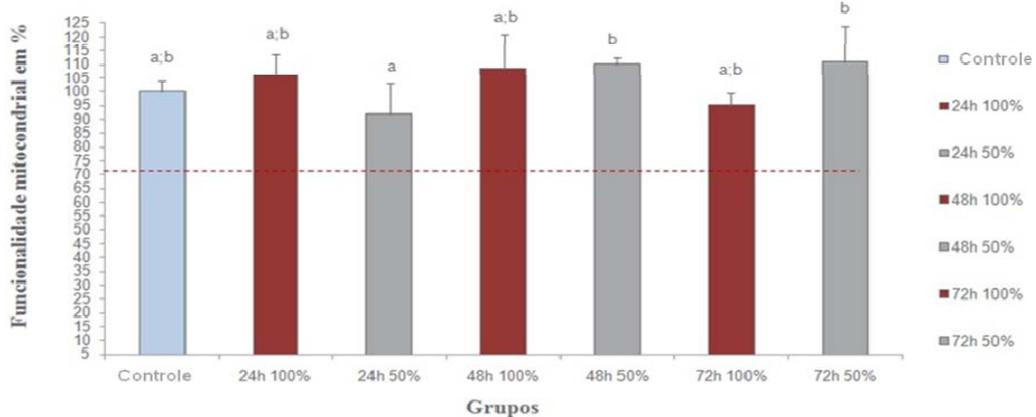


Figura 5.36. Funcionalidade mitocondrial após 24, 48 e 72 horas de cultura em contato com 50 e 100% do ME da membrana de PU denso.

Pode-se observar que a viabilidade celular das membranas de PU poroso e PU denso, respectivamente, Figuras 5.35 e 5.36, apresentaram valores acima do limite de 70%, não indicando efeito citotóxico e alteração na funcionalidade mitocondrial, segundo a norma USP 23 (1995). Sendo que, foi possível perceber que o meio de extração (ME), o qual continha o meio de cultura DMEM e a amostra da membrana de PU poroso, foi alcalinizado com o tempo (24 horas após a mesma ser

colocada em suspensão), assim como, o ME que continha a amostra da membrana de PU denso.

Saad e colaboradores (1997) descreveram que amostras de poliuretanos à base de poliésteres cultivados em células fibroblásticas NIH-3T3 e analisados pelo teste de MTT, mostraram adesão e crescimento celular, sendo confirmadas pelos resultados posteriores obtidos por meio de testes *in vivo*.

Outra observação verificada foi em relação à morfologia das células Vero quando expostas às membranas de PU poroso e denso em relação ao grupo controle. As células expostas ficaram mais esféricas, quase poligonais, escuras e apresentando vacúolos no citoplasma.

A Figura 5.37 mostra microscopia ótica das células Vero em estudo realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Feevale em membranas poliméricas baseadas em poliuretano e celulose bacteriana (CB). Os resultados dos testes de MTT das amostras de membrana de poliuretano contendo CB mostraram uma diferença significativa decrescente entre o grupo controle e os grupos com ME 100%, assim como um decréscimo da funcionalidade celular ao longo dos tempos de exposição com os grupos com ME 50%, sendo possível observar a diminuição na quantidade de células após 48 e 72 horas de exposição e com 100% de ME, mostrando que houve morte celular e que esta membrana apresenta citotoxicidade.

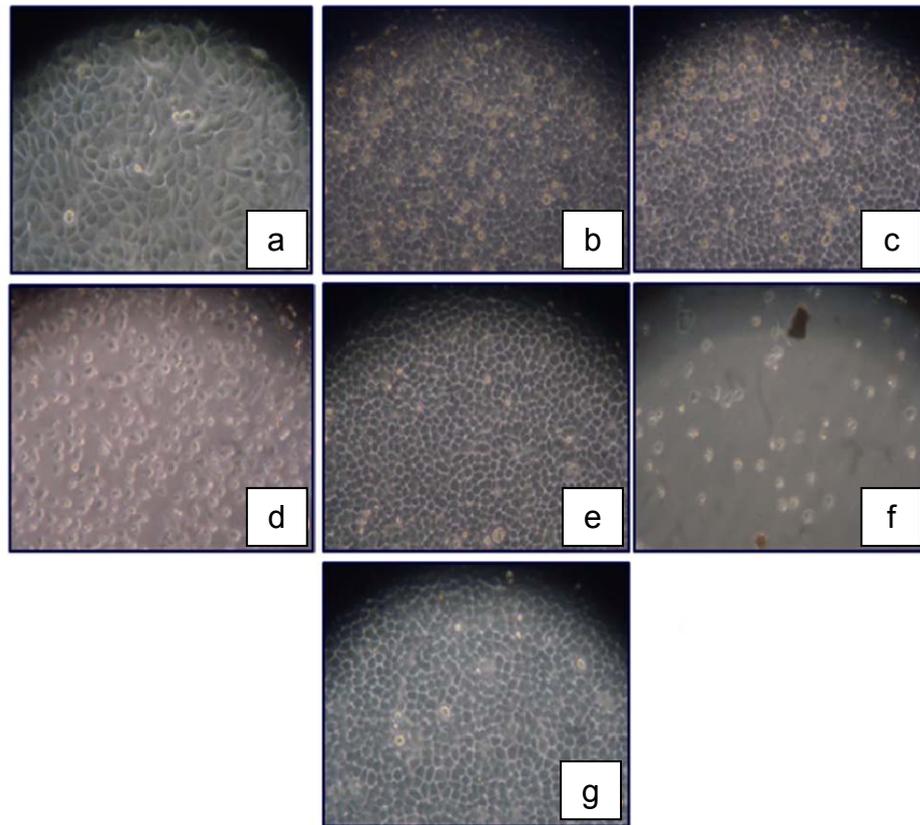


Figura 5.37. Microscopia ótica das células Vero expostas ao ME contendo membrana denominada PUHM10+CB. a) Grupo controle; b) 24h – 100%; c) 24h – 50%; d) 48h – 100%; e) 48h – 50%; f) 72h – 100% e g) 72h – 50%.

5.8.2. Células epiteliais (Empresa Biosintesis)

A Figura 5.38 apresenta o gráfico obtido relacionando a viabilidade celular (%) com as diferentes concentrações do extrato da membrana polimérica (%), assim como, comparando os controles positivo e negativo com o material teste (PU denso).

É possível observar que a membrana de PU denso foi classificada como não citotóxica para as concentrações de 6,25% e 12,5%, pois apresentaram viabilidade celular acima de 70%, assim como no teste de citotoxicidade com células fibroblásticas (item 5.8.1 – Figura 5.36), em que a membrana não apresentou citotoxicidade ao longo da análise após 24, 48 e 72 horas de exposição ao meio de extração.

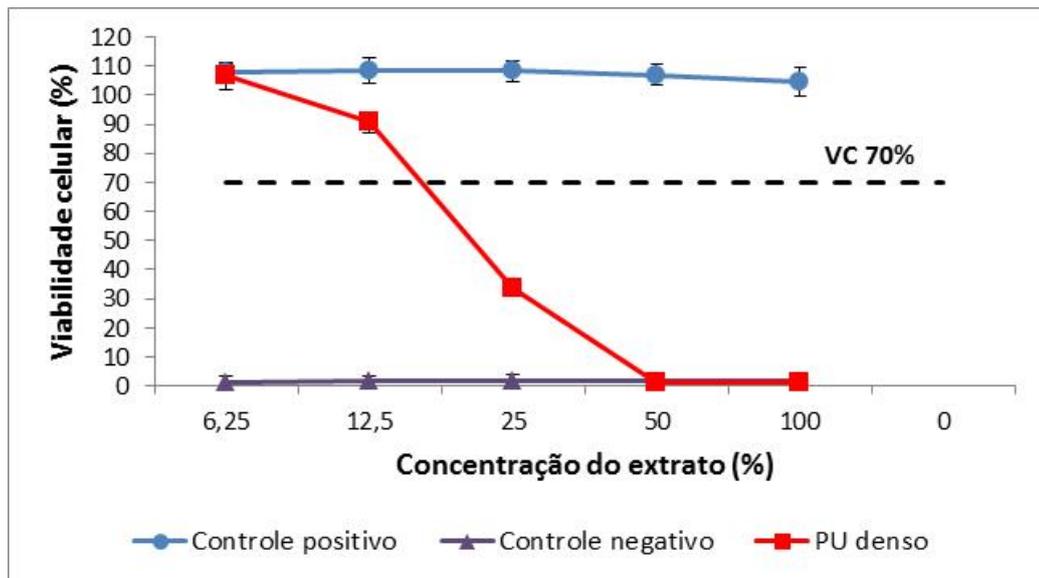


Figura 5.38. Porcentagem de viabilidade celular das substâncias de referência (controle positivo e negativo) e do material teste (PU denso).

Sendo que, observando o gráfico apresentado na Figura 5.38, a viabilidade celular utilizando-se células epiteliais nas concentrações de 25%, 50% e 100% mostraram-se abaixo do limite de 70%, podendo indicar o início de um processo de citotoxicidade nessas concentrações. O que não vai ao encontro com os resultados apresentados no item 5.8.1 (Figura 5.36), em que a viabilidade celular utilizando-se células fibroblásticas mantém-se após os tempos de exposição em concentrações de meio de extração de 50% e 100%. Contudo, deve ser verificada em qual concentração a membrana polimérica ficará exposta quando implantada, visto que, nosso organismo possui respostas diversas.

6. CONCLUSÃO

Em relação aos objetivos propostos, concluiu-se que foi possível obter membranas com três morfologias superficiais distintas partindo de técnicas diferentes, mas de um mesmo polímero, neste caso, um poliuretano bioestável. Foram obtidas membranas que apresentaram uma superfície totalmente porosa, com tamanho médio de poro de $3,3 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$, sendo denominadas como “PU poroso”. Também foram obtidas membranas que apresentaram irregularidades em sua superfície, porém, sem a presença de porosidade, sendo denominadas como “PU denso”. E membranas que apresentaram interconexões internas e uma superfície densa, mas com a formação dos esferulitos, as quais foram denominadas como “PU lixiviado”.

Também foi possível verificar que a técnica de incorporação/impregnação de fármaco, neste caso, a rapamicina, embora seja necessário realizar análises adicionais, foi eficiente, pois a membrana de PU denso, na qual foi realizada a impregnação por ter sido obtida em maior quantidade, pode ter sofrido mudanças de hidrofobicidade e rugosidade pela impregnação da rapamicina.

Estes resultados foram confirmados pela análise do comportamento de inchamento das membranas pelo teste de absorção de fluido corpóreo simulado e análise de ângulo de contato. A membrana de PU lixiviado apresentou maior média de absorção de fluido corpóreo quando comparada às outras membranas, inclusive após a impregnação da rapamicina na membrana de PU denso. Em relação à análise de ângulo de contato, a membrana de PU poroso foi a que apresentou menor valor quando comparada com as outras membranas, como também após a adição da rapamicina na membrana de PU denso.

Em relação ao teste de calcificação, foi verificado pela análise da sua morfologia superficial que as membranas de PU poroso, denso e lixiviado apresentaram depósitos de minerais em suas superfícies após 30 dias de teste. Contudo a membrana de PU denso impregnada com rapamicina não mostrou esse comportamento, sugerindo a eficiência de utilização da mesma na área vascular, pois pode evitar o depósito de minerais em vasos sanguíneos, o que pode obstruí-los e causar estenose.

O comportamento mecânico das membranas de PU poroso e denso mostrou-se típico de um material pseudoplástico, enquanto que o comportamento da membrana de PU lixiviado mostrou-se de um elastômero. Esta análise não foi realizada na membrana após a impregnação da rapamicina, devido ao tamanho de amostra utilizada não ser suficiente para a análise.

Em relação as caracterizações térmicas das membranas, as mesmas mostraram-se de acordo com a literatura e similar após os testes de inchamento, calcificação e incorporação/impregnação da rapamicina.

Assim como, o estudo de citotoxicidade *in vitro* das membranas de PU poroso e PU denso com células fibroblásticas (linhagem celular Vero) mostrou que as mesmas não são citotóxicas, podendo ser utilizadas dentro do nosso organismo. Contudo, a viabilidade celular da membrana de PU denso em contato com células epiteliais (linhagem celular CHO-K1 – ATCC CCL-61) nas concentrações de 25%, 50% e 100% mostrou-se abaixo do limite, podendo indicar uma citotoxicidade nessas concentrações. Entretanto, nas concentrações de 6,25% e 12,5% a membrana apresentou viabilidade celular.

Concluimos a partir deste estudo que as membranas poliméricas obtidas com morfologias diferentes possuem potencialidade de utilização na área vascular, sobretudo por não apresentarem citotoxicidade e características de hidrofiliçidade, rugosidade e calcificação que podem ser modificadas dependendo do seu uso final.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a eficiência da incorporação/impregnação do fármaco rapamicina nas membranas poliméricas utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Avaliar o comportamento das membranas em estudos *in vitro* mais específicos para a aplicação na área vascular, assim como após a impregnação do fármaco rapamicina;
- Avaliar o comportamento dessas membranas em estudos *in vivo* (pré-clínicos);
- Preparar tubos poliméricos com membrana interna e externa diferentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, C. M.; Ray, R. B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. **J Biomed Mater Res.**, v. 55, n. 2, p. 141–150, maio 2001.

ANDERSON, J.; Rodriguez, A.; Chang, D. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 86-100, abril 2008.

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

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Method for Water Absorption of Plastics, ASTM D570. Pensilvânia, 2010. 4p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices, ASTM F813. 2012. 5p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Test Method for Agar Diffusion Cell Culture Screening for Cytotoxicity, ASTM F895. 2011. 5p.

ARAÚJO, J. D. As próteses arteriais. **Cir. Vasc. Ang.**, v. 7, n. 3, 19-28, 1991.

BARBANTI, S.; Zavaglia, C.; Duek, E. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, janeiro 2005.

BERGER, R. Eligard®: Pharmacokinetics, Effect on Testosterone and PSA Levels and Tolerability. **European Urology Supplements**, v. 4, n. 5, p. 20-25, julho 2005.

BERNACCA, Gillian et al. Hydrodynamic function of polyurethane prosthetic heart valves: influences of Yong's modulus and leaflet thickness. **Biomaterials**, v. 23, n. 1, p. 45-50, janeiro 2002.

BHATIA, S.; Yetter, A. Correlation of visual in vitro cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biology and Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 315-319, agosto 2008.

BLIT, P. H. et al. Electrospun elastin-like polypeptide enriched polyurethanes and their interactions with vascular smooth muscle cells. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 7, p. 2493-2503, julho 2012.

BOUTEN, C.V.C. et al. Substrates for cardiovascular tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4-5, p. 221-241, abril 2011.

BORENFREUND, E.; Puerner, J. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays. **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, n. 1, p. 7-9, 1984.

BRASIL. Resolução Normativa n. 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, n. 185, 2014. Diário Oficial da União.

BRIGANTI, E. et al. Silicone based polyurethane materials: a promising biocompatible elastomeric formulation for cardiovascular applications. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 17, n. 3, p. 259-266, março 2006.

CABRAL, E. L. **Síntese e caracterização de poliuretanos bioestáveis com potencial aplicação na área cardiovascular**. Porto Alegre. 2012. 95p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS, Brasil.

CAMPOS, M. S. T. et al. Desenvolvimento e caracterização térmica de implantes poliméricos biodegradáveis contendo sirolimus. In: **55° Congresso Brasileiro de Química**: 2015, Goiânia.

CARVALHO, S. R. et al. Characterization and pharmacokinetic analysis of crystalline versus amorphous rapamycin dry powder via pulmonary administration in rats. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 136-147, 2014.

CHAN-CHAN, L.H. et al. Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2035-2044, 2010.

CHEN, J. et al. The effect of full/partial UV-radiation of TiO₂ films on altering the behavior of fibrinogen and platelets. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 709-718, 2014.

CHEN, K-Y et al. Synthesis, characterization and platelet adhesion studies of novel ion-containing aliphatic polyurethanes. **Biomaterials**, v. 21, n. 2, p. 161-171, janeiro 2000.

COHEN, I. **Biomaterials in Cardiology**. (InspiredMD Corporation, Dereh Hashalom 4, Tel-Aviv). Disponível em: <http://chemistry.org.il/booklet/22/pdf/ilana_cohen.pdf>. Acesso em: 10 agosto 2009.

DASH, T. K.; Konkimalla, V. B. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15-33, fevereiro 2012.

DUBOIS, P et al. Macromolecular engineering of polylactonas and polylactides. 4. Mechanism and kinetics of lactide homopolymerizations by aluminum isopropoxide. **Macromolecules**, v. 24, n. 9, p. 2266-2270, abril 1991.

EAGLSTEIN, W.; Falanga, V. Tissue Engineering and the Development of Apligraf®, a Human Skin Equivalent. **Clinical Therapeutics**, v. 19, n. 5, p. 894-905, setembro 1997.

ELOY, J. O. et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74–82, 2016.

FERREIRA, B. M. P. et al. Estudo da superfície de membranas de PLLA tratadas com plasma usando SEM e AFM. In: **8º Congresso Brasileiro de Polímeros: 2005**, Águas de Lindoia, p. 1039-1040.

FIORO, R.; Zattera, A. J.; Ferreira, C. A. Effects of the incorporation of Low-Molecular Weight Diurethanes on Thermal and Rheological Properties of Termoplastic Polyurethane. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, n. 5, p. 2896-2905, junho 2009.

FILOVA, E. et al. Perivascular sirolimus-delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 94-101, 2011.

FUJIMOTO, K. et al. An Elastic, Biodegradable Cardiac Patch Induces Contractile Smooth Muscle and Improves Cardiac Remodeling and Function in Subacute Myocardial Infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 23, p. 2292-2300, junho 2007.

GHANBARI, H. et al. The anti-calcification potential of a silsesquioxane nanocomposite polymer under in vitro conditions: Potential material for synthetic leaflet heart valve. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 11, p. 4249-4260, novembro 2010.

GHASEMI-MOBARAKEH, L. et al. Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 8, p. 1129-1136, outubro 2010.

GOISSIS, G. et al. Reticulação Progressiva de pericárdio Bovino com Glutaraldeído para Confecção de Válvulas Cardíacas Biológicas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 46-54, abril/junho 1998.

GORNA, K.; Gogolewski, S. In vitro degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on E-caprolactone and Pluronic® with various hydrophilicities. **Polymer Degradation and Stability**, v. 75, n. 1, p. 113-122, junho 2002.

GRACIOLI, E. C. et al. Dispositivos poliméricos cardiovasculares: comportamento termomecânico e viabilidade celular. **Revista Matéria**, v. 18, n. 2, p. 1313-1322, junho 2013.

GRAD, S. et al. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. **Biomaterials**, v. 24, n. 28, p. 5163-5171, dezembro 2003.

GUAN, J. et al. Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3961-3971, junho 2005.

HELMUS, M.; Gibbons, D.; Cebon, D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. **Toxicologic pathology**, v. 36, p. 70-80, janeiro 2008.

HENCH, L.; Wilson, J. In: **Introduction. An Introduction to Bioceramics**. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 1993, v.1, p. 1-15.

HU, C-H. et al. Temperature- and pH-sensitive hydrogels to immobilize heparin-modified PEI/DNA complexes for sustained gene delivery. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 8982-8989, 2009.

INTERNATIONAL STANDART ORGANIZATION. Biological evaluation of medical devices. Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity, ISO 10993-3. 2014. 34p.

INTERNATIONAL STANDART ORGANIZATION. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, ISO 10993-5. 2009. 34p.

INTERNATIONAL STANDART ORGANIZATION. Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation, ISO 10993-6. Bruxelas, 2007. 34p.

IWAI, S. et al. Biodegradable polymer with collagen microsp sponge serves as a new bioengineered cardiovascular prosthesis. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 128, n. 3, p. 472-479, setembro 2004.

JAHNO, V. D. **Avaliação da citotoxicidade in vitro e da biocompatibilidade in vivo de biomateriais poliméricos**. Porto Alegre. 2009. 113p. Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Brasil.

JIANG, N.; ABE, H. Morphological changes in poly(L-lactide)/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) blends induced by different miscibility. **Polymer**, v. 66, p. 259-267, 2015.

KAHN, W.; FARAH, S.; DOMB, A.J. Drug eluting stents: Developments and current status. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 703-712, 2012.

KAWACHI, E.Y.; BERTRAN, C.A.; REIS, R.R. dos and ALVES, O.L.. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, julho/agosto 2000.

KLOSS, J. R. **Síntese e caracterização de poliuretanos biodegradáveis à base de poli(ϵ -caprolactona)diol**. Curitiba. 2007. 231p. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Brasil.

KUCINSKA-LIPKA, J. et al. Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 166-176, 2015.

LASCHKE, M. W. et al. In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyurethane scaffolds for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 6, p. 1991-2001, julho 2009.

LIGABUE, Rosane Angélica; A.S. Technology Componentes Especiais; Einloft, Sandra; Silva. Jefferson Braga; Jahno, Vanusca Dalosto; Poltronieri, Tassiani; Dullius, Jeane Estela de Lima; Viezzer, Christian; Cantarelli, Denise. Processo de produção de membranas biopoliméricas e membranas biopoliméricas obtidas por tal processo. BR000220904837456. B01D67/00. PI0902480-8A2. 31 jul. 2009.

LIGABUE, Rosane Angélica; Einloft, Sandra; Gracioli, Emanuelli Lourenço Cabral; Jahno, Vanusca Dalosto; Dullius, Jeane Estela de Lima; Dias, Guilherme Thomas Gerevini. Uso de membranas biopoliméricas para a obtenção de próteses, próteses cardiovasculares compreendendo tubos biopoliméricos, e processos para a obtenção dos mesmos. BR102012033805-0. 29 dez. 2012.

LOH, X. et al. Biodegradable thermogelling poly(ester urethane)s consisting of poly(lactic acid) – Thermodynamics of micellization and hydrolytic degradation. **Biomaterials**, v. 29, n. 14, p. 2164-2172, maio 2008.

MARCOS-FERNÁNDEZ, A. et al. Synthesis and characterization of biodegradable non-toxic poly(ester-urethane-urea)s based on poly(ϵ -caprolactone) and amino acid derivatives. **Polymer**, v. 47, n. 3, p. 785-798, janeiro 2006.

MCBANE, J. E. et al. Biodegradation and in vivo biocompatibility of a degradable, polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p. 6034-6044, setembro 2011.

MCKENNA, K. A. et al. Mechanical property characterization of electrospun recombinant human tropoelastin for vascular graft biomaterials. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 225-233, janeiro 2012.

MEYER, E. et al. Polyurethane elastomer: A new material for the visualization of cadaveric blood vessels. **Clinical anatomy**, Original Communication, v. 20, n. 4, p. 448-454, maio 2007.

MOHAMMADI, H.; Mequanint, K. Prosthetic aortic heart valves: Modeling And design. **Medical Engineering & Physics**, v. 33, n. 2, p. 131–147, março 2011.

MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, dezembro 1983.

NAGLE, Dylan et al. Infrared microspectroscopic study of the thermo-oxidative degradation of hydroxy-terminated polybutadiene/isophorone diisocyanate polyurethane rubber. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, n. 8, p. 1446-1454, agosto 2007.

NAIR, L.; Laurencin, C. Biodegradable polymers as biomaterials. **Prog. Polym. Sci.**, v. 32, n. 8–9 , p. 762–798, agosto–setembro 2007.

NOGUEIRA, G. M. et al. Bovine pericardium coated with biopolymeric films as an alternative to prevent calcification: In vitro calcification and cytotoxicity results. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 4, p. 575-582, maio 2010.

OLIVEIRA, L. S. A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 37-44, 2010.

OZAWA, T. et al. Histologic changes of nonbiodegradable and biodegradable biomaterials used to repair right ventricular heart defects in rats. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 124, n. 6, p. 1157-1164, dezembro 2002.

PASA, M. B. **Estudo morfométrico do espessamento intimal secundário ao implante de stent em artérias carótidas de suínos**. Porto Alegre. 2001. 114p. Dissertação (Mestrado em Medicina). Pós-Graduação em Medicina, UFRGS, Brasil.

PEGORETTI, A. et al. Contact angle measurements as a tool to investigate the filler-matrix interactions in polyurethane-clay nanocomposites from blocked prepolymer. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 6, p. 1662-1672, junho 2008.

PENG, H. et al. Controlled enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone)-based copolymers in the presence of porcine pancreatic lipase. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 643-650, abril 2010.

QI, P.; Maitz, M. F.; Huang, N. Surface modification of cardiovascular materials and implants. **Surface & Coatings Technology**, v. 233, p. 80-90, 2013.

SAAD, B. Development of degradable polyesterurethanes for medical applications: In vitro and in vivo evaluations. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 36, n. 1, p. 65–74, julho 1997.

SHARIFPOOR, S. et al. A study of vascular smooth muscle cell function under cyclic mechanical loading in a polyurethane scaffold with optimized porosity. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 11, p. 4218–4228, novembro 2010.

SHEIKHY, H. et al. Studying the effects of chain extenders chemical structures on the adhesives and mechanical properties of a polyurethane adhesive. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, p. 1949-1955, 2013.

SHI, F. et al. Effect of quenching temperatures on the morphological and crystalline properties of PVDF and PVDF-TiO₂ hybrid membranes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 980-988, 2012.

SILVA, G. et al. Biodegradations of polyurethanes and nanocomposites to non-cytotoxic degradation products. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 4, p. 491-499, abril 2010.

SIN, D. et al. Polyurethane (PU) scaffolds prepared by solvent casting/particulate leaching (SCPL) combined with centrifugation. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, n. 1, p. 78–85, janeiro 2010.

SKALSKÝ, I. et al. A perivascular system releasing sirolimus prevented intimal hyperplasia in a rabbit model in a medium-term study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 427, p. 311-319, 2012.

SOARES, J. F. S. **Constitutive Modeling for Biodegradable Polymers for Application in Endovascular Stents**. Texas. 2008. 301p. Dissertação (Mestrado em Filosofia). Texas A&M University, Estados Unidos da América.

SVENDSEN, C. et al. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, n. 1, p. 20-29, janeiro 2004.

TILLMAN, B. W. et al. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. **Biomaterials**, v. 30, n. 4, p. 583-588, fevereiro 2009.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Organic Volatiles Impurities, USP 23, NF18, 1995.

VENKATRAMAN, S.; Boey, F.; Lao, L. Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 853–874, agosto 2008.

VERT, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology. In: **5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**: 2008, Ouro Preto. Anais: p. 38-39.

VIEZZER, C. **Síntese, caracterização e avaliação da citocompatibilidade in vitro de poliuretano como biomaterial na Engenharia Tecidual**. Porto Alegre. 2009. 70 páginas. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais), PGETEMA, PUCRS, Brasil.

XUE, L.; Greisler, H. Biomaterials in the development and future of vascular grafts. **Journal of Vascular Surgery**, v. 37, n. 2, p. 472-480, fevereiro 2003.

WANG, Y. et al. Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with poly (D,L-lactic acid) diol, hexamethylene diisocyanate and different chain extenders. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, p. 1687-1694, 2011.

WESTHOFF, C. Depot-medroxyprogesterone acetate injection (Depo-Provera®): a highly effective contraceptive option with proven long-term safety. **Contraception**, v. 68, p. 75-87, março 2003.

WESTPHAL, M. et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. **Neuro-Oncology**, v. 5, p. 79-88, abril 2003.

WONG, J. The application and characteristics of Dacron vascular graft. 2008. 28p. Curso de Biomateriais.

YU, X. et al. A rapamycin-releasing perivascular polymeric sheath produces highly effective inhibition of intimal hyperplasia. **Journal of Controlled Release**. Article In Press. 2014.

ZHAO, Y. et al. CD44-tropic polymeric nanocarrier for breast cancer target rapamycin chemotherapy. **Nanomdecine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, p. 1221-1230, 2014.

ZHOU, L. et al. The degradation and biocompatibility of pH-sensitive biodegradable polyurethanes for intracellular multifunctional antitumor drug delivery. **Biomaterials**, v. 33, n. 9, p. 2734-2745, março 2012.