COPPE/UFRJ

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE FIBRONECTINA EM ARCABOUÇOS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Taíla de Oliveira Meiga

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Rio de Janeiro

Junho de 2010

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE FIBRONECTINA EM ARCABOUÇOS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Taíla de Oliveira Meiga

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Examinada por:

_____

Prof. Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, D.Sc.

_____

Prof. Marysilvia Ferreira da Costa, D.Sc.

_____

Prof. Maria Helena Miguez da Rocha Leão, D.Sc.

_____

Prof. Fernando Costa e Silva Filho, D.Sc.

_____

Prof. José Mauro Granjeiro, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
JUNHO DE 2010

Meiga, Taíla de Oliveira

Avaliação de metodologias para imobilização covalente de fibronectina em arcabouços de poli(3-hidroxibutirato)/ Taíla de Oliveira Meiga. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2010.

XVI, 94 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré.

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2010.

Referencias Bibliográficas: p. 85 - 94.

1. Biomateriais. 2. Poli(3-hidroxibutirato). 3. Fibronectina. 4. Arcabouços Porosos. I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Titulo.

Dedico este trabalho à minha mãe Mariangela, por ser o meu grande exemplo de trabalho e conquista em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Mariangela, por ser, além da pessoa que me criou e educou com grande eficiência, o meu maior exemplo de luta, conquista e superação.

À minha avó Margarida e ao meu avô Ernani, por todo carinho e ensinamento de uma vida de grandes experiências.

A toda a minha família, que sempre esteve junta me ensinando o real sentido da palavra união, apoiando uns aos outros para um caminho de vitórias.

À Professora Rossana Mara da Silva Moreira Thiré, pela orientação e pela amizade, por desde os tempos de iniciação científica ter acreditado e investido em mim.

À Professora Renata Autoun Simão, por ter disponibilizado os equipamentos (Goniômetro e microscópio de força atômica) para a caracterização das amostras.

Aos Professores José Mauro Granjeiro e Gutemberg Alves, pela colaboração fundamental.

Ao Professor Fernando Costa e Silva Filho, pela colaboração e pela influência positiva desde o início da minha graduação.

À CAPES, pela bolsa de mestrado, e ao CNPq e ao PROCAD/CAPES, pelo apoio financeiro

À PHB Industrial S/A, por ter fornecido a matéria-prima deste trabalho.

Aos profissionais desta instituição, em especial a Francisco (Secretaria), Carla e Adriana (MEV) e a Heleno (AFM).

Aos amigos especiais do Laboratório de Biopolímeros: Diogo, Roberta, Tati, Diego, Michelle, Nathália, Carol, Márcio e Jeremias. E aos agregados que tornam os dias mais animados: Sânia, Miguel, Marcelo, Dionísio, Amanda.

Aos muitos amigos de festas, pelos momentos de alegria e descontração que me davam mais força para semanas de muito trabalho.

Às minhas grandes amigas Júlia e Juliana, por toda amizade e compreensão em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos especiais, constantemente presentes: Isabela, Fábio, Flavinha, Ingridi, Thiago Garcia, Tamara, Carol, Jeniffer, Guilherme, Diego, Lucas e André.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DE FIBRONECTINA EM ARCABOUÇOS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

Taíla de Oliveira Meiga

Junho/2010

Orientadora: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Neste trabalho foram avaliadas diferentes metodologias para a imobilização de fibronectina na superfície de arcabouços porosos de poli(3-hidroxibutirato) – PHB visando à produção de um biomaterial biologicamente ativo. A superfície dos arcabouços foi modificada por hidrólise e/ou ativação por uma carbodiimida, a fim de permitir a imobilização de fibronectina por dois métodos diferentes: adsorção física e ligação covalente. Os arcabouços foram caracterizados por análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV), medidas de ângulo de contato, estimativa de cargas por cristal violeta, espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) e microscopia de força atômica (AFM). Os processos de modificação alteraram a natureza química das superfícies, tendo a hidrólise também causado grande modificação morfológica. A quantidade de fibronectina imobilizada variou de acordo com o método de modificação de superfície empregado. A hidrólise mostrou-se uma etapa inicial de grande importância no intuito de promover os sítios para a incorporação do agente de ativação. Testes de dessorção indicaram maior estabilidade da ligação covalente na interface proteína-substrato. Os arcabouços foram submetidos à análise de citotoxicidade, sendo considerados não-citotóxicos. Considerando-se a estabilidade da ligação e a quantidade de proteína imobilizada sobre o arcabouço, é possível sugerir que o arcabouço de PHB modificado por NaOH e ativado por EDC/NHS apresente maior potencial para a aplicação na engenharia de tecidos.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M. Sc.)

EVALUATION OF METHODOLOGIES FOR FIBRONECTIN COVALENT IMMOBILIZATION ON POLY(3-HYDROXYBUTIRATE) SCAFFOLDS

Taíla de Oliveira Meiga

June/2010

Advisor: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Department: Metallurgy and Materials Engineering

In this work different methodologies for fibronectin immobilization on the surface of poly(3-hydroxybutyrate) – PHB scaffolds was evaluate in order to produce a biologically active biomaterial. Scaffolds surface was modified by hydrolysis and/or carbodiimide activation in order to allow fibronectin immobilization by two different processes: physical adsorption and covalent binding. The scaffolds were characterized by Thermogravimetric Analysis (TGA), Scanning Electron Microcopy (SEM), contact angle measurements, charge evaluation by crystal violet, X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Atomic Force Microscopy (AFM). Modification procedures changed chemical character of scaffolds surface. Besides, hydrolysis also led to great morphological changes. The amount of immobilized fibronectina varied due to the procedure used for surface modification. It was verified that hydrolysis is a necessary first step toward incorporation of activation agent. Desorption tests indicated great stability of the covalent linkage on the protein-substrate interface. The scaffolds were submitted to the cytotoxicity assay, being considered no-cytotoxic. Considering linkage stability and amount of immobilized fibronectin, it is possible to suggest that hydrolyzed and EDC/NHS activated PHB scaffolds presented greater potential for tissue engineering applications.

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução 01

1.2. Objetivos 03

CAPÍTULO II – REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Engenharia de tecidos 05

2.2. Biomateriais 09

2.3. Polihidroxialcanoatos 14

2.3.1. Poli(3-hidroxibutirato) 16

2.3.2. Biodegradação 18

2.4. Proteínas 19

2.4.1. Fibronectina 24

2.4.2. Interação proteína-superfície 25

2.5. Modificação de superfície 27

2.5.1. Métodos físico-químicos 29

2.5.2. Métodos de recobrimento 30

2.5.3. Métodos biológicos 30

CAPÍTULO III – METODOLOGIA

3.1. Materiais 35
3.2. Produção dos arcabouços poliméricos porosos 36
3.2.1. Preparo da solução de PHB 36
3.2.2. Determinação da concentração da solução de PHB 37
3.2.3. Definição da faixa granulométrica do agente porogênico – NaCl 38
3.2.4. Confecção dos arcabouços pela técnica de lixiviação de sal 38
3.2.5. Acompanhamento da eficácia do processo de lixiviação 38
3.2.5.1. Condutividade da água de lavagem 39
3.2.5.2. Análise termogravimétrica (TGA) 39
3.2.6. Análise morfológica e determinação do tamanho de poros por microscopia eletrônica de varredura (MEV) 40
3.2.7. Determinação da densidade e do volume real dos arcabouços 41
3.2.8. Determinação da porosidade dos arcabouços 41

3.3. Ativação de superfície 42
3.3.1. Hidrólise com solução de NaOH 43
3.3.2. Incorporação do agente de acoplamento 44

3.4. Imobilização de fibronectina via adsorção ou via ligação covalente 45

3.5. Caracterização dos arcabouços modificados 45
3.5.1. Ângulo de contato da superfície dos arcabouços 45
3.5.2. Estimativa de cargas dos arcabouços por cristal violeta 46
3.5.3. Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS) 47
3.5.4. Microscopia de força atômica (AFM) 47
3.5.5. Análise de citotoxicidade 48
3.5.6. Avaliação da força de ligação da fibronectina por dosagem de extrato 49

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da eficácia do processo de lixiviação 50
4.1.1. Medida de condutividade elétrica da água de lavagem 50
4.1.2. Análise temogravimétrica (TGA) 52

4.2. Caracterização dos arcabouços porosos de PHB 53

4.2.1. Morfologia e tamanho de poros 53

4.2.2. Densidade 57

4.2.3. Porosidade 57

4.3. Efeitos da hidrólise com NaOH e da ativação de superfície 58

4.4. Efeitos da adsorção e da ligação covalente de fibronectina sobre os arcabouços de PHB 63

4.5. Estimativa do efeito de dessorção 76

4.6. Análise citotóxica 77

4.7. Considerações finais 81

CAPÍTULO V – CONCLUSÕES

5.1. Conclusões 83

5.2. Sugestões para Trabalhos Futuros 84

CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1- Estrutura molecular genérica do monômero dos polihidroxialcanoatos, PHAs.....14

Figura 2.2- Estrutura molecular do monômero do poli(3-hidroxibutirato), PHB.....16

Figura 2.3- Estrutura geral de um aminoácido.....20

Figura 2.4- Fórmulas químicas dos 20 diferentes aminoácidos (Adaptado de Dee *et al.*, 2002).....21

Figura 2.5- Esquema de ligação peptídica por reação de condensação entre dois aminoácidos.....22

Figura 2.6- Estrutura da fibronectina plasmática com seus sítios de interação (Adaptado de Dee *et al.*, 2002).....24

Figura 2.7- Estrutura tridimensional da região de domínio do módulo tipo III da fibronectina (adaptado de Krammer et al., 1999).....25

Figura 2.8- Esquema de ligação biomolécula-substrato por atração eletrostática (Adaptação de Oréfice *et al.*, 2006).....32

Figura 2.9- Esquema de aprisionamento da biomolécula em rede de géis (Adaptação de Oréfice *et al.*, 2006).....33

Figura 2.10- Esquema de ligação covalente entre biomolécula e substrato (Adaptação de Oréfice *et al.*, 2006).....33

Figura 2.11- Esquema de modificação com ação de agente de acoplamento para união biomolécula-substrato induzindo ligação celular específica (Adaptação de Oréfice *et al.*, 2006).....34

Figura 3.1- Esquema de ativação de superfícies poliméricas por carbodiimidas (adaptado de Ma *et. al.*, 2005; Nam *et. al.*, 2007).....43

Figura 3.2- Esquema de uma gota sobre uma superfície durante medidas de ângulo de contato e o equilíbrio termodinâmico entre as três fases.....46

Figura 4.1- Curva-padrão de condutividade elétrica dos íons NaCl em solução aquosa.....51

Figura 4.2- Micrografias de MEV mostrando a alta porosidade da região do arcabouço formada em contato com o vidro: (a) 30x; (b) 50x.....53

Figura 4.3- Micrografias de MEV de duas regiões diferentes na superfície formada em contato com o ar, mostrando a possível formação de poros nesta superfície, em aumentos de 50x.....54

Figura 4.4- Micrografias de varredura da camada de PHB na superfície do arcabouço, nos aumentos de 3000x (a) e 4000x (b).....54

Figura 4.5- Micrografias da seção transversal do arcabouço poroso nos aumentos de 30x (a); 50x (b) e 100x (c).....55

Figura 4.6- Histograma da distribuição do tamanho de poros dos arcabouços de PHB.....56

Figura 4.7- Esquema de modificação da superfície de materiais à base de PHB por hidrólise, com a exposição de grupamentos -COOH e –OH.....58

Figura 4.8- Micrografias da superfície de arcabouço poroso não modificado (a) e modificado por NaOH (b).....59

Figura 4.9- Micrografias da seção transversal de arcabouço poroso não modificado (a) e modificado por NaOH (b).....59

Figura 4.10- Imagens de topografia de 30 µm x 30 µm obtidas por AFM operado em modo contato intermitente e exibidas no formato 3D da superfície dos arcabouços sem modificação (a) e hidrolisados (b).....60

Figura 4.11- Micrografias da seção transversal de arcabouço poroso não modificado (a) e modificado por EDC/NHS (b).....61

Figura 4.12- Imagens, e seus respectivos valores, das gotas formadas durante a análise de ângulo de contato sobre arcabouço sem modificação (a), ativados por EDC/NHS (b), modificado por NaOH (c), e modificado por NaOH e ativados por EDC/NHS (d).....62

Figura 4.13- Esquema de formação de múltiplas camadas de fibronectina a partir de ligação covalente com o substrato (Adaptado de Zang *et. al.*, 2007).....71

Figura 4.14- Esquema de adsorção de proteínas sobre superfícies muito hidrofílicas. (Adaptado de Dee *et al.*, 2002).....72

Figura 4.15- Arcabouços corados por cristal violeta, após eluição do corante por metanol, com seus respectivos valores de absorbância em porcentagem de absorção de luz.....73

Figura 4.16- Imagens de topografia obtidas por AFM 10 x 10 µm da superfície dos arcabouços Sem modificação (a); PN (b); PF (c); PNF (d); PAF (e) e PNAF(f).....75

Figura 4.17- Gráfico da análise de citotoxicidade da atividade respiratória de fibroblastos. Constam os valores encontrados para cada amostra e os controles, e as suas

respectivas barras de erro.....78

Figura 4.18- Gráfico da análise de citotoxicidade da incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos dos fibroblastos. Constam os valores encontrados para cada amostra e os controles, e as suas respectivas barras de erro.....79

Figura 4.19- Gráfico da análise de citotoxicidade da inclusão do corante cristal violeta no DNA dos fibroblastos. Constam os valores encontrados para cada amostra e os controles, e as suas respectivas barras de erro.....80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1- Propriedades do poli(3-hidroxibutirato) – PHB.....18

Tabela 4.1- Valores de condutividade elétrica da água de lavagem do processo de lixiviação em função do tempo de lixiviação.....51

Tabela 4.2- Variáveis para a determinação da densidade dos arcabouços de PHB.....57

Tabela 4.3- Variáveis para a determinação da porosidade dos arcabouços de PHB.....57

Tabela 4.4- Valores de ângulo de contato medidos para os arcabouços com e sem fibronectina imobilizada na superfície, tendo ou não sido previamente tratados.....64

Tabela 4.5- Concentração, em porcentagem atômica, dos elementos presentes na superfície de cada amostra. (Fn= fibronectina).....66

Tabela 4.6- Quantidades relativas dos componentes do espectro C 1s para cada diferente amostra (em porcentagem).....67

Tabela 4.7- Valores de rugosidade (RMS) medidos por AFM sobre superfícies de arcabouços de PHB expostos a diferentes estratégias de modificação (30 µm x 30 µm).....68

Tabela 4.8- Avaliação da altura máxima encontrada no eixo Z, medidas por imagens de AFM 30 µm x 30 µm, sobre superfícies de diferentes arcabouços.....69

Tabela 4.9- Valores de absorbância obtidos a partir da leitura dos extratos dos arcabouços de PHB com diferentes modificações.....76

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

A constante busca do homem pelo aumento da qualidade e do tempo de vida tem gerado crescente e constante necessidade de desenvolver alternativas para o reparo ou substituição de tecidos avariados por traumas, patologias ou envelhecimento natural.

Neste contexto de recuperação, surge a engenharia de tecidos, com pesquisas intensas visando à recuperação tecidual. A base da engenharia de tecidos é a multidisciplinaridade, que integra conceitos de áreas como biologia, medicina e engenharia, a fim de produzir novos substitutos biológicos (biomateriais) com função de restaurar ou manter o funcionamento normal do tecido. Para o sucesso das técnicas de engenharia de tecidos, é importante conhecer e obter o controle dos processos de crescimento, diferenciação e comportamento celular que ocorrem na superfície do biomaterial (Yang *et al.*, 2003). A engenharia de tecidos, ou bioengenharia, encontra-se em desenvolvimento constante, já apresentando bons resultados, como em processos de enxerto de pele e regeneração de defeitos em alguns ossos curtos. Atualmente, o maior objetivo das pesquisas em bioengenharia é o desenvolvimento de um mecanismo que permita o cultivo virtual de todos os tipos de tecidos e órgãos humanos, terminando, assim, com as longas esperas em filas de doação e com os efeitos de rejeição causados pelos transplantes.

Os biomateriais empregados podem ser permanentes ou temporários, naturais ou sintéticos, poliméricos, cerâmicos, metálicos ou materiais compósitos (Grosskinsky, 2006). Quando utilizados para a regeneração tecidual, devem ser estruturados na forma de arcabouços porosos (matrizes tridimensionais, *scaffolds*), os quais são, em geral, biodegradáveis e biocompatíveis (Hutmacher, 2000). A presença de poros interconectados nos arcabouços é um fator decisivo na produção do biomaterial, uma vez que as células precisam estar em contato umas com as outras e trocar nutrientes e gases com o meio (Hutmacher, 2000).

Os biomateriais, assim que são implantados no organismo hospedeiro, provocam uma resposta inflamatória que induz os processos de reparação e regeneração. Estes processos são necessários para a integração do biomaterial, uma vez que a partir deles é iniciado o recobrimento da superfície por proteínas presentes no plasma sangüíneo, que irão sinalizar a adesão celular (Hildebrand *et al.*, 2005).

O emprego de materiais poliméricos como biomaterial tem se destacado devido às suas características de biodegradabilidade, atividade fisiológica e facilidade de conformação em vários formatos como fibras, filamentos, filmes, etc. Ademais, a estrutura das cadeias poliméricas pode ser facilmente alterada pela incorporação de outras moléculas ou até mesmo pela remoção de moléculas existentes, propiciando características específicas de forma a melhorar e ampliar sua gama de aplicação. Na avaliação dos possíveis biomateriais que podem ser utilizados na bioengenharia, os quais atendem às propriedades requeridas de biocompatibilidade e bioatividade, destaca-se uma classe de poliésteres microbianos biodegradáveis, conhecida como polihidroxialcanoatos (PHAs), que é tomada como objeto na presente pesquisa.

Os arcabouços de PHAs podem ser produzidos por diferentes técnicas e, após sua produção, tais arcabouços podem passar por modificações, de forma a atender as necessidades de cada tratamento, por exemplo: modificação da superfície com ativação de fatores biológicos, modelagem das propriedades mecânicas e adaptação da taxa de degradação (Williams *et al.*, 1999). Os PHAs, quando utilizados pela engenharia de tecidos, são capazes de regenerar osso, cartilagem, fígado, pele, tendão, válvulas cardíacas, bexiga, entre outros. Os PHAs podem também produzir um grande número de produtos com potencial para serem aplicados em diversos tecidos, como córneas, pâncreas, cavidades dentária e oral, pele e sistemas gastrointestinal, cardiovascular, musculoesquelético e nervoso (Williams *et al.*, 1999).

O poli(3-hidroxibutirato), ou PHB, é um polímero de origem natural, produzido por microorganismos como reserva energética e pertencente ao grupo dos PHAs (Sudesh *et al.*, 2000). O PHB é um material biodegradável, bioreabsorvível e biocompatível com uma série de grupos celulares (Griffith, 2000), apesar de não possuir grupamentos sinalizadores para a adesão celular em sua superfície.

Vários métodos de modificação de superfícies têm sido propostos pela literatura a fim de otimizar os processos de adesão, proliferação, migração e diferenciação celular nas superfícies de arcabouços poliméricos porosos. Esses métodos podem ser classificados como: métodos físico-químicos, de recobrimento e biológicos (Oréfice *et*

al., 2006). A imobilização de biomoléculas pelo método biológico é o procedimento mais utilizado atualmente para desenvolver materiais bioativos (Vallières *et al.*, 2007). O método biológico engloba três metodologias distintas para imobilização de biomoléculas: adsorção física, imobilização por aprisionamento e ligação covalente (direta ou via agente de acoplamento) (Yang *et al.*, 2003).

A fibronectina é uma das biomoléculas mais utilizadas em pesquisas de biomimetização devido à sua participação em diversos processos fisiológicos, como cicatrização, adesão celular, migração, espraiamento, diferenciação e proliferação (Vallières *et al.*, 2007). Trata-se de uma proteína adesiva, que pode se apresentar sob duas diferentes formas no organismo: conformação globular, quando solubilizada no plasma sanguíneo, ou estrutura fibrilar insolúvel, presente na matriz extracelular. Ao longo da cadeia polipeptídica, a fibronectina possui sequências de tripeptídeos RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), que funcionam como sítios específicos para a ligação das integrinas (proteínas transmembrana) celulares.

Toda proteína possui conformação específica, ou seja, estrutura tridimensional, que irá lhe conferir bioatividade. Por vez, quando a proteína é ligada à superfície de biomateriais, essa conformação pode ser alterada, inativando as funções protéicas. Para a imobilização de proteína em biomateriais, podem ser utilizados métodos de adsorção eletrostática ou de ligação covalente, sendo este último mais complexo e capaz de produzir superfícies com maior controle da posição de ligação protéica e maior estabilidade da interação proteína-substrato (Vallières *et al.*, 2007).

Neste trabalho, foram produzidos arcabouços porosos de PHB pela técnica de lixiviação de sal. As superfícies dos arcabouços foram modificadas por hidrólise ou ativação por uma carbodiimida, a fim de criar superfícies mais estáveis para a imobilização da fibronectina por dois processos diferentes: adsorção física e ligação covalente. Os arcabouços, com diferentes superfícies, obtidos ao final de cada processo, foram avaliados quanto à morfologia, à composição química, às cargas da superfície, à estabilidade da interface proteína-substrato e ao caráter citotóxico.

1.2. Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi promover a avaliação de diferentes metodologias para a imobilização de fibronectina na superfície de arcabouços porosos

de poli(3-hidroxibutirato) – PHB, visando à produção de um biomaterial biologicamente ativo com aplicação potencial na engenharia de tecido. A bioativação dos arcabouços foi realizada via adsorção física ou via ligação covalente (a necessidade de uma etapa preliminar de modificação de superfície por hidrólise com NaOH também foi investigada).

Para a produção do novo biomaterial proposto, foram realizadas as seguintes etapas:

- Produção de arcabouços porosos de PHB pela técnica de lixiviação de sal;
- Modificação química das superfícies dos arcabouços por dois processos distintos, realizados de forma isolada ou em associação, com o intuito de criar sítios ativos para a imobilização da fibronectina; o primeiro consta da hidrólise com NaOH, e o segundo, da ativação por carbodiimida;
- Imobilização da fibronectina via adsorção física ou via ligação covalente;
- Avaliação dos efeitos da modificação de superfície na morfologia, na composição química e na carga dos arcabouços de PHB;
- Avaliação da citotoxicidade dos biomateriais por testes biológicos.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos, ou bioengenharia, é a ciência relacionada à restauração de partes do corpo defeituosas ou danificadas. Consiste no desenvolvimento e na manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos crescidos em laboratório sobre um substrato (biomaterial), que terão a função de substituir ou apoiar a região a ser tratada (Oréfice *et. al.*, 2006). Consiste, portanto, numa ciência multidisciplinar que combina conhecimentos da biologia de sistemas, medicina, ciências e engenharia dos materiais para a produção de substitutos biológicos com objetivo de restaurar, manter ou melhorar funções teciduais degeneradas (Langer e Vacanti, 1993; Barbanti *et al.*, 2005).

Existem pelo menos três técnicas distintas que podem ser utilizadas na engenharia de tecidos (Langer e Vacanti, 1993; Oréfice *et al.*, 2006), a saber:

1) Transplante direto de células isoladas, a fim de reparar ou substituir tecidos avariados. Esta técnica permite manipulação das células antes da sua infusão e substituição somente das células que perderam a função.

2) Utilização de moléculas sinalizadoras do crescimento tecidual. O sucesso dessa abordagem baseia-se na purificação e na produção em larga escala de moléculas que induzam à regeneração tecidual, como fatores de crescimento, e na utilização de técnicas que permitam a chegada de tais moléculas à região que se deseja tratar.

3) Transplantes de matrizes com ou sem células. Por essa técnica, são utilizadas células isoladas do corpo humano, que serão semeadas sobre ou dentro de matrizes, para posterior implantação na região a ser tratada. O arcabouço utilizado deve ser capaz de suportar a adesão e a proliferação celular; uma possível rejeição imunológica é prevenida pela utilização de medicamentos imunosupressivos.

Quando é necessário o uso de células para o tratamento de tecidos ou órgãos avariados, estas são obtidas pela dissociação do tecido de um doador. A origem do tecido doado pode ser heteróloga (de diferente espécie, por exemplo, de origem bovina), alogênica (de indivíduos diferentes, porém da mesma espécie) ou autóloga (do próprio

indivíduo). A utilização de células de origem autóloga diminui muito, podendo por vezes até inibir, as reações de rejeição e os possíveis efeitos prejudiciais causados pelo uso de medicamentos imunosupressivos (Williams *et al.*, 1999; Atala, 2007). Para que o material transplantado seja aceito pelo organismo receptor, é importante que este material aceite ou induza a adesão, o crescimento e a proliferação celular.

Na bioengenharia óssea, por exemplo, é importante que o biomaterial seja capaz de permitir rápido acesso e migração das células osteoprogenitoras para a região do tecido lesionado, recrutando fatores de bioativação (Shin *et al.*, 2003). Diversas proteínas de matriz extracelular, como osteopontina, trombospondina e sialoproteínas ósseas, atuam de forma importante, induzindo a migração e a proliferação das células, a deposição de matriz extracelular e a mineralização (Shin *et al.*, 2003). O processo conhecido como osseointegração foi definido como aquele em que "uma fixação rígida e assintomática de materiais aloplásticos no osso é obtida e mantida durante o carregamento funcional" (Zarb e Alberktsson, 1991).

O elemento chave para o sucesso da engenharia de tecidos é a obtenção do controle dos processos de crescimento, diferenciação e comportamento celular quando em contato com a superfície do biomaterial (Yang *et al.*, 2003). Assim, a escolha do biomaterial e da técnica ideal para a terapia regenerativa desejada é de grande importância, pois o comportamento das células, quando cultivadas *in vitro*, nem sempre é o mesmo que *in vivo*. Por exemplo, células do fígado, que *in vivo* apresentam grande capacidade regenerativa, quando cultivadas e expandidas *in vitro*, podem apresentar comportamento mais complexo de crescimento e proliferação (Atala, 2007).

O cultivo de células *in vitro* na engenharia de tecidos é realizado sobre um arcabouço poroso (matriz ou *scaffold*), o qual deve funcionar como molde, tendo sua taxa de degradação controlada de forma equivalente aos processos de adesão, proliferação e crescimento celular (Williams *et al.*, 1999; Hutmacher, 2000). Muitos materiais promissores têm sido estudados para a produção desses arcabouços, como a hidroxiapatita, os poliésteres bioreabsorvíveis e os polímeros naturais, como colágeno e quitosana (Hutmacher, 2000).

Algumas propriedades importantes devem ser consideradas quando se deseja melhor desempenho do arcabouço, tais como:

1) A matriz deve ser biocompatível e biodegradável, com taxa de degradação compatível com o crescimento celular. Seus produtos de degradação devem ser não-

tóxicos e toleráveis ao organismo (Williams *et al.*, 1999; Hutmacher, 2000; Shin *et al.*, 2003).

2) A referida matriz deve ter módulo de elasticidade compatível com o tecido que irá regenerar, o que lhe proporcionará melhor manutenção no espaço que lhe foi designado, servindo futuramente como região de regeneração tecidual (Hutmacher, 2000).

3) A estrutura deve ser capaz de suportar o crescimento das células, mantendo suas propriedades mecânicas pelo tempo que forem requeridas, sem demonstrar sinais de falha ou fadiga. Essa propriedade se torna um grande problema, pois o material deve ser produzido de tal forma que suas ligações interatômicas e intermoleculares sejam suficientemente fortes e, em contrapartida, com estruturas física e química que permitam o ataque hidrolítico e a degradação (Hutmacher, 2000).

4) O arcabouço deverá permitir uma boa difusão de nutrientes para o interior da estrutura tridimensional, o que é facilitado quando o material é estruturado em poros interconectados e dificultado, por outro lado, quando se trata de arcabouço muito volumoso (Williams *et al.*, 1999).

5) A matriz deve ser apta a guiar e organizar o crescimento celular da maneira desejada. Para alguns tipos celulares, a capacidade de proliferação diminui muito ou cessa quando a célula adere à superfície, assim, é necessário que o material seja capaz de conduzir as células ao crescimento e funcionamento normais (Hutmacher, 2000).

6) O arcabouço deve proporcionar a criação de redes de vascularização que assegurem a sobrevivência e a funcionalidade das células semeadas, permitindo acesso ao sistema vascular do organismo, em que ocorrerão trocas de gases, nutrientes e eliminação de produtos metabolizados. O controle do grau e da taxa de vascularização pode ser realizado pela incorporação de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos na estrutura do arcabouço. Já foi comprovada a capacidade de indução de uma boa neovascularização e da preservação do volume do tecido de engenharia produzido pela combinação de um fator de crescimento endotelial vascular (fator angiogênico) junto às células endoteliais (Nomi *et al.*, 2002).

7) O novo tecido formado, do ponto de vista clínico e biomecânico, deve promover fixação mecanicamente segura e estável ao tecido hospedeiro (Dunkelman *et al.*, 1995).

Levando-se em conta todas as funções anteriormente referidas, existem basicamente duas estratégias para a aplicação das matrizes tridimensionais. Na primeira o material deve ser confeccionado com taxas de degradação e reabsorção proporcionais

ao crescimento celular/tecidual, sendo capaz de suportar física e mecanicamente as células, desde o momento da inoculação até o transplante para o tecido hospedeiro avariado. O transplante é realizado com a formação de um tecido prematuro, ou seja, uma estrutura física de arcabouço/célula/tecido é transplantada para a região lesionada, em que haverá a remodelação do arcabouço pela degradação *in vivo* até sua total substituição pela formação de um novo tecido (Hutmacher, 2000; Barbanti *et al.*, 2005).

Na segunda estratégia, as propriedades mecânicas do arcabouço e seu tempo de degradação são dimensionados para permitir a proliferação e a diferenciação celular até a formação do tecido prematuro, quando será inserido num biorreator até a formação do tecido maduro. Nesta segunda estratégia, as células semeadas proliferam e secretam matriz extracelular durante a cultura *in vitro*, enquanto o arcabouço é degradado e reabsorvido de forma gradual e controlada, liberando espaço para o crescimento celular/tecidual no biorreator. Após a formação do tecido maduro, que já é capaz de suportar o próprio peso, o implante é inserido no organismo (Hutmacher, 2000; Barbanti *et al.*, 2005).

A fim de possibilitar a utilização do arcabouço tridimensional cultivado por células em transplantes para o tecido avariado, é necessário que haja controle das condições hidrodinâmicas e bioquímicas do ambiente de cultivo *in vitro* (Freed e Vunjak-Novakovic, 1997). Esse controle é realizado por biorreatores que, de forma automática, suprem o ambiente com nutrientes fisiológicos e gases, até que o crescimento celular seja suficiente para que o produto de engenharia composto por matriz e célula esteja apto a ser transplantado. Nesse momento, se faz necessário o controle do grau de remodelação e da taxa de substituição celular/tecidual, visando ao alcance da estabilidade mecânica e da vascularização do tecido a ser regenerado (Young *et al.*, 1997). O grau de remodelação dependerá da anatomia e da fisiologia do local onde o arcabouço será implantado (Young *et al.,* 1997).

A resposta do tecido ao biomaterial implantado sofre influência de diversos fatores, como a reação na interface tecido-biomaterial, a topografia da superfície, o local do implante, o trauma cirúrgico sofrido e a carga mecânica produzida pelo implante (Hilborn e Bjursten, 2007). Assim, para cada situação específica a ser tratada, é necessário o uso de um biomaterial diferente, que atenda a cada necessidade particular. Alguns desafios, como o de desenvolver a superfície ideal, o modelo e o tamanho de poros requeridos para a proliferação e diferenciação celular no seu fenótipo original, ainda não foram superados com pleno êxito.

Um desses desafios, por exemplo, diz respeito ao tecido ósseo, mais precisamente a ossos longos que recebem muita transferência de carga. Nesse caso, o primeiro critério a ser considerado é a carga mecânica que o material é capaz de suportar. Já é sabido que a transferência de carga é necessária para manter a interface osso-implante, mas quando esta transferência é muito alta ou muito baixa, pode haver reabsorção óssea (Mullender e Huiskes, 1995). Implantes metálicos, por serem muito mais fortes que o osso, tendem a estressar o ambiente, causando a erosão do tecido nativo, o que acarreta não só sofrimento do paciente, mas também necessidade de nova cirurgia para substituição do implante (Seal, *et al.*, 2001). Quando se trata de ossos que recebem menor intensidade de cargas, como no caso dos ossos curtos, a terapia regenerativa tende à utilização de polímeros bioreabsorvíveis com propriedades físico-químicas adequadas para cada situação, são os chamados biopolímeros. Materiais que apresentam propriedades mecânicas mais parecidas com as do tecido ósseo e características físico-químicas de superfície mais adequadas para a osseointegração tendem a eliminar ou minimizar possíveis reações adversas provocadas por seu implante no organismo hospedeiro, assumindo, assim, maior aplicação na bioengenharia óssea (Seal, *et al.*, 2001).

Observa-se, portanto, que, mesmo com todo o desenvolvimento já alcançado pela engenharia de tecidos, ainda há muito a ser investigado em termos moleculares, havendo grande necessidade de novos materiais que interajam de forma específica com as células através de fenômenos mediados por receptores (Griffith, 2000). Um grande desafio é entender como as células respondem aos sinais moleculares.

2.2. Biomateriais

Antes de definir ou descrever os biomateriais, é importante entender as reações que tais elementos promovem quando transplantados para o organismo. Momentos após a implantação do biomaterial no organismo, ocorre a adsorção de proteínas à sua superfície. Essas adsorções acontecem pela acomodação das proteínas em locais de ligações não completas. O recobrimento protéico é capaz de mudar a resposta do biomaterial quanto à biocompatibilidade, pois as proteínas possuem grupamentos sinalizadores para a adesão celular, sendo capazes de guiar os processos de migração, diferenciação e proliferação celular (Oréfice *et al.*, 2006).

Os processos que ocorrem quando do implante de um biomaterial no organismo hospedeiro são os mesmos que se dão quando há cicatrização de uma lesão (Hilborn e Bjursten, 2007). Lesões são danos provocados por excesso de estresse mecânico sobre um tecido, desencadeando, então, processos para cura e restauração das funções da região lesionada. O processo de implante de um biomaterial envolve, assim, dois componentes essenciais: a reparação e a regeneração (Hildebrand *et al.*, 2005).

A reparação ocorre pela cicatrização. Nas áreas circunvizinhas ao biomaterial, é formado o tecido fibroso, com posterior fabricação de colágeno por células. Portanto, toda a superfície do biomaterial recebe um recobrimento de tecido conectivo à base de colágeno. Na regeneração, as células diferenciadas se organizam de forma adjacente ao biomaterial, recompondo a morfologia e a funcionalidade do tecido hospedeiro (Oréfice *et al.*, 2006).

A reparação é composta por quatro estágios que estão interligados, são eles: hemorragia, inflamação, proliferação e remodelação (Hilborn e Bjursten, 2007):

1) Hemorragia - Fase de extravasamento sanguíneo para a cavidade lesionada, causada pelo rompimento de veias. É importante para a formação do coágulo de fibrina que inicia o processo de selamento da lesão.

2) Inflamação - Esta fase é essencial. Os efeitos de uma inflamação aguda são muito benéficos, promovendo o aumento da vascularização local. É caracterizada pela ativação das cascatas vascular e celular que ocorrem em paralelo e que são interligadas.

3) Proliferação – Inicia-se com a inflamação e envolve a regeneração de tecidos para substituir o que foi perdido.

4) Remodelação - Acontece pela ação de diferentes enzimas proteolíticas produzidas por células presentes na região lesionada. Tais enzimas têm como função remodelar as proteínas da matriz extracelular, de acordo com as necessidades mecânicas requeridas pelo tecido.

Assim, na etapa inicial do transplante, a superfície do biomaterial entra em contato com o sangue (com o coágulo e as células sanguíneas), ocorrendo uma adesão de proteínas do sangue, como plaquetas e fibrinogênio. Por este processo, é formada uma rede de fibrina sobre o material, onde ocorrerá a adesão celular. Sendo assim, as células do tecido a ser tratado não interagem diretamente com a superfície do biomaterial implantado, mas sim com uma camada modificada por proteínas do sangue.

A ligação da maioria das proteínas da matriz extracelular com a membrana celular no processo de adesão é dada, principalmente, pelas integrinas. As integrinas são

proteínas transmembranas conectadas normalmente à actina do citoesqueleto celular. A interação entre a proteína de matriz e a integrina transmite sinais intracelulares que são capazes de controlar o comportamento celular. A natureza da matriz circundante e o estado de ligação da célula a essa matriz irão determinar os sinais transmitidos. Os sinais intracelulares podem influenciar quase todos os aspectos do comportamento celular, por exemplo, o fenômeno de proliferação e sobrevivência, mais conhecido como fenômeno de dependência do ancoramento. Nesse processo, quando as células perdem contato com a matriz, elas morrem, pois param de receber os sinais gerados pelas integrinas, assegurando que cada tipo de célula sobreviva e prolifere somente quando em situação adequada (Alberts *et al.*, 2010).

Para induzir a adesão celular de forma controlada na superfície do material, este é confeccionado juntamente com moléculas de sinalização (Shin *et al.*, 2003). Trata-se de técnicas de modificação de superfície que permitem o reconhecimento celular pela inclusão de, por exemplo, proteínas, que possibilitam a aceitação ou a rejeição do material.

Dessa forma, com a capacidade de mimetizar as funções biológicas e mecânicas do ambiente original do tecido a ser tratado, os biomateriais atuam como matrizes para adesão, proliferação, migração e diferenciação celular (Atala, 2007). Representam um grupo de poderosos instrumentos para a medicina, com o fim de tratar, otimizar ou substituir um órgão ou tecido avariado, que, por si só, não conseguiria se reconstituir.

Pelo tempo de ação no organismo, os biomateriais podem ser classificados como permanentes ou temporários. Suas fontes de obtenção variam das naturais às sintéticas, podendo ser poliméricos, cerâmicos, metálicos ou materiais compósitos (Grosskinsky, 2006). A escolha do material adequado deve levar em consideração sua funcionalidade como suporte mecânico temporário para o crescimento celular/tecidual, logo, sua escolha deve ser realizada de forma a manter a integridade do tecido formado (Atala, 2007).

Algumas propriedades importantes estão relacionadas à físico-química dos biomateriais, como: biocompatibilidade, bioatividade, bioreabsorção e biodegradação (Oréfice *et al.*, 2006):

Biocompatibilidade - Este conceito define a interação tecido-biomaterial. Depende não só das características intrínsecas do material (por exemplo: composição química e cristalinidade), mas também do ambiente de implantação e da tarefa para a

qual foi produzido (Oréfice *et al.*, 2006). A biocompatibilidade é específica para cada biomaterial em determinada região do organismo.

Bioatividade - É a capacidade de biomateriais interagirem com tecidos vivos, promovendo a sua integração no organismo receptor. Baseia-se na estimulação de processos físico-químicos inerentes a sistemas biológicos, integrando o biomaterial (Oréfice *et al.*, 2006). A bioatividade é uma propriedade específica, que varia de acordo com o ambiente orgânico onde o biomaterial é implantado.

Bioreabsorção - É a característica atribuída aos materiais que mostram total degradação pela diminuição de tamanho, tendo seus subprodutos eliminados pelas rotas metabólicas do organismo. Tal conceito reflete a eliminação total do material, sem efeitos colaterais (Vert *et al.*, 1992).

Biodegradação - É o termo utilizado para materiais que, devido à degradação macromolecular, sofrem dispersão no organismo. Seus subprodutos são retirados do local de ação, mas não são necessariamente eliminados pelo organismo (Vert *et al.*, 1992). São ideais para a recuperação de tecidos danificados por certo período de tempo. Durante o processo de reparo, o novo tecido se forma substituindo, progressivamente, o implante nas funções requeridas.

Outros critérios a serem considerados na escolha e no desenvolvimento de um biomaterial são a biocompatibilidade e a bioatividade. Para ser biocompatível, o material deve apresentar teor de citotoxicidade nulo ou muito baixo, não registrando ação imunogênica (a menos que esta seja desejada), não deve ser mutagênico nem trombogênico. A bioatividade é avaliada pelas características química, física, físico-química, térmica e biológica, pela facilidade de manejo do material, pela possibilidade de esterilização, pela estabilidade ao ser estocado bem como pela taxa de degradação controlada e pela bioreabsorção (Vert, 2007).

As características fisiológicas do ambiente onde o material é implantado direcionam seu comportamento físico, químico e biológico ao longo do tempo. Em outras palavras, características como pH, presença de cátions e ânions, temperatura, e ainda polissacarídeos (como proteínas presente no plasma sanguíneo) e tecidos ao redor do implante, devem ser levadas em conta quando sugerida a aplicação de um novo artifício terapêutico, já que esses fatores influenciam diretamente a aceitação do material pelo organismo. Porém tais características são frequentemente negligenciadas pela literatura, provavelmente devido a sua grande complexidade. Tal negligência

muitas vezes impossibilita a comparação entre os materiais já bem sucedidos como implantes e os novos (Vert, 2007).

O grupo dos polímeros tem recebido cada vez mais atenção quando se trata de aplicações biomédicas. Tal fato se deve a suas características físico-químicas e a sua versatilidade estrutural, que permitem adequá-los, em termos de propriedades, para cada aplicação específica. Esse grupo comumente chamado de biopolímeros foi inicialmente composto por materiais que provocavam uma reação mínima com o tecido hospedeiro. Atualmente, os biopolímeros devem interagir com o organismo, no sentido de guiar a interação material-tecido, a fim de restabelecer a funcionalidade, a morfologia e a saúde dos tecidos tratados. A aplicação de polímeros como biomateriais para a engenharia de tecidos tem como exemplo o preenchimento de partes alveolares, as restaurações dentárias e a confecção de dispositivos para a liberação controlada de drogas (Oréfice *et al.*, 2006).

Na engenharia de tecidos, os biomateriais poliméricos são divididos em duas classes distintas, são elas (Atala, 2007):

1) Materiais de origem natural – Como exemplo, podem ser citados o colágeno, o alginato e o poli(3-hidroxibutirato) (PHB). O colágeno é a proteína mais abundante no corpo, podendo ser purificada tanto de seres humanos quanto de animais pelo tratamento com enzimas e extração com sal/ácido (Li, 1995). A sua reabsorção *in vivo* pode ser controlada tanto pela densidade do implante como pela extensão das ligações cruzadas. O espaço intersticial e o tamanho geralmente largo da infiltração celular levam o material a apresentar uma grande taxa de degradação (Atala, 2007). O PHB é um polímero natural produzido por bactérias como reserva energética, apresentando características biocompatíveis com diversos tipos celulares (Lenz e Marchessault, 2005).

2) Polímeros sintéticos – Esta classe inclui os α-hidroxi-ácidos sintéticos com as ligações ésteres passíveis de serem hidrolisadas, como, por exemplo: poli (ácido láctico) - PLA, policaprolactona - PCL, poli (ácido glicólico-co-láctico) - PGLA. São degradados por hidrólises não-enzimáticas, produzindo metabólitos não-tóxicos facilmente eliminados pelo organismo (Gilding, 1981). A taxa de degradação pode variar de algumas semanas até muitos anos, dependendo de fatores como cristalinidade, peso molecular inicial e, se for o caso, razão de cada monômero que compõe o copolímero final. Por serem termoplásticos, podem produzir arcabouços tridimensionais com controle da micro- e da macroestrutura e de suas dimensões (Atala, 2007).

Material de origem natural e matrizes acelulares apresentam grande vantagem no reconhecimento biológico. Porém, polímeros sintéticos são passíveis de serem reproduzidos em larga escala e com controle de propriedades como resistência, taxa de degradação e microestrutura (Atala, 2007).

2.3. Polihidroxialcanoatos

O grupo dos polihidroxialcanoatos, ou PHA, é formado por polímeros naturais sintetizados por variado conjunto de microorganismos como produto de reserva energética. O produto final é obtido na forma de grânulos insolúveis em água, que são estocados no citoplasma do microorganismo, em vacúolos internos. Bactérias como *Alcaligenes eutrophus, Azotobacter vinelandii, Escherichia coli*, dentre outras, iniciam a produção e estocagem do polímero quando esgotam todas as suas fontes de nutrientes necessários para a divisão celular e concomitantemente se encontram com excesso de carbono; o processo pode ser iniciado também quando sob condições limitantes dos níveis de nitrogênio, fosfato e/ou oxigênio (Sudesh *et al.*, 2000).

Os PHAs são poliésteres alifáticos com unidades monoméricas de (R)-3HA (Figura 2.1). Por ação da enzima PHA sintase, no que se refere à estereoespecificidade, todos ácidos 3-hidroxialcanoatos, obtém-se a configuração R, exceto em um caso raro ,onde uma pequena porção de monômeros na configuração S é encontrada (Sudesh *et al.*, 2000), como ilustrado na Figura 2.1:

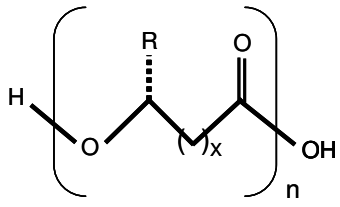


Figura 2.1- Estrutura molecular genérica do monômero dos polihidroxialcanoatos, PHAs.

O tamanho da cadeia de um polihidroxialcanoato pode variar muito, apresentando repetições do monômero de 100 até centenas de vezes (n>100). A quantidade de grupos CH_2 presentes na cadeia do monômero também tem diversidade, sendo mais comum ter apenas um grupo (x = 1, 2 ou 3). O grupamento R é variável a

depender do polímero produzido. Características como hidrofobicidade, temperatura de transição vítrea (Tg), temperatura de fusão (Tm) e grau de cristalinidade são diretamente afetados por mudanças da natureza do grupamento R e da quantidade de grupos metila presentes na cadeia do polímero (x) (Chen & Wu, 2005).

O ponto de fusão dos polihidoxialcanoatos varia numa faixa de 40 a 180 ºC, o grau de cristalinidade é de aproximadamente 50% e o peso molecular é alto (>100.000, [η]>3dl/g), apresentando estreita polidispersão. Porém esse valor pode sofrer grande variação, de acordo com a fonte de carbono utilizada para a síntese ou quando o ambiente onde se encontra o microorganismo sofre alteração de pH. Recentes pesquisas mostraram a diminuição do peso molecular quando há aumento da atividade da enzima PHA sintase (Sudesh *et al.*, 2000).

As propriedades físicas e mecânicas sofrem grande variação, dependendo do comprimento e da organização da cadeia do polímero estudado, que pode apresentar desde características termoplásticas até elastoméricas (Williams *et al.*, 1999). De uma maneira geral, esses polímeros podem ser divididos em dois grandes grupos, tal como (Williams *et al.*, 1999; Naik *et al.*, 2008):

1) PHAs de cadeia lateral curta - Constituído por polímeros que contêm de 3-5 átomos de carbono e se apresentam com maior grau de cristalinidade;

2) PHAs de cadeia lateral média - Registram variação de 6-14 átomos de carbono. Têm menor temperatura de transição vítrea, menor grau de cristalinidade e comportamento elastomérico (Lenz e Marchessault, 2005).

Dependendo das condições cinética e termodinâmica de polimerização às quais foram submetidos os compostos, da quantidade e disposição dos grupamentos laterais das cadeias poliméricas e dos processos que sofreram após polimerização, um mesmo PHA pode apresentar diferentes propriedades físicas (Williams *et al.*, 1999; Sudesh *et al.*, 2000). *In vivo*, as cadeias do poli(3-hidroxibutirato) (PHB), um polímero membro da família dos PHAs, não conseguem se organizar de forma cristalina. Sugere-se que a água presente nas inclusões nascentes de PHB (5-10%) forme ligações de hidrogênio com os grupos carbonila do esqueleto polimérico, originando pseudo-reticulações entre as cadeias de PHB, o que impediria a sua cristalização (Sudesh *et al.*, 2000).

Os polihidroxialcanoatos são, geralmente, biodegradáveis e biocompatíveis, o que atrai muita atenção da engenharia de materiais para a sua aplicação como biomaterial. Porém, somente alguns PHAs, como poli(3-hidroxibutirato) (PHB), copolímero de 3-hidoxibutirato e 3-hidroxivalerato (PHBV), poli(4-hidroxibutirato)

(P4HB), copolímero de 3-hidoxibutirato e 3-hidroxihexanoato (PHBHHx) e poli(3-hidroxioctanoato) (PHO), estão disponíveis em quantidade suficiente para serem aplicados à pesquisa (Chen e Wu, 2005), sendo que apenas o PHB e o PHBV são produzidos comercialmente.

Os PHAs podem ser recuperados e purificados do citoplasma dos microorganismos, onde são produzidos por técnica de fermentação, por tratamentos que envolvem aquecimento e destruição das células, seguidos de tratamentos químico e enzimático. Contudo, os custos desses processos ainda são muito altos, o que limita a utilização dos polihidroxialcanoatos em escala comercial (Naik *et al.*, 2008).

2.3.1. Poli(3-hidroxibutirato)

Membro da família dos polihidroxialcanoatos, o poli(3-hidroxibutirato), ou PHB, é um poliéster natural produzido em grande escala por microorganismos (Sudesh *et al.*, 2000). É capaz de desempenhar muito bem sua função como material de reserva energética, por apresentar características como: ser insolúvel em água, ser inerte química e osmoticamente e possuir total capacidade de conversão em ácido 3-hidroxibutírico e, posteriormente, em ácido acético, por uma série de reações enzimáticas do citoplasma bacteriano (Lenz e Marchessault, 2005).

O monômero da cadeia do PHB é o (R)-3-hidroxibutirato ((R)-3HB) (Figura 2.2) e sua estrutura isotática apresenta somente configuração do tipo R (Lenz e Marchessault, 2005):

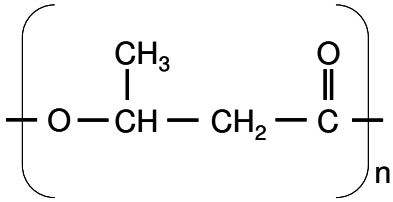


Figura 2.2- Estrutura molecular do monômero do poli(3-hidroxibutirato), PHB.

O PHB é biocompatível com uma grande diversidade de grupos celulares, o que lhe confere um grande potencial de aplicação na regeneração de tecidos como pele, osso, cartilagem, bexiga e veias sanguíneas de pequeno diâmetro (Griffith, 2000). É um material biodegradável e bioreabsorvível, porém na sua interface de reação com o tecido

apresenta pouquíssimos grupamentos (limitados somente às regiões de terminação de cadeia) que induzam a adesão, proliferação e diferenciação celular. Assim, a interface do PHB que fica em contato direto com o material celular vem sendo amplamente estudada, a fim de se tornar passível de reconhecimento celular, por inclusão de moléculas bioativas. As características que colocam o PHB na condição de biomaterial promissor para a engenharia de tecidos são (Seal *et al.*, 2001; Lenz e Marchessault, 2005):

1) Biocompatibilidade;

2) Estrutura tridimensional capaz de suportar o peso das células, permitindo a remodelação com o crescimento do tecido;

3) Taxa de degradação lenta, controlada pelo crescimento celular/tecidual;

4) Bioreabsorção, com liberação de produtos de degradação não-tóxicos incorporados nos processos metabólicos celulares.

Além das características biocompatíveis e bioreabsorvíveis, o PHB se apresenta totalmente não-tóxico para células como fibroblástos, condrócitos, osteoblastos, e células de região gastrointestinal de ratos. A não-toxicidade pode ser evidenciada pela sua decomposição em um constituinte do sangue humano, o ácido D-3-hidroxibutírico (Misra *et al*., 2006).

O PHB apresenta características de um material plástico duro e quebradiço. A sua cristalização forma grandes estruturas esferulíticas por lento processo (Lenz e Marchessault, 2005). A cinética de cristalização apresenta maior velocidade em temperaturas em torno de 90ºC, no entanto, o máximo de cristalização é alcançado em temperatura em torno de 50-60ºC (Sudesh *et al.*, 2000). O PHB pode atingir grau de cristalinidade de 55 a 80%, quando produzido sob condições específicas de controle do peso molecular, da evaporação do solvente e da temperatura de cristalização (Sudesh et al., 2000). As diversas propriedades do PHB estão listadas na Tabela 2.1, em que pode ser observada grande variação de valores. Essa variação pode ser atribuída a fatores como a diferença na produção pelo microorganismo ou a diferença nas técnicas de extração e nos métodos de preparação da amostra (Misra *et al.*, 2006):

Tabela 2.1- Propriedades do poli(3-hidroxibutirato) – PHB

Propriedades	Valores	
	Literatura [(1)]	**Utilizado no trabalho** [(2)]
Temperatura de fusão – T_m (ºC)	160 – 177	170-175
Temperatura de transição vítrea – T_g (ºC)	-4 – 15	-
Peso molecular – M_w (g/mol)	$1 \times 10^4 – 3 \times 10^6$	$5{,}24 \times 10^5$
Módulo de elasticidade (GPa)	1,1 – 3,5	2,84
Resistência à tração (MPa)	15 – 40	31
Alongamento da ruptura (%)	1 – 6	2,2
Índice de polidispersão	1,9 – 2,1	-
Densidade (g/cm^3)	Cristalino: 1,26 Amorfo: 1,18	1,23
Ângulo de contato (º)	66	-
Período de degradação	> 52 semanas	-

(1) Misra *et al*., 2006; Sudesh *et al.*, 2000.

(2) Ficha técnica fornecida pelo fabricante. PHB Industrial S/A.

2.3.2. Biodegradação

Diferente do processo de degradação, no qual a clivagem da cadeia polimérica é dada por reações químicas, como hidrólise e oxidação, a biodegradação é realizada por um mediador biológico (Vert, 2007). Segundo Vert *et al.* (2007), os produtos e subprodutos gerados pela quebra da macromolécula por parte de elementos biológicos não precisam ser, necessariamente, eliminados pelo organismo.

De forma geral, a biodegradação de um poli(α-hidroxi ácido) inicia-se com a hidrólise das ligações ésteres quando o arcabouço de poli(α-hidroxi ácido) entra em contato com moléculas de água do fluido corporal, sendo seguida por reações biologicamente ativadas por enzimas. Trata-se de um processo inicialmente homogêneo, com produção de oligômeros e exposição de terminais ácidos, produzidos na reação de hidrólise, que catalisa a reação (efeito auto-catalítico) (Barbanti *et al.*, 2005). Ao longo do processo, os produtos se difundem para o interior do arcabouço, produzindo acúmulo de ácidos devido à baixa taxa de difusão na região. Assim, a taxa de degradação no

centro do arcabouço fica maior do que a da superfície, mostrando constituir um processo heterogêneo (Barbanti *et al.*, 2005).

Freier *et al.* (2002) estudaram a degradação *in vitro* de filmes de PHB em solução tampão fosfato com pH 7,4 e temperatura de 37°C. Foi observada contínua diminuição do peso molecular com leve aceleração após 80 dias. Essa aceleração após 80 dias se deveu ao efeito auto-catalítico, explicado no parágrafo anterior. Os autores desse trabalho concluíram que a meia vida do PHB a 37ºC foi de 56 semanas, ou seja, aproximadamente 1 ano. Quando a degradação é avaliada *in vivo,* deve ser levada em consideração a participação de enzimas no processo de hidrólise do PHB. Assim, para cada diferente região no organismo onde material será implantando, há distinto tempo de degradação. No trabalho de Freier *et al.* (2002), o material à base de PHB foi implantado no sistema gastrointestinal de ratos e degradado completamente após 26 semanas.

Diversos fatores relacionados tanto com a composição polimérica quanto com as características do ambiente podem afetar a biodegradação, alguns deles são: o local do implante, a solicitação mecânica, o pH e a temperatura do ambiente, o peso molecular e sua distribuição, a composição química do material, o grau de cristalinidade e características morfológicas, como tamanho do suporte, porosidade, relevo e carga de superfície (Middleton e Tipton, 2000). O efeito provocado pela localização do implante, por exemplo, está relacionado ao aporte vascular presente no local e à solicitação mecânica, que são considerados como aceleradores de degradação (Hollinger e Battistone, 1996). O método utilizado para a esterilização também deve ser considerado como fator de alteração da taxa de degradação em polímeros, podendo comprometer a estrutura e as propriedades físicas do biomateial (Dee *et al.*, 2002).

2.4. Proteínas

As proteínas são muito utilizadas na engenharia de tecidos ligadas à superfície dos biomateriais, com o intuito de orientar ou organizar a adesão celular na interface células-biomaterial e promover os processos de migração, diferenciação e crescimento celular/tecidual.

Detentoras de grande número de funções no organismo, as proteínas são responsáveis por praticamente todas as funções, como manutenção estrutural, transporte

e reconhecimento de sinais, reações enzimáticas e seleção das moléculas que atravessam a membrana plasmática (Alberts *et al.*, 2010). As características funcionais, a especificidade e a seletividade das proteínas são definidas por sua estrutura tridimensional (Oréfice *et al.*, 2006), decorrente da sua estrutura primária.

Proteínas são macromoléculas formadas por sequências de aminoácidos. Os aminoácidos podem se apresentar de diversas formas, porém todos possuem um grupo carboxílico (-COOH) e um grupo amino (-NH_2), ligados a um carbono α central. Ainda ligados ao carbono α estão um átomo de hidrogênio (-H) e uma cadeia lateral variável (-R). Essa cadeia lateral que será responsável pela variedade química dos aminoácidos (Figura 2.3) (Alberts *et al.*, 2010):

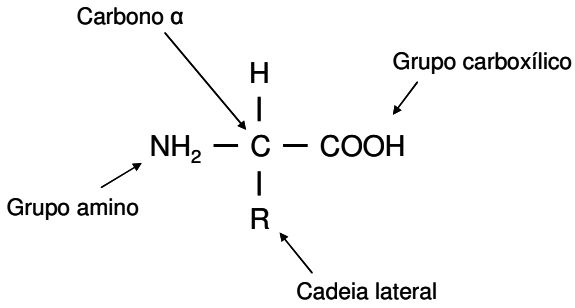


Figura 2.3- Estrutura geral de um aminoácido.

A cadeia lateral de cada aminoácido é responsável pela determinação de características como polaridade e hidrofobicidade, cargas positiva e cargas negativas. São, no total, 20 diferentes aminoácidos divididos entre polares e apolares, com os polares agrupados em: aminoácidos de carga negativa, carga positiva e não-carregados (Alberts *et al.*, 2010). As diferentes combinações desses 20 aminoácidos possibilitam a formação de diversas proteínas, como ilustrado na Figura 2.4.:

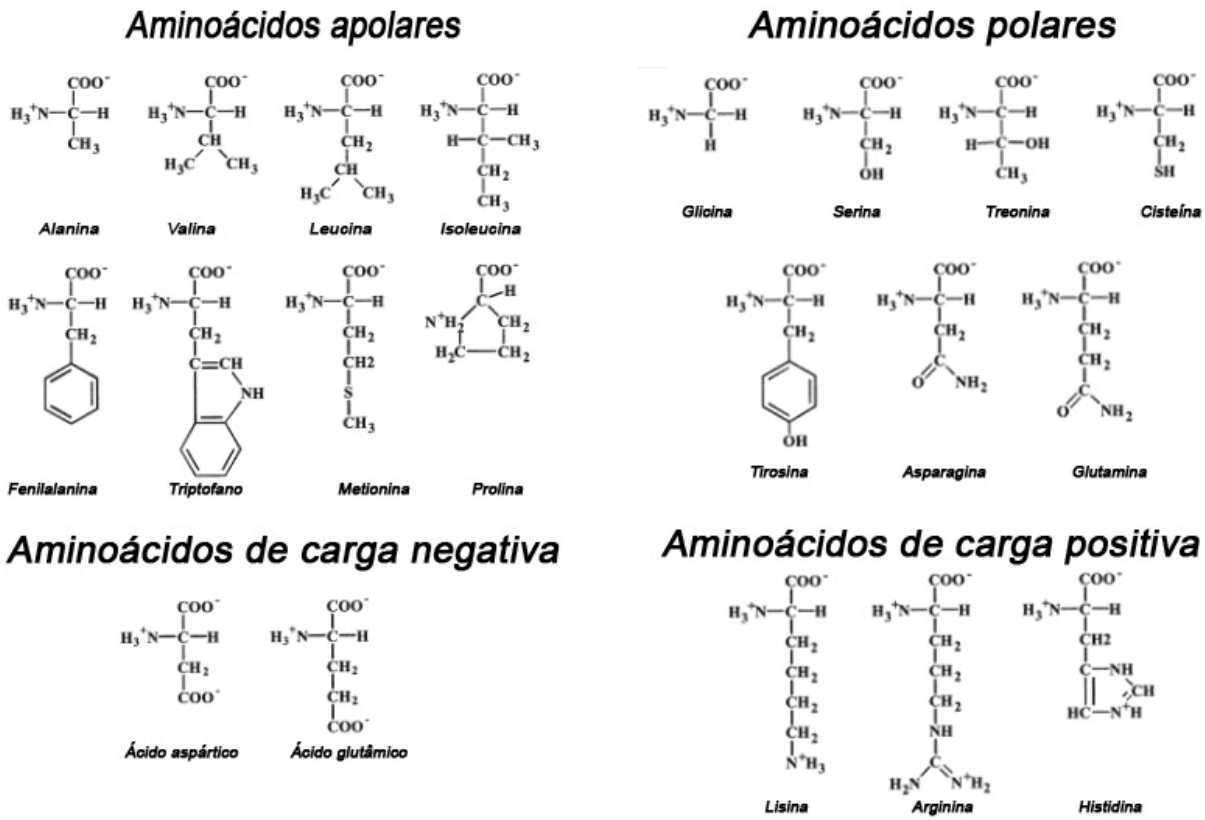


Figura 2.4- Fórmulas químicas dos 20 diferentes aminoácidos (Adaptado de Dee *et al.*, 2002).

Tais aminoácidos se unem uns aos outros por ligações peptídicas covalentes (Figura 2.5), formando a extensa cadeia que compõe a proteína. Ligações peptídicas nada mais são do que reações de condensação que acontecem entre o grupo carboxílico de um aminoácido e o grupo amino de seu vizinho, com a liberação de uma molécula de água. A sequência de muitos aminoácidos ligados uns aos outros recebe o nome de *cadeia polipeptídica* e é a estrutura primária da proteína.

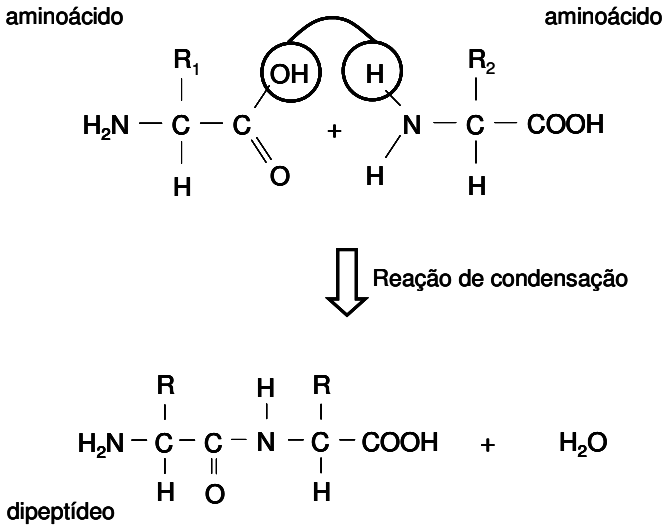


Figura 2.5- Esquema de ligação peptídica por reação de condensação entre dois aminoácidos.

De outra parte, as proteínas não existem como simples cadeias estendidas. As interações do tipo ligações de hidrogênio, que ocorrem entre os aminoácidos da cadeia polipeptídica, formam dobraduras, curvas e espirais para originar a estrutura tridimensional específica das cadeias, ou seja, sua conformação. Essas são as estruturas secundárias das proteínas, responsáveis por determinar sua bioatividade (Dee *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2010). A localização de cada aminoácido na cadeia polipeptídica influencia diretamente a conformação da proteína. As conformações a α-hélice e a folha β-pregueada (Alberts *et al.*, 2010) são termodinamicamente mais estáveis. A conformação α-hélice é dada pelo processo de enovelamento de uma única cadeia polipeptídica sobre si mesma, formando um cilindro, pela ligação de hidrogênio entre o N-H de uma ligação peptídica e o C=O de outra ligação peptídica localizada a quatro aminoácidos de distância. A conformação β-pregueada pode ser formada por duas orientações diferentes: na primeira, é formada por cadeias polipeptídicas paralelas com a mesma direção; na segunda, é formada por cadeias apresentando orientações resultantes do processo de enovelamento com movimentos de idas e vindas da cadeia sobre si mesma (antiparalelas). Tal conformação também é mantida por ligações de hidrogênio entre grupos N-H e C=O das ligações peptídias.

As estruturas terciárias são formadas por ligações entre regiões distantes da cadeia polipeptídica, que se tornam possíveis por dobraduras na estrutura secundária. As ligações que levam a essa conformação podem ser de quatro tipos (Dee *et al.*, 2002):

1) Ligação de hidrogênio - entre aminoácidos polares, como serina e tirosina, e um outro aminoácido da cadeia.

2) Ligação covalente - do tipo ponte disulfeto entre resíduos de cisteína.

3) Interação iônica - entre cadeias laterais carregadas negativa (como os ácidos aspártico e glutâmico) e positivamente (como lisina e arginina).

4) Interação hidrofóbica - entre aminoácidos não-polares (como valina e leucina) que, devido à falta de interação das sua cadeias laterais com a água, são forçados a permanecerem juntos.

As proteínas possuem sítios de ligação, que são regiões capazes de reconhecer a superfície de outras moléculas e interagir com estas por um conjunto variado de ligações (Alberts *et al.*, 2010). Assim, uma cadeia polipeptídica pode interagir com outras cadeias polipeptídicas, formando uma proteína de estrutura maior (proteína multimérica), mais complexa e de geometria precisamente definida (Alberts *et al.*, 2010). Essas cadeias podem ser idênticas ou não e podem se apresentar com estruturas diferentes entre si (primária, secundária ou terciária) (Dee *et al.*, 2002). Tais interações formam a estrutura quaternária da proteína.

Algumas proteínas são dispostas na face externa da membrana citoplasmática ou secretadas como constituintes da matriz extracelular, apresentando importante papel no reconhecimento celular e no crescimento tecidual. Trata-se de proteínas estabilizadas por ligações covalentes a fim de se tornarem mais resistentes para suportar as condições extracelulares. As ligações de reforço acontecem entre os aminoácidos da cadeia polipeptídica ou entre as diferentes cadeias de uma proteína multimérica (Alberts *et al.*, 2010). Alguns exemplos dessas proteínas de matriz extracelular são o colágeno, a fibronectina, o fibrinogênio e a elastina.

Duas classes de proteínas têm sido utilizadas para a imobilização sobre a superfície de biomateriais (Ma *et al.*, 2007). Na primeira classe, estão as proteínas adesivas derivadas da matriz extracelular. Essas proteínas são capazes de promover e melhorar a adesão celular via interação com o agente acoplador e possuem a sequência de tripeptídeos conhecida como RGD (arginina - glicina - ácido aspártico), que promove o reconhecimento entre as referidas proteínas e as superfícies celulares. A segunda classe é formada pelas proteínas que são fatores de crescimento. Quando imobilizadas sobre superfícies de biomateriais, tal classe de proteínas é capaz de controlar os processos de proliferação e diferenciação celular. Os fatores de crescimento, tanto na forma imobilizada quanto na solubilizada, podem, por exemplo, estimular a síntese de DNA em hepatócitos. Nessa classe também estão presentes as proteínas ósseas

morfogênicas, que têm sido imobilizadas na superfície de biomateriais a fim de induzir a diferenciação das células ósseas.

2.4.1. Fibronectina

A fibronectina é uma proteína adesiva e não-colagenosa que pode ser encontrada na sua forma insolúvel compondo a matriz extracelular, ou na sua forma solúvel quando presente no plasma e em outros fluidos corporais. Estrutura-se por duas subunidades ligadas por duas pontes disulfeto próximas às terminações carboxílicas, apresentando, cada subunidade, um peso molecular de aproximadamente 220.000 Da (Dee *et al.*, 2002). Nas subunidades da fibronectina, estão presentes as sequências do tripeptídeo RGD (R=Arginina, G=Glicina e D=Ácido aspártico). Essas sequências são sítios de reconhecimento para as integrinas (proteínas receptores da superfície celular), permitindo a ligação direta entre a célula e a matriz extracelular (Ma *et al.*, 2007; Morra, 2006). A fibronectina é uma proteína que participa de muitos processos biológicos por apresentar sítios de interação para diversas moléculas (Figura 2.6).

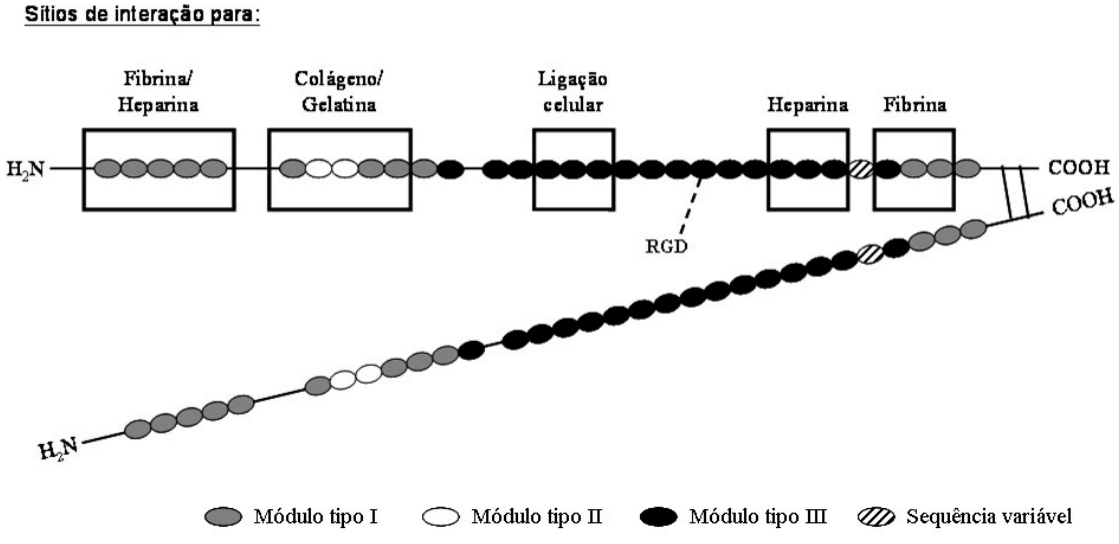


Figura 2.6- Estrutura da fibronectina plasmática com seus sítios de interação.
(adaptado de Dee *et al.*, 2002).

A fibronectina é formada predominantemente por três diferentes módulos, arranjados de forma sequencial e repetidos ao longo da cadeia principal. A estrutura secundária da região com predominância do módulo tipo III consiste em duas folhas β-pregueadas contendo as cadeias β antiparalelas ABE e DCFG (Figura 2.7). Essas se sobrepõem para formação do sanduíche de folhas β. A sequência RGD está localizada no looping que conecta as sequências F e G (Krammer *et al.*, 1999):

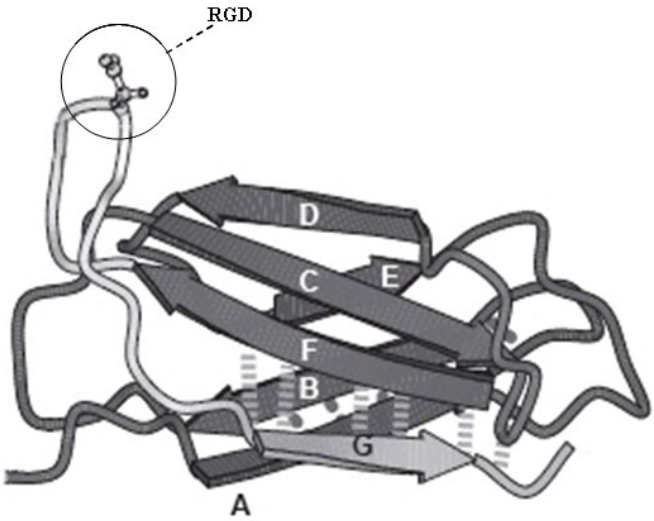


Figura 2.7- Estrutura tridimensional da região de domínio do módulo tipo III da fibronectina (adaptado de Krammer *et al.*, 1999)

A fibronectina participa de diversos processos fisiológicos, como a cicatrização, guiando a adesão, a migração, a diferenciação e o crescimento celular/tecidual (Vallières *et al.*, 2007). Estudos que utilizaram fibroblastos crescendo em suportes recobertos por fibronectina mostraram que um bom espraiamento celular é alcançado com uma concentração protéica acima de 100fmol/cm^2 (Shin *et al.*, 2003).

2.4.2. Interação proteína-superfície

Muitos trabalhos avaliam a imobilização de proteínas em superfícies de biomaterias. Tal interação pode ser de natureza eletrostática ou covalente, sendo a primeira mais estudada por ser um processo rápido, simples e que tem fornecido bons resultados em termos quantitativos. Contudo, a imobilização de proteínas de forma

específica, expondo os seus sítios de reconhecimento para a ligação celular e mantendo a sua bioatividade, ainda é um desafio. A imobilização covalente é mais complexa do que a adsorção física, mas apresenta a grande vantagem de produzir uma interface proteína-biomaterial controlável e estável.

Zhang *et al.* (2007) mostraram que a fibronectina, quando ligada covalentemente, é forçada a se desenovelar sobre o substrato, expondo seus aminoácidos negativos e formando uma nova camada para adsorção de novas moléculas de proteína. Assim, o processo de ligação covalente levaria à formação de uma superfície protéica de multicamadas, enquanto o processo de adsorção tem sua saturação no limite da formação da monocamada.

Vallières *et al.* (2007) mostraram que a modificação do ligante utilizado para ligação covalente da fibronectina com o substrato pode alterar a sua conformação. Os autores utilizaram ligantes para resíduos de lisina e de cisteína. Sabendo que a distribuição desses ligantes na molécula de proteína é diferenciada, a quantidade e a localização dos resíduos determinaram a conformação e a orientação da proteína sobre o substrato.

Tanto propriedades da proteína quanto as propriedades da superfície do biomaterial influenciam o processo de interação que ocorre na interface célula-biomaterial. As propriedades da proteína que atuam nos fenômenos da interface estão, em sua maioria, relacionadas à estrutura primária, ou seja, à sequência de aminoácidos. Alguns exemplos são (Dee *et al.*, 2002):

- O tamanho das cadeias - cadeias polipeptídicas maiores possuem mais sítios de ligação que podem entrar em contato com a superfície do que as cadeias menores.
- A distribuição de cargas - as carga presente nos aminoácidos e a distribuição destas ao longo da proteína influenciam na relação proteína-superfície, através de processos de atração e repulsão. Os melhores resultados de atividade superficial protéica são obtidos quando a proteína é trabalhada no seu ponto isoelétrico (pH onde a proteína exibe carga global zero).
- A conformação - um melhor resultado de atividade superficial é alcançado quando a proteína não está em sua forma estável. A proteína desestabilizada é menos solúvel, precipitando sobre a superfície com um formato fibroso, o que lhe permite alcançar a extensão ideal da cadeia e expor regiões internas para a interação.

Algumas das propriedades relacionadas à superfície do material que irão alterar a interação na interface são (Dee *et al.*, 2002):

- Topografia - uma superfície com maior rugosidade apresenta maior área para interação com a proteína.
- Composição química - dependendo do grupamento exposto na superfície do material, a proteína (ou parte dela) poderá, ou não, apresentar afinidade.
- Heterogeneidade - numa análise microscópica, os materiais que apresentam domínios variados (não homogêneos) possuem maiores chances de interagir com a proteína.

Como já mencionado, as proteínas são estruturas macromoleculares de cadeias flexíveis com conformações específicas. A partir da ligação da proteína à superfície, há alteração na conformação original, porém parte de suas bioatividade é mantida. Por exemplo: quando se trata de enzima adsorvida, é mantida a sua propriedade catalítica; quando é um anticorpo, é mantida a sua habilidade de se ligar a antígenos. De todo modo, as propriedades mantidas sofrem redução no nível de atividade (Dee *et al.*, 2002).

2.5. Modificação de superfície

Os processos de adesão, proliferação, migração e diferenciação celular ocorrem na superfície do material. Sendo assim, o comportamento de um biomaterial é basicamente controlado pela estrutura e composição da sua superfície, que faz interface célula-biomaterial e que entra em contato com o tecido vivo, resultando na sua aceitação ou rejeição por parte do organismo (Oréfice *et al.*, 2006).

Dessa forma, o arcabouço desenvolvido para a utilização na engenharia de tecidos deve possuir, além de biocompatibilidade e biodegradabilidade, uma superfície que permita o reconhecimento para adesão celular e posterior crescimento tecidual (Williams *et al.*, 1999).

Os processos de reconhecimento celular (adesão, migração e diferenciação) ao biomaterial estão relacionados à densidade de biomoléculas na superfície do material (biomimetização) e à natureza hidrofóbica/hidrofílica do material (Shin *et al.*, 2003).

A alta densidade e a orientação de peptídeos na superfície de um biomaterial levam à melhora na adesão celular, pois têm muitos sítios de ligação para os receptores celulares. Em contrapartida, essa alta densidade dificulta, podendo até impedir, a migração e a proliferação celular (Shin *et al.*, 2003).

Tendo em vista as possíveis alterações de conformação impostas à proteína quando adsorvida sobre superfícies hidrofóbicas ou muito hidrofílicas e visando à diminuição deste impacto sobre o processo de adsorção, o ideal é que as superfícies apresentem molhabilidade moderada, a fim de preservar a conformação da proteína, mantendo a sua biaoativdade e permitindo a adesão celular (Horbett *et al.*, 1985; Ma *et al.*, 2007). A molhabilidade do material é determinada por medidas de ângulo de contato entre uma gota líquida e a superfície horizontal que se deseja caracterizar. Quando esse ângulo de contato estiver acima de 90º, a superfície não molha, ou seja, é hidrofóbica; de outra parte, quando o ângulo medido estiver abaixo de 90º, a superfície molha, é hidrofílica. As células apresentam valor ideal de ângulo de contato para adesão na superfície, que em geral gira em torno de 40-60º (Arima e Iwata, 2007), podendo, por vez, registrar valores mais específicos, a depender do tipo celular e do material trabalhado.

Tomando como exemplo o processo de osseointegração, as propriedades físicas e químicas das superfícies têm influência direta, uma vez que a resposta celular depende da topografia (necessitando de um mínimo de rugosidade), da energia de superfície e das cargas presentes. Nesse caso, o tratamento de superfície tem como objetivos: reduzir o tempo de carregamento após a cirurgia, acelerar o crescimento e a maturação óssea para permitir o carregamento imediato, aumentar a estabilidade primária, garantir o sucesso dos implantes quando instalados em regiões muito avariadas que apresentam menor quantidade de tecido, obter o crescimento ósseo diretamente na superfície do implante, obter maior área possível de osseointegração, obter contato osso-implante sem a interposição de camadas protéicas amorfas, atrair células osteoprogenitoras e atrair proteínas de ligação específicas para células osteogênicas (fibronectina) (Brandão *et.al.*, 2010)

Segundo Oréfice *et al.* (2006), os métodos de modificação de superfícies são classificados em três grandes grupos: métodos físico-químicos, métodos de recobrimento e métodos biológicos, que serão descritos de forma mais detalhada a seguir.

2.5.1. Métodos físico-químicos

Trata-se da mais abrangente das técnicas de modificação de superfície, em que são imobilizados grupos químicos na superfície do biomaterial. Processos de modificação como alquilação, silanização, ativação por radiofreqüência, hidrólise e bombardeamento iônico podem ser efetivamente utilizados para a obtenção de novos grupos químicos na superfície dos biomateriais (Oréfice *et al.*, 2006). Tais grupos, assim como carboxílicos, hidroxílicos, nitrogenados, etc., podem funcionar como sinalizadores diretos para a adesão celular no processo de cultura *in vitro* ou como sítios ativos para a imobilização de biomoléculas.

O tratamento de superfícies de PHAs por plasma gasoso de amônia foi descrito por Williams *et al.* (1999). A técnica possibilitou a introdução estável de até 8% de nitrogênio na superfície do biomaterial. Essa modificação acarretou o aumento da molhabilidade da superfície (maior hidrofilicidade), caracterizada pela queda nas medições do ângulo de contato após o tratamento, o que possibilitou melhor interação entre as superfícies modificadas e biomoléculas ativas, induzindo maior adesão celular e crescimento tecidual.

Ma *et al.* (2007) utilizaram a técnica de fotooxidação a fim de aumentar a hidrofilicidade de superfícies poliméricas. A reação ocorre pela imersão do material polimérico em solução de peróxido de hidrogênio e posterior exposição à radiação ultravioleta. A radiação estimulou a desintegração do peróxido de hidrogênio e a introdução de grupamentos –COOH na superfície. A introdução de grupamentos promoveu uma pequena degradação da superfície e uma melhora na taxa de adesão celular.

Kai *et al.* (2003) fizeram uso de tratamentos com enzimas lipases que agem de forma específica na quebra das ligações ésteres das cadeia de poliésteres, como PHB e PLA. O tratamento produziu mudanças nas propriedades físicas e na estrutura química da superfície dos filmes de PHB, aumentando a hidrofilicidade pela exposição de grupamentos hidroxílicos (-OH) e carboxílicos (-COOH), oriundos da hidrólise das ligações ésteres. A avaliação do material em culturas *in vitro* com condrócitos de coelhos comprovou o aumento da biocompatibilidade desses poliésteres, proporcionando grande aumento na adesão celular em suas superfícies.

Thiré *et al.* (2006) estudaram o efeito da hidrólise na biocompatibilidade de filmes de PHB. O tratamento foi conduzido por dois diferentes tempos: 45 e 90

minutos. Nos dois tempos foi detectado aumento da hidrofilicidade e da rugosidade das superfícies tratadas. Testes *in vitro* com cultura de osteoblastos mostraram que o tratamento promoveu a melhoria da resposta celular de adesão e espraiamento nas amostras hidrolisadas. Considerando que entre as superfícies hidrolisadas por 45 e 90 minutos não houve grande diferença no que diz respeito à resposta celular e que com o tratamento de 90 minuto o efeito de degradação foi muito grande, os autores classificaram o tempo de hidrólise de 45 minutos como ideal.

2.5.2. Métodos de recobrimento

Existem diversos métodos que podem ser utilizados para a deposição de recobrimento ou filmes finos sobre superfícies. As técnicas de deposição física de vapor (PVD) e deposição química de vapor (CVD) são as quem mais se destacam em termos de importância científica e tecnológica. Ambas as técnicas requerem elevados investimentos e ainda não possuem controle eficaz, em escala atômica e molecular, das dimensões do recobrimento (Oréfice *et al.*, 2006).

Outras técnicas possíveis de serem aplicadas utilizam a via aquosa pela imersão do material em solução que contenha a molécula de interesse. Assim, quando há evaporação do solvente, é formada uma monocamada por toda a superfície do material. Para a produção de um composto com multicamadas ,são feitas múltiplas imersões do material no solvente contendo as moléculas solubilizadas (Oréfice *et al.*, 2006).

A odontologia faz grande uso da técnica de recobrimento de implantes metálicos com hidroxiapatita. A hidroxiapatita é um componente mineral, naturalmente presente no tecido ósseo. Nesse processo de bioengenharia, é utilizada a hidroxiapatita sintética, que possui propriedades semelhantes à hidroxiapatita natural, a fim de aumentar a biocompatibilidade e a osseointegração do implante (Vercik *et al.*, 2003).

2.5.3. Métodos biológicos

Tais métodos visam à incorporação de biomoléculas, geralmente macromoléculas, na superfície do arcabouço polimérico, a fim de promover o reconhecimento da superfície pelas células semeadas, proporcionando maior adesão

com posteriores proliferação, migração e diferenciação. As macromoléculas mais utilizadas são das classes das proteínas, lipídios, carboidratos, ácidos nucléicos e compósitos moleculares (lipoproteínas, glicoproteínas) (Oréfice *et al.*, 2006).

Pesquisas recentes apontam a biomimetização como sendo um passo importante na otimização da adesão celular. Tendo por base as diversas pesquisas que mostram as proteínas da matriz extracelular atuando como sítios para a adesão das integrinas celulares e posteriores etapas de migração, crescimento e diferenciação, o processo de biomimetização se baseia na imobilização de biomoléculas na superfície do material a fim de reproduzir a matriz extracelular (Yang *et al.,* 2003; Ma *et al.,* 2007). Alguns processos que caracterizam a biomimetização são: modificação química de grupos funcionais, adição de carga à superfície e alterações da molhabilidade (hidrofilicidade/hidrofobicidade) (Williams *et al.,* 1999). Desde proteínas de cadeia longa da matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina e laminina, até pequenas sequências de peptídeos, como RGD (Arg-Gly-Asp), podem ser utilizadas de forma eficiente na modificação de superfície (Shin *et al.*, 2003). A ligação desses grupos à matriz polimérica pode ocorrer de forma covalente ou não-covalente (adsorção física) (Williams *et al.,* 1999).

Para a confecção de um material biomimetizado, devem ser consideradas características como a afinidade da ligação entre o ligante presente no biomaterial e o receptor a ser inserido (Schense e Hubbell, 2000), a densidade de ligações presentes no ligante (Palecek *et al.*, 1997) e a sua distribuição espacial (Massia e Hubbell, 1991).

Dependendo da natureza das forças envolvidas na interação macromolécula-substrato e da aplicação projetada para o sistema, o processo de imobilização de biomoléculas em superfície poliméricas pode ser permanente ou temporário. De maneira geral, existem três possíveis métodos para a imobilização de biomoléculas na superfície dos materiais: adsorção física, imobilização por aprisionamento, ligação covalente. (Yang *et al.,* 2003).

1) Adsorção Física - Promovida por uma ligação fraca e temporária entre a biomolécula e o substrato, geralmente forças de Van der Waals ou eletrostáticas (Figura 2.8) (Yang *et al.,* 2003; Oréfice *et al.*, 2006).

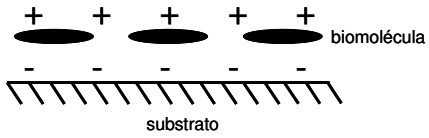


Figura 2.8- Esquema de ligação biomolécula-substrato por atração eletrostática. (Adaptação de Oréfice *et al.*, 2006)

Williams *et al.* (1999), por exemplo, fizeram uso de tratamentos por alteração de pH a fim de modificar a superfície de PHAs. O tratamento tinha por objetivo a liberação de grupamentos ácidos ou de espécies carregadas que tivessem a capacidade de promover a adesão e proliferação celular por diferença de cargas. Bissona *et al.* (2002) conseguiram adsorver moléculas de colágeno na superfície de filme de poli(tereftalato de etileno) (PET). As superfícies dos filmes de PET foram inicialmente ligadas à poli(ácido acrilato) para produção de cargas negativas. Quando recobertas por uma camada de colágeno, as cargas negativas das superfícies poliméricas reagiram com as cargas positivas das moléculas de colágeno via interação eletrostática.

O tratamento com plasma de amônia desenvolvido por Yang *et al.* (2002) conseguiu aumentar a hidrofilicidade de superficies de PLA, permitindo a adsorção de uma camada de colágeno.

Através de processos de aminólise, Thiré *et al.* (2007) conseguiram reagir grupamentos amino da etilenodiamina com grupamentos ésteres do PHB, expondo grupos -CONH e/ou -CONH2 nas superfícies tratadas. Avaliações da biocompatibilidade do tratamento por culturas *in vitro* mostraram maior adesão e espraiamento de condrócitos humanos nas superfícies de filmes de PHB modificadas.

Mendonça (2008) realizou tratamentos prévios nas superfícies de arcabouços de PHB a fim de adsorver fibronectina. Utilizou os processos de aminólise com etilenodiamina e recobrimento com quitosana para posterior adsorção de fibronectina. O tratamento acarretou aumento na biocompatibilidade dessas superfícies com células ósseas humanas.

2) Aprisionamento - Imobiliza as macromoléculas pela retenção destas em barreiras físicas, como hidrogéis e encapsulamento por fibras ou em suportes sólidos. Pode ser de caráter permanente ou temporário, dependendo de cada sistema (Figura 2.9) (Yang *et al.,* 2003; Oréfice *et al.*, 2006).

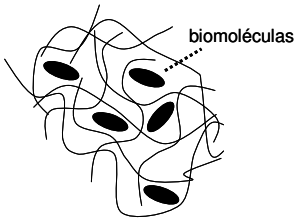


Figura 2.9- Esquema de aprisionamento da biomolécula em rede de géis.
(Adaptação de Oréfice *et al.*, 2006)

O álcool polivinílico (PVA) é um polímero promissor para a utilização como matriz para a imobilização de biomoléculas por aprisionamento. Sua forma gelificada é obtida por soluções aquosas concentradas que podem ser estocadas por muito tempo. Uma das técnicas já descritas para o aprisionamento celular em redes de PVA é a sequência de processos de congelamento e descongelamento de biomoléculas suspensas em solução polimérica, produzindo, por exemplo, suportes para a imobilização de células ou biocatalzadores (Alves da Cunha *et al.*, 2005).

2) Ligação Covalente - É um método complexo, que envolve diversas etapas de processamento químico, visando promover a incorporação permanente da biomolécula ao substrato por ligação direta entre estes dois elementos ou por intermédio de um pré-tratamento físico-químico da superfície do arcabouço (Figura 2.10) (Yang *et al.,* 2003; Oréfice *et al.*, 2006).

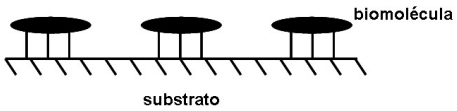


Figura 2.10- Esquema de ligação covalente entre biomolécula e substrato.
(Adaptação de Oréfice *et al.*, 2006)

Para a imobilização covalente de biomoléculas em superfícies poliméricas inertes, é necessário haver introdução inicial de grupamentos reativos, como: hidroxílico, carboxílico ou amino. Estes grupamentos funcionam como possíveis sítios de ligação (Ma *et al.*, 2007).

Um exemplo de ligação covalente mediada por pré-tratamento químico é descrita por Croll *et al.* (2004), que fizeram uso de hidrólise e aminólise para a

produção de grupamento funcionais na superfície de filmes de poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA). A hidrólise expôs grupamentos carboxílicos e a aminólise produziu grupos amino primário e secundário. A produção dos grupos funcionais foi realizada de forma controlada, evitando ao máximo a erosão da superfície polimérica. Posteriormente foram formadas ligações covalentes.

A ligação covalente via ligação cruzada combina características da imobilização por aprisionamento e por ligação covalente direta. São utilizados agentes de acoplamento ligados à camada basal para o ancoramento das biomoléculas, formando ligações intermoleculares entre o substrato e as biomoléculas que orientarão a adesão celular específica (Figura 2.11) (Yang *et al.,* 2003):

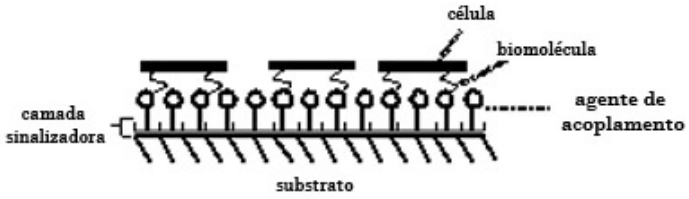


Figura 2.11- Esquema de modificação com ação de agente de acoplamento para união biomolécula-substrato induzindo ligação celular específica.
(adaptação de Oréfice *et al.*, 2006)

Uma técnica utilizada por muitos autores para a ativação de superfícies poliméricas inertes é a fotoativação por azidas aromáticas. Nahar *et al.* (2001; 2004) descreveram a ativação de superfícies de poliestireno por reações fotoquímicas e térmicas com o reagente 1-fluor-2-nitro-4-azidobenzeno (FNAB). Nessa reação, o grupamento azido do composto FNAB, quando exposto à radiação ultravioleta, é transformado em nitreno com alta reatividade. O nitreno reage com as ligações C-H da cadeia polimérica expondo o grupamento flúor. O fluor, que se manteve intacto durante a etapa fotoquímica, quando submetido à irradiação térmica por microondas foi substituído pelo grupamento amino da proteína, ou seja, foi o ponto para a ligação covalente da proteína (Nahar *et al.*, 2001; Bora *et al.*, 2002).

Yang *et al.* (2003) conseguiram produzir ligações covalentes entre a superfície polimérica do poli(L-ácido lático) e moléculas de colágeno do tipo I, através de radiação gama, tendo como agente de ligação cruzada o ácido acrílico. As superfícies poliméricas modificadas foram testadas, confirmando a bioatividade do colágeno, ou seja, a intensidade da radiação gama não desnaturou a conformação originar da proteína.

Zhu *et al.* (2002) promoveram ligações covalentes entre proteínas e superfícies de filmes de policaprolactona (PCL) a partir de duas etapas de modificação. Os autores, primeiramente, promoveram aminólises nas superfícies a fim de incorporar grupamentos nitrogenados. Depois de produzidas as superfícies aminolisadas de PCL, estas foram reagidas com glutaraldeído, que cumpriu a função de agente de acoplamento. Na etapa seguinte, as proteínas reagiram com as superfícies ativadas formando ligações covalentes. A melhora na biocompatibilidade das superfícies foi comprovada pelo aumento na adesão, espraiamento e proliferação celular quando cultivado in vitro.

Nagai *et al.* (2006) imobilizaram fibronectina na superfície de filmes de poli(ácido lático) (PLA) previamente hidrolisados por NaOH pela incorporação de uma carbodiimida. Os autores comprovaram a eficácia do tratamento para produção de um novo biomamterial, através do aumento da biocompatibilidade quando testado em cultura *in vitro* de fibroblasos humanos.

CAPÍTULO III

METODOLOGIA

Este capítulo refere-se aos materiais, aos reagentes, aos equipamentos e às técnicas de caracterização utilizados na pesquisa, bem como aos procedimentos adotados.

3.1. Materiais

O poliéster natural poli(3-hidroxibutirato), utilizado na produção do arcabouços porosos, foi fornecido pela PHB Industrial S/A. O clorofórmio e o NaCl, utilizados na produção dos arcabouços porosos, e o NaOH, utilizado na hidrólise da superfície, foram comprados da Vetec Química Fina Ltda, com grau de pureza P.A. A 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC, grau de pureza P.A.), a N-hidroxisuccinimida (NHS, grau de pureza 98%), o tampão MES (grau de pureza ≥ 99%) e a fibronectina (grau de pureza ≥ 98%), obtida de plasma humano, utilizados na bioativação da superfície dos arcabouços, foram comprados da Sigma-Aldrich.

3.2. Produção dos arcabouços poliméricos porosos

A técnica de produção dos arcabouços poliméricos porosos passa pelas etapas de preparo da solução polimérica, determinação da concentração desta solução, incorporação do agente porogênico peneirado na faixa granulométrica desejada e o procedimento final de lixiviação.

3.2.1. Preparo da solução de PHB

A solução foi preparada em um balão de vidro acoplado a um sistema de refluxo onde ocorreu a solubilização do poli(3-hidroxibutirato) em clorofórmio, a fim de

produzir uma solução final com concentração de 10% (p/v), segundo procedimento já descrito pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biopolímeros do PEMM/COPPE e desenvolvido por Mendonça (2008). Este preparo contou com duas etapas consecutivas, quais sejam:

- Etapa 1: inchamento – agitação magnética constante do PHB em clorofórmio realizada à temperatura ambiente, por 2 horas;
- Etapa 2: solubilização – aquecimento do sistema a 65ºC, mantendo a agitação constante, por um período de 2 horas.

Após as duas etapas descritas, a solução resultante foi reservada até atingir a temperatura ambiente, quando passou pelo processo de filtração a vácuo.

3.2.2. Determinação da concentração da solução de PHB

Para a determinação da concentração final da solução de PHB, foi utilizada a análise de peso seco. Esse procedimento fez uso de três recipientes metálicos, previamente tarados e pesados, em que a cada um foi adicionado 1 mL da solução filtrada. O solvente da solução foi evaporado em estufa a 105ºC e as mudanças de peso do conjunto (recipiente mais solução) foram acompanhadas a cada duas horas, encerrando quando o conjunto não apresentasse mais variações de peso. Ao final do procedimento, foi obtida a concentração da solução em g/mL. Para a obtenção da concentração em %(p/v) foi utilizada a Equação 1.

Equação1:

$$C_{(\%p/v)} = \frac{(M_f - M_0) \times 100}{V}$$

Em que $C_{(\%p/v)}$ é a concentração final da solução; M_f é a massa do conjunto (recipiente mais amostra); M_0 é a massa do recipiente vazio e V é o volume da amostra.

3.2.3. Definição da faixa granulométrica do agente porogênico – NaCl

O cloreto de sódio foi inicialmente macerado em gral e, então, peneirado manualmente utilizando um sistema de peneiras com aberturas de 150 µm e 250 µm. A peneira de abertura menor foi encaixada embaixo da peneira de abertura maior, onde foi adicionado o sal. Todo o material retido entre as duas peneiras foi recolhido e submetido à secagem em estufa a 105ºC por um período de 12 horas.

A definição da granulometria utilizada foi feita tomando por base o estudo publicado por Karageorgiou e Kaplan (2005), no qual foi mostrado que o estímulo direto à osteogênese ocorre na faixa de porosidade de 150-200 µm.

3.2.4. Confecção dos arcabouços pela técnica de lixiviação de sal

Para a confecção dos arcabouços porosos, foram utilizados a solução polimérica na concentração de 10% (p/v) e o cloreto de sódio (NaCl) peneirado como agente porogênico. A concentração do sal adotada para cada arcabouço foi de 50% (p/p).

A solução de PHB foi adicionada a moldes de vidro contendo o sal. A mistura heterogênea foi agitada até que todo o sal estivesse disperso pela solução. Os moldes foram mantidos dentro do dessecador por 48 horas até a completa evaporação do solvente. A evaporação aconteceu de forma lenta e controlada, a fim de se obter arcabouços mais homogêneos.

Em seguida, iniciou-se o processo de lixiviação para a remoção do sal presente nos arcabouços: as amostras foram imersas em recipiente contendo água destilada (periodicamente trocada) sob agitação constante por um período suficiente para retirada do sal (item 1.2.5). Com a saída dos cristais de NaCl, foram formados os poros no interior das amostras.

3.2.5. Acompanhamento da eficácia do processo de lixiviação

3.2.5.1. Medidas de condutividade elétrica da água de lavagem

Sabendo que compostos iônicos conduzem corrente elétrica quando fundidos ou em solução, Mendonça (2008), em sua pesquisa, fez uso da condutividade da água de lavagem após cada troca ao longo do processo de lixiviação, detectando a presença de íons nessas águas. A partir dos valores de condutividade elétrica medidos, foi possível estimar a concentração de íons na solução e, assim, determinar quantitativamente a saída do sal dos arcabouços.

A curva-padrão de condutividade elétrica do NaCl em solução aquosa foi construída considerado o valor máximo de concentração caso todo sal presente nos arcabouços saísse logo na primeira troca de água. Cada lavagem do processo de lixiviação foi realizada contendo 5 arcabouços em 400 mL de água destilada. Como a massa de sal utilizada na fabricação de cada arcabouço foi de 0,3 g, caso o rendimento do processo de lixiviação fosse de 100% logo na primeira lavagem, a solução teria um total de 1,5 g de sal, ou seja, 0,0038 gNaCl/mL. Assim, as concentrações das soluções salinas utilizadas para a construção da curva variaram na faixa de 0 a 0,0050 g/mL.

Os valores de condutividade elétrica das soluções para a construção da curva-padrão e das águas de lavagem foram medidos em condutivímetro Quimis® – Modelo Q795M2, disponível no Laboratório de Corrosão (PEMM/COPPE).

3.2.5.2. Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica teve por objetivo avaliar a presença de cristais de NaCl que, por ventura, não tivessem sido retirados das amostras durante o processo de lixiviação, confirmando os resultados pelas análises de condutividade, e, desta forma, definir o tempo ideal de lixiviação para que seja garantida a retirada do agente porogênico. Foram submetidas a esta análise arcabouços expostos a diferentes tempos de lixiviação.

O estudo de degradação térmica foi realizado em analisador termogravimétrico Perkin-Elmer (modelo Pyris 1 TGA), disponível no Laboratório do Departamento de Engenharia Química (Ladeq), na UFRJ. Aproximadamente 4 mg de cada amostra foram aquecidos a velocidade de 10ºC/min, sob atmosfera de nitrogênio, na temperatura ambiente até 400ºC.

3.2.6. Análise morfológica e determinação do tamanho de poros por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um instrumento versátil capaz de examinar e analisar as características microestruturais de superfície sólidas de materiais orgânicos e inorgânicos, em escala micrométrica (μm) ou submicrométrica. Nesse tipo de microscopia, a imagem é formada ponto-a-ponto por intermédio de um feixe de elétrons que varre a superfície da amostra. O princípio de tal técnica consiste na emissão de um feixe de elétrons, que, quando incide sobre a amostra, produz uma série de sinais (secundários, retroespalhados, absorvidos, difratados, etc). A captação desses sinais é realizada por detectores apropriados, sendo ampliados e processados num sistema analisador específico.

Os sinais de maior interesse são aqueles produzidos por elétrons secundários e retroespalhados, pois são sensíveis às variações na superfície da amostra (Goldstein, *et al.*, 2002). Os sinais produzidos pelos elétrons secundários mostram o relevo da superfície por efeito de contraste, sendo os picos brilhantes e os vales escuros (Oréfice *et. al.*, 2006). Os sinais dos elétrons retroespalhados dão uma idéia da heterogeneidade da composição da amostra em função das diferenças de número atômico dos elementos que compõem a amostra, sendo mais brilhantes os maiores números [4]. Unindo essas características de contraste à grande profundidade de foco alcançada pela microscopia eletrônica de varredura, obtêm-se imagens com aparência tridimensional.

O microscópio empregado na obtenção das imagens neste trabalho foi o Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM, modelo 6460 LV, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do PEMM/COPPE. Para as imagens de seção transversal, os arcabouços foram fraturados em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram previamente recobertas com ouro e observadas a 15 kV. Por meio das imagens obtidas foi possível avaliar a morfologia de superfície e dos poros dos arcabouços de PHB, podendo ainda se determinar o tamanho médio destes.

As micrografias de superfície e da seção transversal dos arcabouços obtidas em diferentes aumentos permitiram avaliar sua reprodutibilidade morfológica. O tamanho dos poros foi fixado com auxílio do *software* analisador de imagens Image-Pro Plus, sendo considerando o valor de diâmetro médio fornecido por este *software*. Para tal, foram utilizadas 9 micrografias da seção transversal com aumento de 50x de diferentes amostras, totalizando mais de 500 poros.

3.2.7. Determinação da densidade e do volume real dos arcabouços

A medida da densidade dos arcabouços porosos foi realizada segundo o princípio de Arquimedes, que diz que todo corpo mergulhado num fluido sofre, por parte do fluido, uma força vertical para cima, com intensidade igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo. Num corpo imerso em um líquido em repouso, atuam duas forças que possuem o mesmo centro de ação: a força peso (devido à interação com o campo gravitacional terrestre) e a força de impulsão (devido a sua interação com o líquido) (Carvalho, 1997).

Para a realização da medida de densidade, foi utilizada uma balança hidrostática a fim de se obterem os valores de massa real e de massa aparente dos suportes porosos de PHB. Estes valores foram aplicados à Equação 2, que adotou a densidade da água como 1g/cm^3. Para a determinação da densidade média, foram utilizados quatro arcabouços porosos.

Equação 2:

$$densidade = \frac{W_{seco} \times \rho_{água}}{(W_{seco} - W_{molhado})}$$

Em que W_{seco} é a massa referente ao arcabouço poroso seco, $W_{molhado}$ é a massa referente ao arcabouço poroso imerso em água e $\rho_{água}$ é a densidade da água a temperatura de execução do experimento.

A partir do conhecimento da massa e da densidade, foi possível medir o volume real dos arcabouços porosos (V) através da Equação 3:

Equação 3:

$$V = \frac{W_{seco}}{densidade}$$

3.2.8. Determinação da porosidade dos arcabouços

A porosidade de um arcabouço é a relação entre o seu volume de vazios e o seu volume real (Karageorgiou e Kaplan, 2005). Assim, para as medidas de porosidade,

foram utilizados os mesmos quatro arcabouços das medidas de densidade. O volume de poros foi obtido de forma indireta, através da medida do volume de água absorvida pelos suportes após um tempo de imersão de aproximadamente 24 horas. A diferença ente a massa dos arcabouços molhados (após 24 horas de imersão) e a massa dos arcabouços secos determinou a quantidade de água que foi absorvida pelos poros, ou seja, o volume de poros (V_{poros}). A porosidade dos arcabouços de PHB foi obtida, em porcentagem, a partir da Equação 4 (Nazarov *et. al.*, 2004):

Equação 4:

$$Porosidade = \left(\frac{V_{poros}}{V} \right) \text{ x } 100$$

3.3. Ativação de superfície

A promoção de ligações covalentes entre a superfície do arcabouço de PHB e a fibronectina seguiu o método biológico de modificação cruzada, em que foram necessárias duas etapas prévias de modificação, tendo por fim a criação de sítios ativos. As etapas de modificação tiveram por finalidade a ativação da superfície e foram conduzidas como proposto por Nagai *et al.* (2006), com hidrólise inicial promovida por solução de NaOH, seguida da ligação com uma carbodiimida, conforme ilustrado no esquema abaixo:

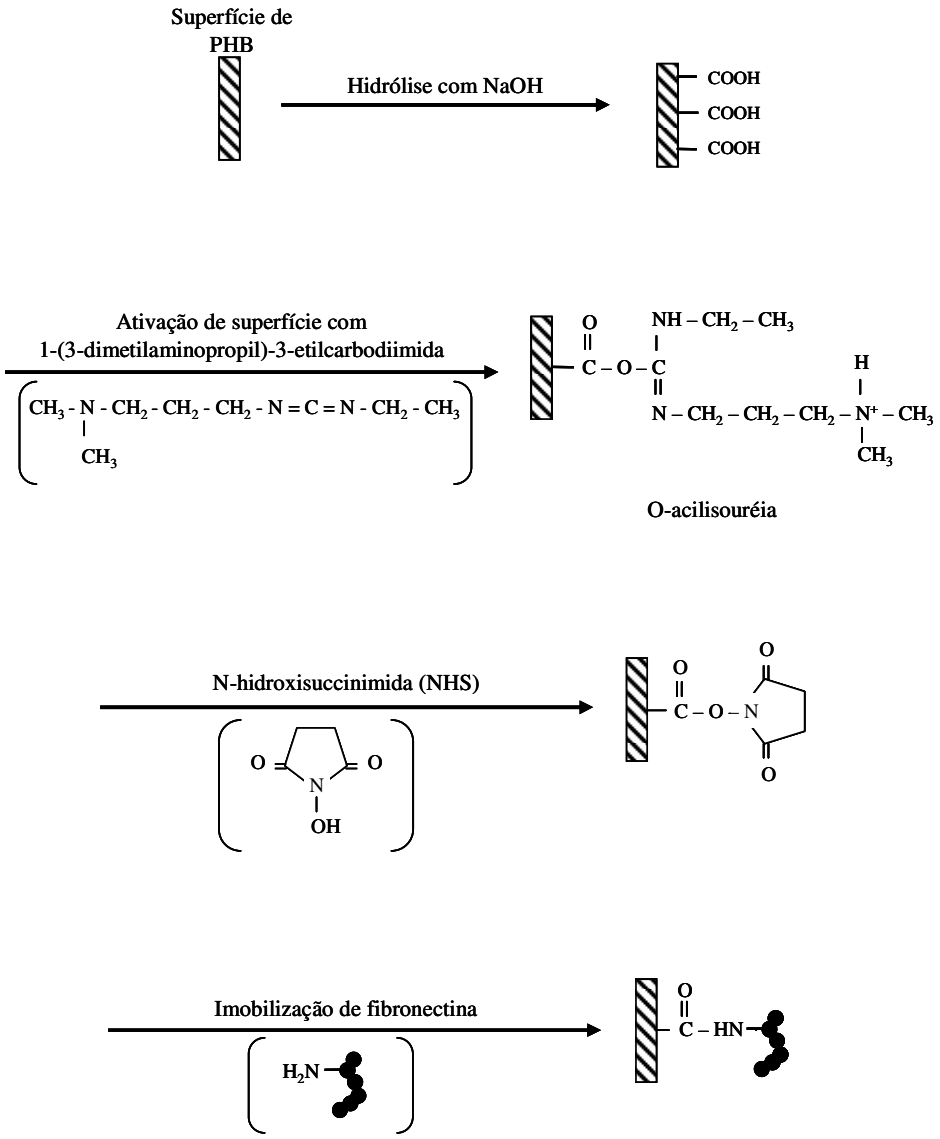


Figura 3.1- Esquema de ativação de superfícies poliméricas por carbodiimidas (adaptado de Ma *et. al.*, 2005; Nam *et. al.*, 2007)

3.3.1. Hidrólise com solução de NaOH

A hidrólise das superfícies dos arcabouços poliméricos foi realizada segundo técnica já utilizada pelo grupo de pesquisa da autora (Thiré *et.al.*, 2006). Esse processo teve por objetivo a incorporação de grupamentos carboxílicos nas cadeias poliméricas pela quebra da ligação éster.

Os arcabouços de PHB foram incubados em recipiente contendo solução de NaOH, na concentração de 1 M. O recipiente foi aquecido a 65ºC pelo período de 45 minutos. Após o aquecimento, os arcabouços foram submetidos a banhos de imersão em água destilada à temperatura ambiente sob agitação promovida por agitador magnético, com duração de 20 minutos cada um, até que a água de lavagem atingisse pH = 7,0.

3.3.2. Incorporação do agente de acoplamento

Esta etapa teve por objetivo criar sítios na superfície do arcabouço polimérico para a ligação covalente com a fibronectina. Para tal, foi promovida a solubilização da 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) junto ao N-hidroxissuccinimida (NHS) em tampão MES pH 4,75.

Em meio ácido, a carbodiimida reage com o grupamento carboxílico, formando o grupamento O-acilisoureia. Este composto possui grande reatividade, levando a reações laterais de hidrólise dentro da própria cadeia, o que promove o rearranjo do grupamento carboxílico. A fim de evitar essa hidrólise, foi utilizado o NHS, que induz a formação do éster-NHS, como já mostrado na Figura 3.1 (Nam *et.al.*, 2007; Mikolajczyk e Kielbasinski, 1981). O grupamento carboxílico ativado por NHS é uma espécie reativa preferencial em ataques nucleofílicos ao grupo amina da proteína quando comparado com o mesmo grupamento ativado por O-acilisoureia (Nam *et. al.*, 2007)

A 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) é uma carbodiimida solúvel em meio aquoso, amplamente utilizada para mediar modificações em grupamentos carboxílicos, apresentando sua maior reatividade em pH 4,75 (Lundblad e Noyes, 1984). A escolha do tampão ácido 2-morfolinoetanosulfônico, ou tampão MES, como ambiente de solubilização, foi realizada de acordo com Gilles *et. al.* (1990), em que foram avaliadas as propriedades da carbodiimida em solução aquosa.

A incorporação do agente de acoplamento foi realizada pela incubação dos arcabouços porosos (não modificados e modificados por solução de NaOH) em solução tampão MES 0,1 M, ajustada com NaOH 1 M a fim de obter pH 4,75, contendo a carbodiimida EDC e o NHS solubilizados. A determinação da concentração de carbodiimida em solução seguiu os conceitos de Nagai *et. al.* (2006), fixando-se em 0,1%. O NHS foi adicionado à solução tampão, mantendo a mesma razão molar da

carbodiimida. A reação foi mantida por 4 horas à temperatura ambiente, seguida de lavagem com água destilada corrente.

3.4. Imobilização de fibronectina via adsorção ou via ligação covalente

A solução estoque de fibronectina humana foi diluída até a concentração final de 10 µg/mL, tendo sido utilizado para este procedimento o tampão PBS pH 7,2 (0,145M NaCl tamponado com 0,01M $NA_2HPO_4.H_2O$). O procedimento foi realizado pela incubação dos arcabouços porosos, sem modificação e com modificação por hidrólise com NaOH e/ou NHS/EDC, na solução protéica à temperatura ambiente por 4 horas. Após a modificação, os arcabouços foram lavados com água destilada corrente, a fim de retirar a fibronectina que se mantivesse apenas adsorvida fracamente na superfície do arcabouço.

Assim, ao final do procedimento, foram produzidos quatro diferentes arcabouços: aqueles cuja proteína foi imobilizada por adsorção: PHB-fibronectina e PHB-NaOH-fibronectina; e os arcabouços cuja proteína foi imobilizada por ligação covalente: PHB-EDC-fibronectina e PHB-NaOH-EDC-fibronectina.

3.5. Caracterização dos arcabouços modificados

3.5.1. Ângulo de contato da superfície dos arcabouços

O ângulo de contato (θ) é determinado pela interação entre uma superfície e um líquido, variando de acordo com o equilíbrio termodinâmico de um sistema de três fases: sólido, líquido e vapor. O ângulo θ se forma entre o plano tangente da gota (γ_{LV}- energia de superfície na interface líquido-vapor) e o plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado (γ_{SL}- energia de superfície na interface sólido-líquido), conforme esquematizado Figura 3.2. O ângulo de contato é dependente das interações que acontecem nas três interfaces: sólido-líquido, líquido-vapor e sólido-vapor. Assim, as medidas de molhabilidade utilizando a água como líquido permitem avaliar as

variações hidrofílicas das superfícies poliméricas modificadas quando comparados com as superfícies não-tratadas:

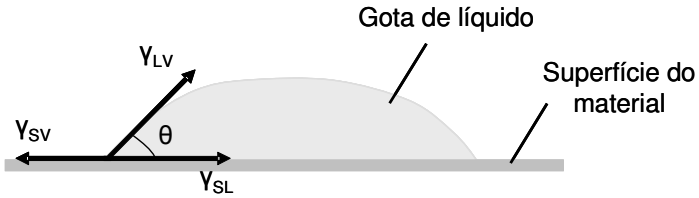


Figura 3.2- Esquema de uma gota sobre uma superfície durante medidas de ângulo de contato e o equilíbrio termodinâmico entre as três fases.

O ângulo de contato está ligado de forma inversamente proporcional à energia de superfície, ou seja, quanto maior a energia de superfície do substrato, menor o ângulo de contato, promovendo melhor aderência das biomoléculas.

As medidas de ângulo de contato nas superfícies dos arcabouços com e sem modificação por NaOH e/ou carbodiimida foram obtidas com auxílio do Ramé-Hart Advaced Goniometer, Modelo 500-F1, e analisadas pelo *software* DROPimage Advanced pertencente ao Laboratório de Superfície e Filmes Finos do PEMM/COPPE. Nesta análise, foram obtidas medidas de molhabilidade pelo método da gota séssil, utilizando como líquido a água. As análises foram realizadas em triplicada, sendo utilizado para cada gota 0,2 mL e realizadas 20 medidas a cada 0,5 segundos.

3.5.2. Estimativa de cargas dos arcabouços por cristal violeta

As cargas das superfícies foram medidas de forma indireta através da adsorção do corante cristal violeta. Nessa análise, foi utilizada solução 0,5% de cristal violeta em tampão PBS pH 7,2 para a coloração dos arcabouços. A quantidade aqui utilizada foi o suficiente para imergir completamente os arcabouços em solução. Em seguida, o excesso de corante foi retirado, sobrando apenas os arcabouços corados. A diluição do corante adsorvido nos arcabouços foi realizada por banho de imersão destes em metanol e a absorbância da solução final lida a 595nm em espectrofotômetro Spectrumlab 22pc. A referida análise foi realizada no Laboratório de Biologia da Superfície Celular, do IBCCS/CCS/UFRJ.

3.5.3. Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS)

O XPS foi utilizado para a identificação dos elementos, e seus estados químicos, presentes na superfície das amostras de arcabouços poliméricos com e sem modificações. A identificação dos elementos presentes na superfície foi feita diretamente pela determinação das energias de ligação dos picos fotoelétricos. Podem ser detectados todos os elementos, exceto hidrogênio e hélio. A intensidade dos picos fornece informação quantitativa sobre a composição da superfície, enquanto a posição exata de cada pico indica o estado químico do átomo emissor. Dessa forma, a técnica é capaz de inferir sobre as ligações interatômicas presentes nas superfícies analisadas e quantificar (em porcentagem atômica) esses elementos.

Foram analisadas as superfícies dos arcabouços de PHB sem modificação e modificados por NaOH, e ainda estes com fibronectina imobilizada por ligação covalente e por adsorção. A análise foi feita pela espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), empregando-se o espectrômetro de elétrons da Kratos Analytical, modelo XSAM HS, disponível no Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Materiais (CCDM), instalado na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

A análise foi realizada em ambiente de ultra-alto vácuo (pressão em torno de 1 x 10^{-8} Torr), empregando-se a radiação Kα do magnésio como fonte excitadora, com energia de 1253,6 eV e potência de 60 W (voltagem de 12 kV e emissão de 5 mA). Foi empregado um neutralizador de carga para evitar o carregamento eletrostático das amostras. O ajuste dos picos foi feito usando-se o programa fornecido pelo fabricante do equipamento, com curvas gaussianas, para os picos C 1s, O 1s, N 1s e Na 1s, e mistas gaussianas/lorentzianas, para os dubletos Cl 2p e S 2p, subtração de *background* pelo método de Shirley e a rotina de mínimos quadrados (Nascente, 2005). Foi usado o valor 284,8 eV para C 1s de C-C e/ou C-H como referência de energia de ligação (Mouleder, *et. al.* 1992).

3.5.4. Microscopia de força atômica (AFM)

Pertencente ao grupo das microscopias de varredura por sonda, a microscopia de força atômica, ou AFM, quando aplicada ao estudo em polímeros, abrange desde a

simples visualização da morfologia da superfície até o exame mais avançado das características morfológicas, estruturais e moleculares do material em escalas nanométricas.

O microscópio de força atômica utiliza como sonda uma haste flexível (cantiléver) de aproximadamente 100-200 μm de comprimento, com uma agulha afilada (ponta de prova) na sua extremidade livre, podendo apresentar formato piramidal (50 nm) ou cônico (10 nm). O cantiléver sofre efeito de deflexão por forças de repulsão produzidas a partir da interação entre a agulha e a superfície da amostra. Os valores da deflexão são medidos por um sensor óptico e refletem a topografia da região da amostra que está sendo varrida.

Dependendo da distância agulha-amostra e do movimento imposto ao cantiléver durante a varredura, a microscopia pode ser do modo contato, do modo não-contato ou do modo contato intermitente. No modo contato, a agulha nunca se afasta da amostra, mantendo um contato suave para não danificar a superfície que está sendo analisada. No modo de não-contato, o cantiléver oscila a uma determinada frequência e a agulha se mantém a alguns poucos nanômetros da superfície da amostra. No modo contato intermitente, o cantiléver também oscila, mas a agulha toca a amostra periodicamente.

A microscopia de força atômica foi conduzida no Alpha 300AR Microscope _ WITec no Laboratório de Caracterização de Superfícies. A morfologia dos suportes porosos de PHB antes e após as modificações foi analisada em modo de contato intermitente utilizando-se agulhas de nitreto de silício montadas em uma haste com constante de mola igual a 42 N/m e freqüência de ressonância de 285 kHz. As imagens resultantes foram analisadas através do *software* analisador de imagens acoplado ao equipamento. A determinação da rugosidade média quadrática (RMS) foi realizada com base em imagens de topografia de 30 μm x 30 μm.

3.5.5. Análise de citotoxicidade

A literatura propõe diversas formas diferentes para realizar análises citotóxicas em um material. Neste trabalho, a análise foi realizada segundo teste multiparamétrico de viabilidade celular por kit *In Cytotox* (Xenometrix), avaliando três diferentes parâmetros: atividade mitocondrial (XTT), integridade membranar (vermelho neutro) e quantificação do material genético (crisal violeta) (De-Deus *et. al*., 2009).

Para a produção dos extratos, os materiais foram incubados em meio de cultura sem soro por 24 horas, em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2. Os extratos foram então recolhidos e incubados em cultura de fibroblastos em placa de 96 poços por mais 24 horas, em estufa a 37°C (5% CO_2). Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e a primeira análise realizada foi pelo método XTT, que quantifica a capacidade da enzima desidrogenase presente na mitocôndria de converter o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em compostos de formazana (cor laranja). A absorbância foi medida em 480 nm. O segundo teste avaliou a sobrevivência/viabilidade celular pela capacidade das células de incorporarem o corante vermelho neutro em seus lisossomos, acumulados na sua membrana íntegra. No final deste teste as células foram fixadas, o corante presente no seu citoplasma foi liberado por ação da solução de solubilização para o sobrenadante e a absorbância foi lida em 540 nm. O ensaio com cristal violeta avaliou a densidade celular por coloração do DNA; após eliminação do excesso do corante, a absorbância a 540 nm é proporcional à quantidade de células no poço. Todas as leituras de absorbância foram realizadas em Leitor de Microplacas Synergy 2 BioTek, disponível na Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC), instalada no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP-UFF). Para este teste foram avaliados arcabouços de PHB sem modificação, modificados por adsorção de fibronectina e modificados por NaOH e fibronectina ligada covalentemente. Foram utilizados como controle positivo (citotóxico) solução de fenol a 2% e como controle negativo (não-citotóxico) extrato de poliestireno. Todos os extratos foram avaliados em réplicas de 6 poços.

3.5.6. Avaliação da força de ligação da fibronectina por dosagem de extrato

A fim de avaliar a força de ligação da fibronectina imobilizada na superfície dos arcabouços, os volumes dos extratos produzidos para a análise citotóxica que não foram utilizados foram dosados em NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer - Thermo Scientific, disponível na Unidade de Pesquisas Clínicas (UPC), instalada no Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP-UFF). Assim, a partir da análise comparativa da leitura de absorbâncias a 280 nm entre os arcabouços sem modificação, e com proteína adsorvida e imobilizada covalentemente, foi possível estimar quanto de proteína dessorveu da superfície dos arcabouços ao longo das 24 horas de exposição.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da eficácia do processo de lixiviação

De acordo com a literatura, o processo de lixiviação apresenta boa eficácia, porém, muitas vezes, não consegue retirar todo o sal utilizado na fabricação dos arcabouços (Hutmacher, 2000; Sader *et. al.*, 2006). A fim de obter o melhor resultado quanto à retirada do sal e estabelecer, assim, um protocolo com o tempo ideal de lixiviação dos arcabouços porosos de PHB, o processo foi acompanhado por análise de condutividade da água de lavagem (medida após cada troca) e análise termogravimétrica (TGA) dos arcabouços submetidos a diferentes tempos de lixiviação.

4.1.1. Medida de condutividade elétrica da água de lavagem

Para a obtenção de um valor quantitativo da retirada de sal dos arcabouços pelo processo de lixiviação, foi construída a curva-padrão da condutividade elétrica dos íons NaCl em solução aquosa, mostrada na Figura 4.1.

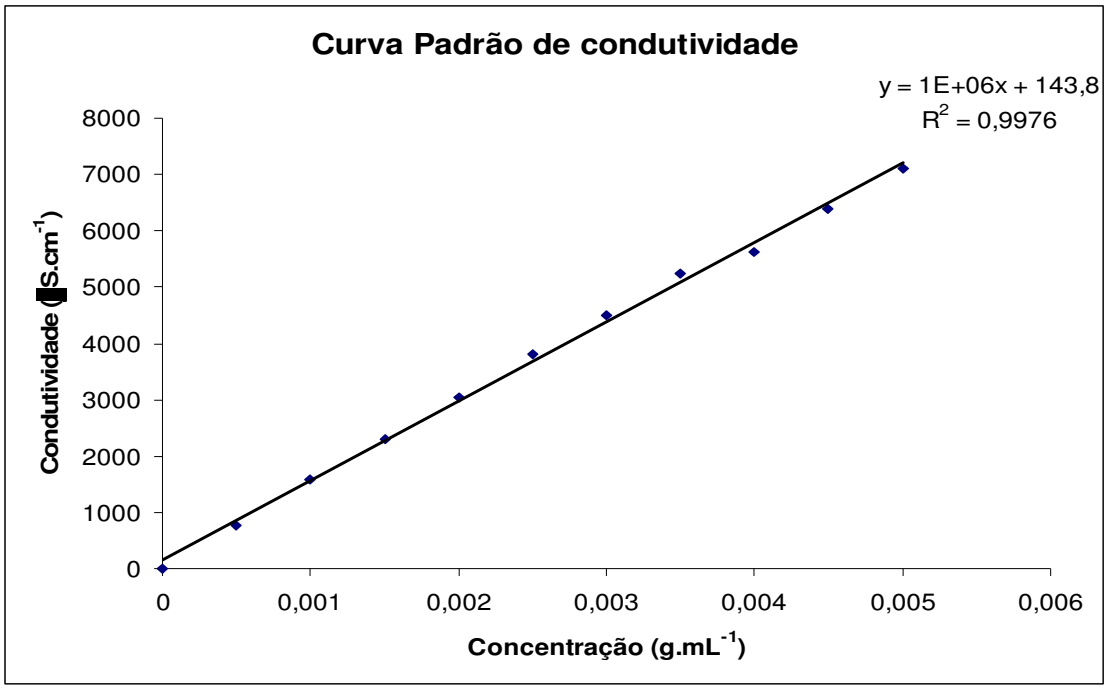


Figura 4.1- Curva-padrão de condutividade elétrica dos íons NaCl em solução aquosa.

O processo de lixiviação dos arcabouços foi mantido por um período de sete dias, com trocas de água constantes e medição da condutividade da água de lavagem ao final de cada dia. Os resultados obtidos para as medidas de condutividade elétrica da água de lavagem estão listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Valores de condutividade elétrica da água de lavagem do processo de lixiviação em função do tempo de lixiviação.

Processo de lixiviação (dias)	**Condutividade elétrica ($\mu S.cm^{-1}$)**
1º	5008,03
2º	100,16
3º	2,38
4º	1,17
5º	1,26
6º	1,37
Água destilada	1,07

A maior quantidade de íons em solução foi encontrada na medida de condutividade elétrica do primeiro dia de lixiviação. Este resultado indica a saída de grande parte do sal presente nos arcabouços, mostrando a eficácia da inserção do sistema de agitação constante da água durante o banho de imersão. Na pesquisa realizada por Mendonça (2008) os arcabouços foram imersos em água sem agitação e o sal levou 48 horas para ser liberado na solução. Assim, a agitação mostrou ser um importante fator no processo de lixiviação.

Pelos valores apresentados na Tabela 4.1, observa-se que, após o terceiro dia de lixiviação, a saída de sal dos arcabouços foi pouco expressiva, não apresentando grande diferença de condutividade entre si. O valor total de íons em solução após o segundo dia de lixiviação foi determinado pelo somatório dos valores de condutividade após o primeiro e o segundo dia (valores indicados na Tabela 4.1) e comparado à curva-padrão da condutividade do NaCl. O valor de somatório encontrado foi igual a 5108,19 $\mu S.cm^{-1}$. Para a comparação com a curva-padrão, foi utilizada como base a condutividade 5228 $\mu S.cm^{-1}$, referente à solução contendo 0,0035g/mL. Assim, convertido para gramas de NaCl, resulta em 1,37 g de NaCl dissolvidos em 400 mL de solução, ou seja, aproximadamente 92% do total de sal. Portanto, pode-se concluir que a retirada de sal foi eficaz após dois dias de lixiviação, com trocas constantes de água de lavagem.

4.1.2. Análise temogravimétrica

A análise termogravimétrica dos arcabouços expostos à lixiviação por diferentes períodos teve por objetivo confirmar o resultado obtido na análise de condutividade de água de lavagem. Assim, foram submetidos a essa análise um filme de PHB puro e três arcabouços diferentes expostos a 1 e 2 dias de lixiviação. O valor do resíduo encontrado para o filme de PHB puro foi de 0,33%, enquanto a média dos resíduos encontrados nos arcabouços lixiviados por um e dois dias foi de, respectivamente, (0,63±0,08)% e (0,51±0,12)%. Sader *et. al.* (2006) produziram arcabouços de PHB pela técnica de lixiviação de sal e encontraram um resíduo final de 1,1%, o qual se mostrou não-tóxico quando em contato com material celular. Esse resultado valida os biomateriais aqui em análise como possíveis artefatos para utilização em engenharia de tecidos.

Através da análise de TGA, foi possível reafirmar a retirada de quase todo o sal do interior dos arcabouços, confirmando a eficácia da técnica de lixiviação. Assim,

identificou-se como condição ideal de lixiviação para o material aqui pesquisado a imersão dos arcabouços em água destilada por 48 horas sob agitação constante.

4.2. Caracterização dos arcabouços porosos de PHB

4.2.1. Morfologia e tamanho de poros

A produção dos arcabouços por vazamento em molde de vidro gerou um material com diferentes características morfológicas, dependendo da superfície externa observada. A superfície em contato com o vidro mostrou-se totalmente porosa possivelmente devido à decantação de parte do sal presente na mistura no fundo do molde durante a evaporação do solvente (Figura 4.2). Na superfície voltada para o ar, observou-se a formação de uma fina camada de PHB contendo alguns poros superficiais, como pode ser visto na Figura 4.3. A camada superficial de PHB pode ser rompida pela saída dos cristais de NaCl, formando os poros superficiais. As Figuras 4.3 (a) e (b) ilustram a heterogeneidade da superfície dos arcabouços.

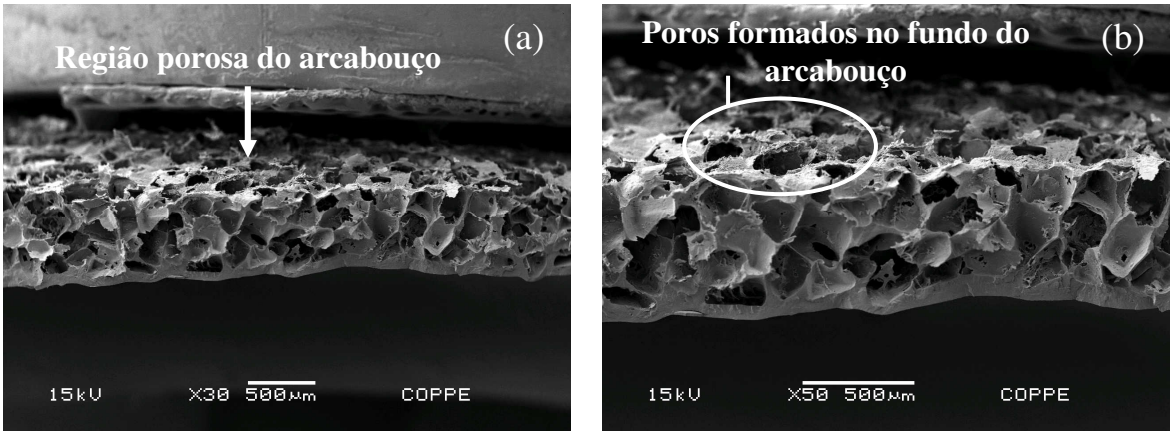


Figura 4.2- Micrografias de MEV mostrando a alta porosidade da região do arcabouço formada em contato com o vidro: (a) 30x; (b) 50x.

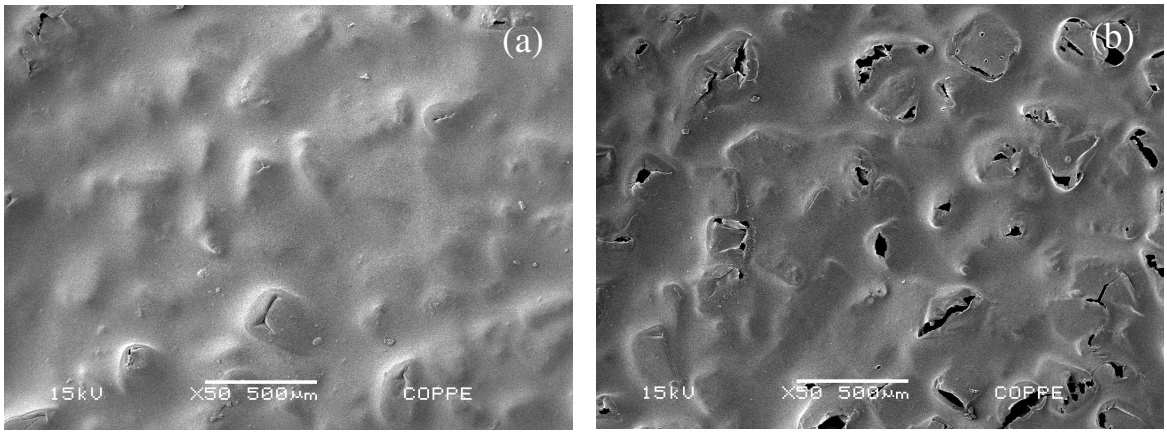


Figura 4.3- Micrografias de MEV de duas regiões diferentes na superfície formada em contato com o ar, mostrando a possível formação de poros nesta superfície, em aumentos de 50x.

Um aumento ainda maior na camada de PHB formada na superfície dos arcabouços (Figura 4.4) permite a visualização de uma rede distorcida com grande quantidade de reentrâncias, que poderiam ser atribuídas às cadeias de PHB e a pequenos poros formados pela evaporação do solvente:

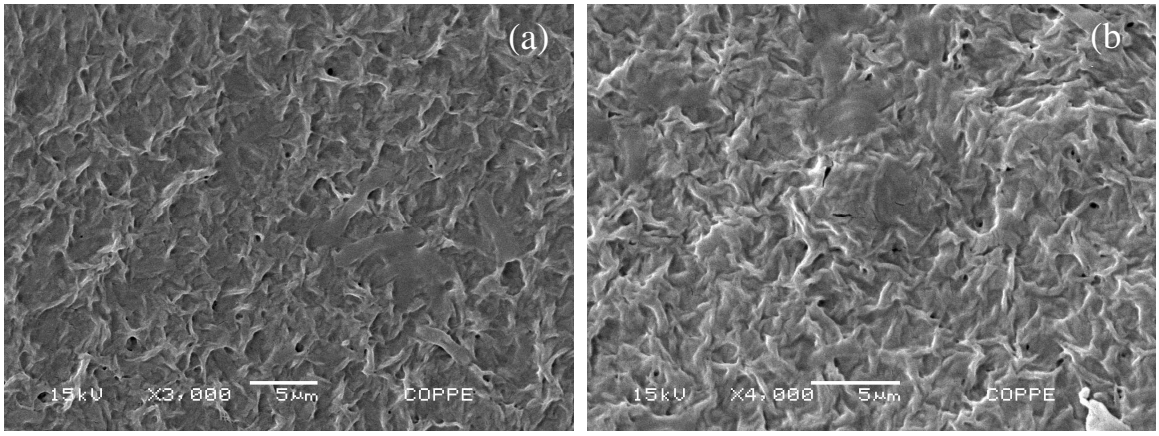


Figura 4.4- Micrografias de varredura da camada de PHB na superfície do arcabouço, nos aumentos de 3000x (a) e 4000x (b).

Por meio de micrografias da seção transversal, foi possível verificar que com a saída dos cristais de NaCl foi formada uma rede de microporos de morfologia irregular (Figura 4.5 (c)). Também foi possível avaliar a homogeneidade da distribuição dos poros ao longo da região porosa do arcabouço. Essa característica se deve, provavelmente, a uma boa homogeneização da solução com o agente porogênico no momento da produção do arcabouço, em associação à alta granulometria adotada por

esta pesquisa. Como efeito da boa homogeneização, houve a diminuição da espessura da camada de PHB, que normalmente se forma sobre a região porosa (indicada na Figura 4.5 (b)) tendo, algumas vezes, inibido a sua formação. Quando presente, essa camada não apresentou mais do que 80 µm de espessura, bem abaixo do valor encontrado por Mendonça (2008), que conseguiu formar uma camada densa com espessura média de 120 µm para arcabouços de PHB produzidos utilizando NaCl com faixa granulométrica de 75 a 125 µm.

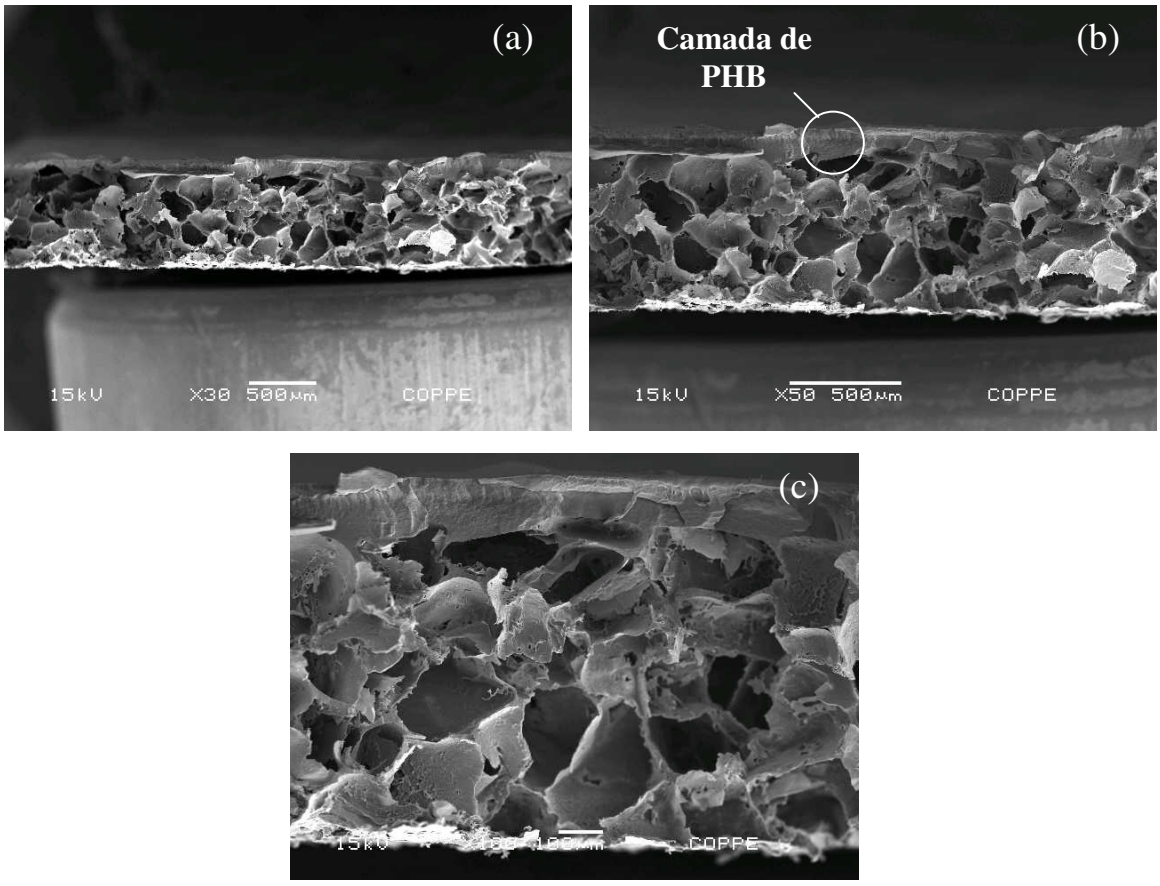


Figura 4.5- Micrografias da seção transversal do arcabouço poroso nos aumentos de 30x (a); 50x (b) e 100x (c).

Os poros presentes nos arcabouços são de morfologia irregular devido ao formato poligonal dos grãos de NaCl, assim, um mesmo grão possui diâmetros maiores e menores, com grande variação de tamanho entre si. Para a determinação do tamanho dos poros, foi utilizado o diâmetro médio de cada poro. O tamanho dos poros obtidos nos arcabouços produzidos neste trabalho variou de 21 µm a 351 µm, sendo o tamanho do tamanho médio dos poros de (124 ± 47) µm, como mostrado no histograma da

Figura 4.6. Trata-se, portanto, de uma faixa viável para a indução direta da osteogênese (Karageorgiou e Kaplan, 2005).

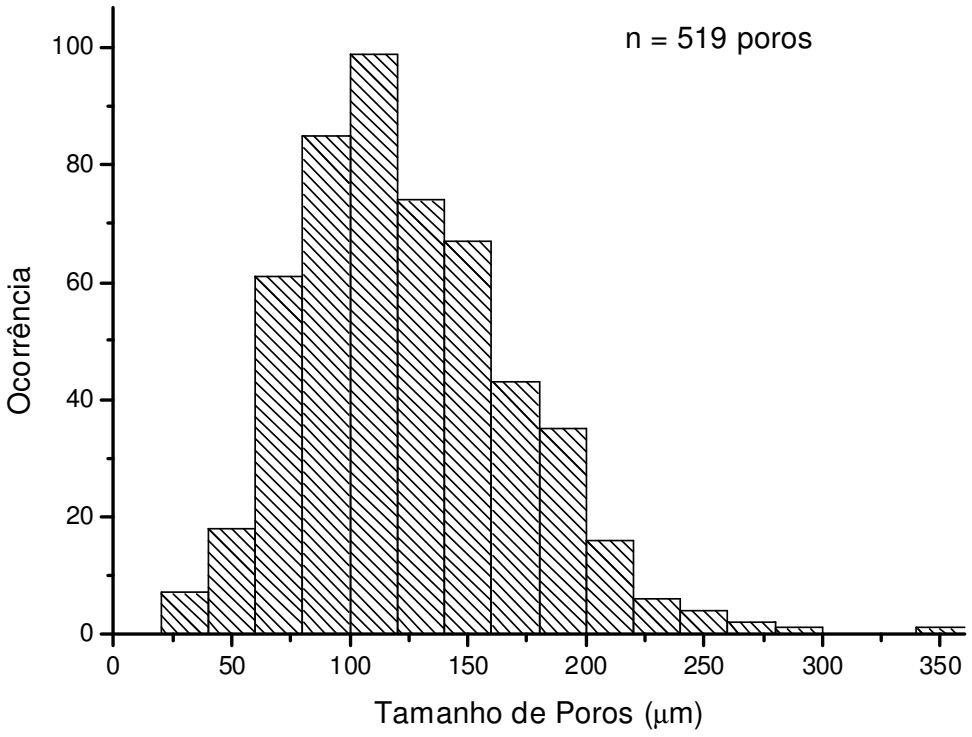


Figura 4.6- Histograma da distribuição do tamanho de poros dos arcabouços de PHB.

Karageorgiou e Kaplan (2005) mostraram que a definição da faixa granulométrica é um importante fator na progressão da osteogênese. De acordo com os autores, arcabouços com poros de tamanho grande (100-200 μm) estimulam diretamente a osteogênese quando implantados em organismos vivos a fim de regenerar uma região óssea avariada. Esse processo ocorre devido à alta vascularização interna, que permite maior aporte de oxigênio e nutrientes para as células. O mesmo não se observa com arcabouços contendo baixa granulometria (90-120 μm). Nesse caso, há crescimento de tecido ósseo não mineralizado. Tais resultados foram correlacionados com o diâmetro médio dos canais de Havers, que varia entre 100 e 200 μm. Os autores também demonstraram que arcabouços com tamanho médio de poros ainda menores (10-44 e 44-75 μm) permitiram somente o crescimento de tecido fibroso.

4.2.2. Densidade

A densidade dos arcabouços porosos de PHB foi determinada pela Equação 2. As variáveis utilizadas para a determinação e o valor final de densidade estão listados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Variáveis para a determinação da densidade dos arcabouços de PHB.

Variável	Valor
Massa do arcabouço seco (g)	0,1757 ± 0,02
Massa aparente do arcabouço molhado (g)	-0,1091 ± 0,02
Densidade da água ($g.cm^{-3}$)	1,0
Densidade ($g.cm^{-1}$)	**0,6226 ± 0,04**

4.2.3. Porosidade

Porosidade é definida como a quantidade de espaços vazios em um material. Os poros são necessários para o crescimento do tecido ósseo, uma vez que por esses espaços passam tanto as células que dão inicio à formação do tecido, como os nutrientes necessários para a sobrevivência destas. De acordo com a literatura, a variação de porosidade dos arcabouços poliméricos produzidos pela técnica de lixiviação de sal encontra-se na faixa de 20 a 50 % (Hutmacher, 2000).

Na Tabela 4.3 estão listadas as variáveis utilizadas para o cálculo da porosidade segundo a Equação 4.

Tabela 4.3- Variáveis para a determinação da porosidade dos arcabouços de PHB.

Variável	Valor
Massa do arcabouço seco (g)	0,1757 ± 0,02
Volume de poros - V_{poros} (cm^3)	0,1167 ± 0,02
Volume real - V (cm^3)	0,2835 ± 0,04
Porosidade (%)	**41 ± 6**

Dessa forma, é possível afirmar que a técnica utilizada para a produção dos arcabouços porosos de PHB para utilização em bioengenharia óssea está de acordo com a literatura até hoje desenvolvida.

4.3. Efeitos da hidrólise com NaOH e da ativação de superfície

O tratamento de hidrólise proposto para a ativação da superfície dos arcabouços porosos de PHB teve por objetivo a criação de novos pontos ativos na cadeia polimérica passíveis de imobilização da fibronectina. O tratamento tem como consequência a modificação da topografia e das cargas destas superfícies.

A hidrólise com NaOH acontece via ataque nucleofílico dos íons hidróxido ao carbono da carbonila, por ser a região de menor densidade de elétrons. Esses íons são consumidos durante a reação de hidrólise, quando são formados grupos carboxílicos e hidroxilas na superfície dos arcabouços poliméricos (Croll *et. al.*, 2004). Assim, a hidrólise com NaOH é um processo que não só altera a carga superficial pela criação de grupamentos oxigenados, como também promove a erosão das superfícies poliméricas pela quebra das cadeias, como mostrado na Figura 4.7:

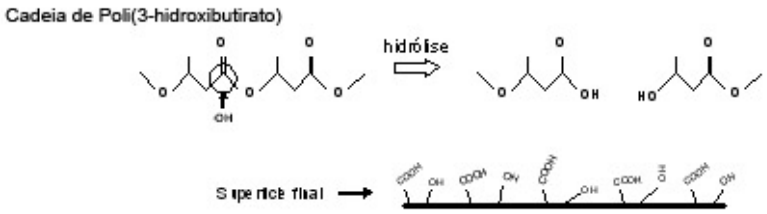


Figura 4.7- Esquema de modificação da superfície de materiais à base de PHB por hidrólise, com a exposição de grupamentos -COOH e -OH.

As Figuras 4.8 e 4.9 mostram imagens de microscopia eletrônica de varredura de arcabouços modificados por NaOH 1M por 45 minutos. Na Figura 4.8, observa-se que o tratamento provocou a quebra das cadeias de PHB e a formação de maior número de pequenos poros na superfície dos arcabouços, enquanto na Figura 4.9 observa-se que a estrutura porosa não sofreu modificações significativas:

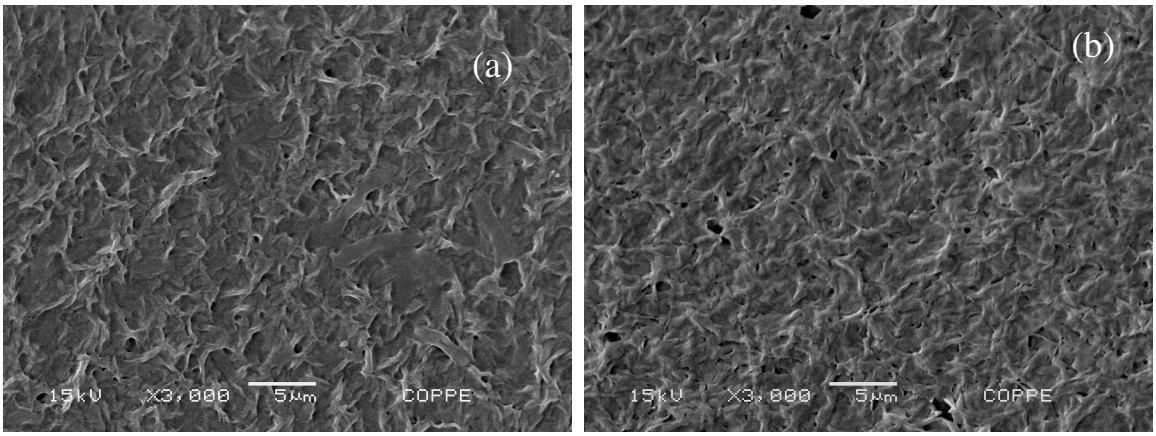


Figura 4.8- Micrografias da superfície de arcabouço poroso não modificado (a) e modificado por NaOH (b).

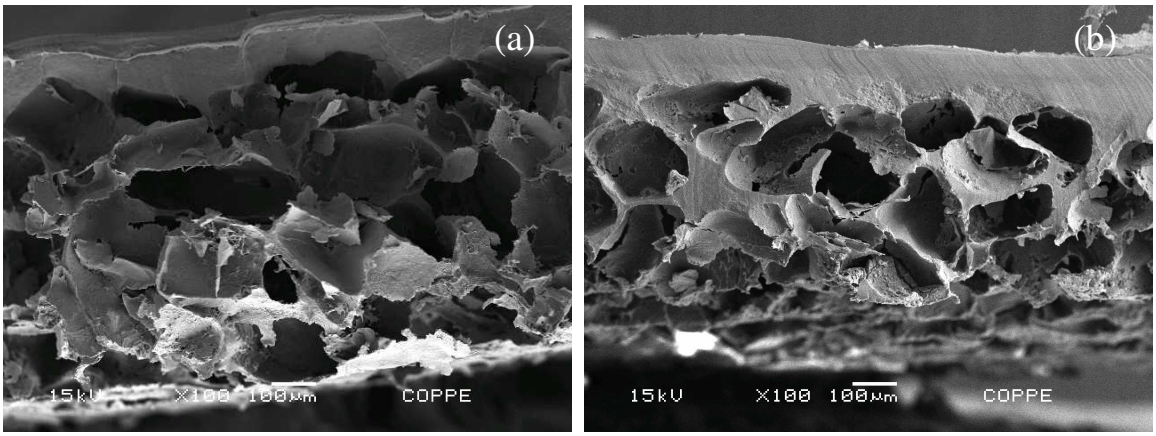


Figura 4.9- Micrografias da seção transversal de arcabouços porosos de PHB não modificado (a) e modificado por NaOH (b).

A Figura 4.10 mostra imagens de microscopia de força atômica (AFM) de 30 µm x 30 µm, em formato tridimensional, da superfície dos arcabouços porosos de PHB antes e após a modificação com NaOH. Essas imagens corroboram as informações obtidas por MEV (Figura 4.8).

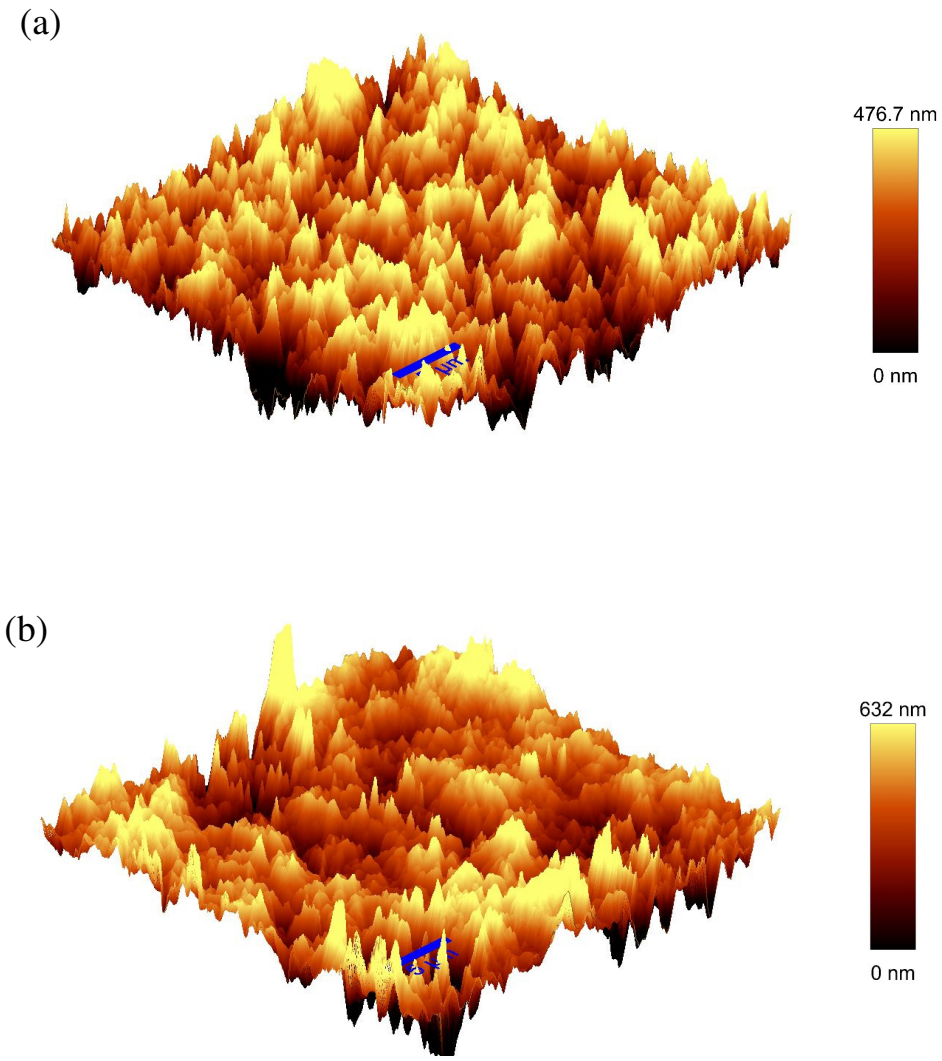


Figura 4.10- Imagens de topografia de 30 µm x 30 µm obtidas por AFM operado em modo contato intermitente e exibidas no formato 3D da superfície dos arcabouços sem modificação (a) e hidrolisados (b).

A análise da rugosidade (RMS) da superfície foi realizada com base em imagens de topografia de 30 µm x 30 µm obtidas por AFM, as quais também confirmaram a erosão da superfície nos arcabouços pelo tratamento de hidrólise. A rugosidade passou de (434 ± 23) nm, em superfícies não modificadas, para (1230 ± 286) nm em superfícies tratadas com NaOH. O grande desvio padrão obtido nas medidas de rugosidade pode ser atribuído à heterogeneidade da superfície das amostras, principalmente dos arcabouços hidrolisados. Uma evidência da erosão da superfície pela quebra das cadeias por ação da hidrólise pode ser vista na análise do eixo Z, o qual indica a variação de altura nas amostras. A altura máxima alcançada pelas amostras hidrolisadas foi de

(634 ± 3) nm, enquanto nos arcabouços sem modificação a altura máxima foi de (487 ± 19) nm.

Os grupos carboxílicos presentes no PHB e os novos grupos criados pela hidrólise com NaOH foram ativados com 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS), a fim de permitir a ligação covalente com a fibronectina de acordo com a Figura 3.1. Após a ativação da superfície por ação da EDC/NHS, a seção transversal do arcabouço foi novamente observada por MEV. Foi verificado que esta modificação também não alterou a estrutura porosa (Figura 4.11):

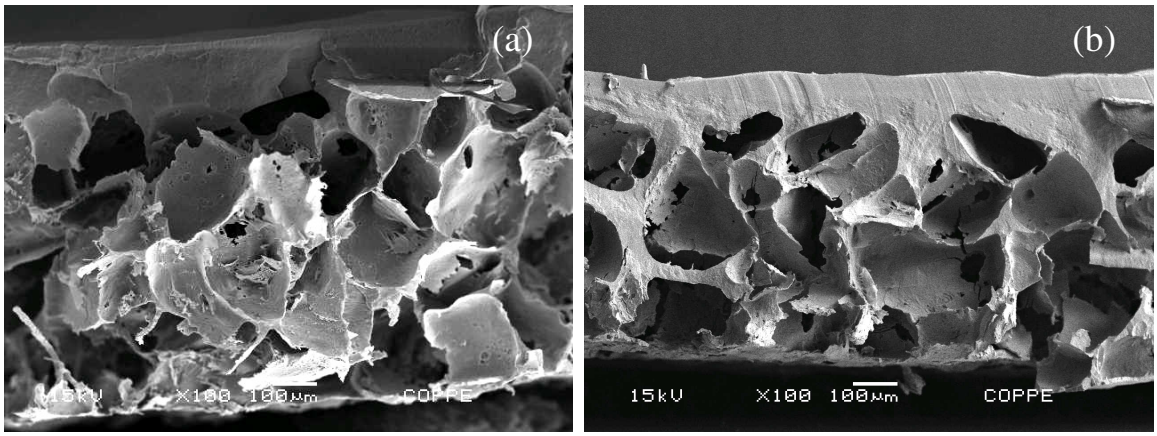
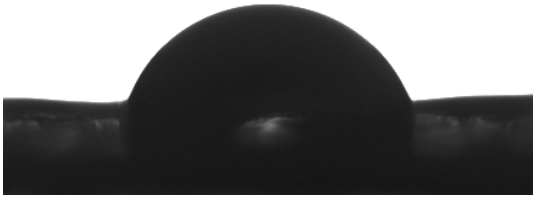


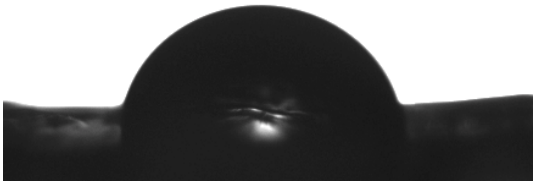
Figura 4.11- Micrografias da seção transversal de arcabouço poroso não modificado (a) e ativado por EDC/NHS (b).

O estudo da molhabilidade das superfícies ativadas foi realizado por medidas de ângulo de contato em relação a água, utilizando o método da gota séssil. A Figura 4.12 mostra as imagens das gotas (0,2 mL cada) sobre os arcabouços com e sem modificação, obtidas pelo goniômetro, com seus respectivos valores de ângulo de contato:

(a) θ = 70° ± 3

(b) θ = 61° ± 5





(c) Não houve formação de gota

(d) θ = 52° ± 2

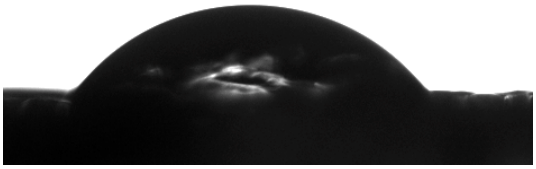


Figura 4.12- Imagens, e seus respectivos valores, das gotas formadas durante a análise de ângulo de contato sobre arcabouço sem modificação (a), ativado por EDC/NHS (b), modificado por NaOH (c), e modificado por NaOH e ativado por EDC/NHS (d).

Nos arcabouços de PHB submetidos à hidrólise com NaOH, observou-se molhabilidade total da superfície. Esse fenômeno é conhecido como superhidrofilicidades e está relacionado tanto ao aumento da concentração de grupamentos oxigenados (-COOH e -OH) no material tratado (Arima e Iwata, 2007; Wei *et. al.*, 2009), quanto ao aumento da rugosidade da superfície (Tsougeni *et.al.*, 2009). Quando a superfície superhidrofílica foi exposta ao processo de ativação por EDC/NHS, o ângulo de contato aumentou. Tal resultado sugere que, neste trabalho, o fenômeno de superhidrofilicidade possa estar relacionado ao aumento da presença de grupamentos oxigenados nas superfícies dos arcabouços, uma vez que a concentração dos grupamentos carboxílicos diminuiu com a ativação por EDC/NHS (Figura 3.1). Os valores de ângulo de contato obtidos para as diferentes superfícies foram tratados estatisticamente, mostrando diferença significativa entre os arcabouços de PHB ativados por EDC/NHS, com e sem tratamento prévio de hidrólise. Esse resultado mostra a influência da rugosidade no aumento da hidrolificidade da superfície dos arcabouços,

tendo em vista que após o tratamento de ativação as superfícies apresentavam os mesmos grupamentos.

4.4. Efeitos da adsorção e da ligação covalente de fibronectina sobre os arcabouços de PHB

As técnicas de imobilização da fibronectina por adsorção ou por ligação covalente sobre superfícies poliméricas podem produzir resultados diferentes quanto à conformação adotada pela proteína durante a interação, o que interfere diretamente na resposta celular, tendo em vista que a atividade da proteína está extremamente relacionada a seu arranjo tridimensional. A conformação da fibronectina pode variar de acordo com: o pH da solução; a força de ligação presente na interface proteína-substrato; a carga elétrica, a hidrofilicidade, a rugosidade e os componentes químicos presentes no substrato (Vallières *et. al.*, 2007). O processo de aquisição da ligação covalente entre a proteína e o substrato é bem mais complexo do que o da adsorção física, mas apresenta como grande vantagem a obtenção de superfícies mais controladas e estáveis (Vallières *et. al.*, 2007).

A Tabela 4.4 lista, de forma comparativa, os valores de ângulo de contato encontrados para as superfícies dos arcabouços não modificados, modificados por hidrólise ou ativação por EDC/NHS, e recobertos por fibronectina (Fn). A fibronectina foi considerada imobilizada por adsorção física quando a solução de proteína foi colocada em contato com arcabouços sem modificação ou hidrolisados. Por outro lado, quando a imobilização foi efetuada na superfície dos arcabouços (sem modificação ou previamente hidrolisados) ativados por EDC/NHS, a fibronectina foi considerada como ligada covalentemente ao PHB. A seguir lista-se a nomenclatura utilizada na discussão dos resultados:

- PF- Arcabouço sem modificação e recoberto com fibronectina (adsorção física).
- PAF- Arcabouço ativado por EDC/NHS e recoberto com fibronectina (imobilização covalente).
- PN- Arcabouço hidrolisado por NaOH
- PNF- Arcabouço hidrolisado por NaOH e recoberto com fibronectina (adsroção física).

- PNAF- Arcabouço hidrolisado por NaOH, ativado por EDC/NHS e recoberto com fibronectina(imobilização covalente).

Tabela 4.4- Valores de ângulo de contato medidos para os arcabouços com e sem fibronectina imobilizada na superfície, tendo ou não sido previamente tratados.

	Ângulo de Contato	
	Sem Fibronectina	**Com Fibronectina**
Sem modificação	70º ± 3	26º ± 5
Modificado por EDC/NHS	61° ± 5	40º ± 5
Modificado por NaOH	Superhidrofilicidade	29º ± 7
Modificado por NaOH + EDC/NHS	52º ± 2	41° ± 7

O tratamento estatístico dos valores de ângulo de contato obtidos para os diferentes arcabouços, com e sem proteína, mostrou que a incorporação da fibronectina alterou significativamente o ângulo de contato em todos os arcabouços quando comparados com os mesmos sem a proteína ($p<0,05$). Porém, entre os arcabouços modificados por fibronectina, tanto por adsorção física quanto por ligação covalente, não houve diferença significativa ($p>0,05$).

Wei *et. al.* (2009) mostraram que a fibronectina possui comportamento bifásico de interação com substrato, uma vez que esta apresenta boa adsorção sobre superfícies hidrofílicas (ângulo de contato igual a 0º) e comportamento um pouco menos intenso, mas ainda expressivo, sobre superfícies com características hidrofóbicas (ângulo de contato igual a 80º). Porém a natureza das ligações presentes na adsorção às superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas é diferente, o que altera o reconhecimento celular. A melhor resposta celular na interação com a fibronectina imobilizada sobre o substrato ocorre quando este possui características hidrofílicas. Em tal interação estão presentes ligações iônicas que mantêm a proteína na sua forma ativa, ou seja, uma conformação em que os grupamentos adesivos RGD estão expostos, o que não é observado sobre superfícies hidrofóbicas (Grinnell e Feld, 1982; Kowalczynska *et. al*., 2004; Wei *et. al.,* 2009).

Vallières *et. al.* (2007) mostraram que não só a molhabilidade da superfície, mas também os grupamentos presentes no substrato afetam o processo de imobilização. A adesão física da fibronectina ao substrato é promovida por ligações eletrostáticas e diferenças de cargas na interface, enquanto a imobilização química por ligação

covalente é mais específica. No caso da ativação por EDC/NHS, ao final do processo, estará presente na superfície do substrato o grupamento éster-NHS (Figura 3.1), que reage com resíduos de lisina livres. A fibronectina possui cerca de 76 resíduos de lisina por subunidade, estando vários destes livres e sujeitos à conjugação. Assim, a proteína ligada covalentemente ao substrato é forçada a uma conformação mais estendida (Vallières *et. al.,* 2007).

Assim, pela variação significativa no ângulo de contato entre os arcabouços com e sem proteína, pode-se dizer que a fibronectina foi imobilizada sobre as superfícies dos arcabouços de PHB (tanto por adsorção quando por ligação covalente) e, mesmo que possivelmente sob diferentes conformações, promoveu uma melhoria em sua molhabilidade.

A espectroscopia fotoeletrônica de raios–X (XPS) foi conduzida a fim de quantificar os átomos presentes nas superfícies dos arcabouços não modificados, hidrolisados e modificados pela imobilização de fibronectina, com ou sem tratamentos prévios. O PHB, matéria-prima utilizada nesta pesquisa, possui em sua composição alguns componentes, como: silício, fósforo, flúor e cálcio, além de carbono e oxigênio. Estes outros componentes estão presentes em baixa concentração e provavelmente têm por função estabilizar o PHB, evitando o decaimento de sua massa molecular ao longo do tempo de armazenamento. Assim, na Tabela 4.5, que lista, em porcentagem atômica, a quantidade de cada elemento encontrado para os diferentes arcabouços analisados, são apresentados somente os elementos de interesse para a detecção do efeito das modificações propostas, que são: carbono, oxigênio e nitrogênio, não somando, assim, 100% no total de cada amostra:

Tabela 4.5- Concentração, em porcentagem atômica, dos elementos presentes na superfície de cada amostra. (Fn= fibronectina).

	Porcentagem atômica (%a)			Razão atômica	
	C	**O**	**N**	**O/C**	**N/C**
Sem modificação	76,83	19,87	1,04	0,26	0,014
Modif. por Fn (PF)	77,01	21,34	1,65	0,28	0,021
Modif. por EDC/NHS + Fn (PAF)	74,13	22,29	1,70	0,30	0,023
Modif. por NaOH (PN)	69,53	27,73	1,02	0,40	0,015
Modif. por NaOH + Fn (PNF)	69,15	24,88	5,28	0,36	0,076
Modif. por NaOH + EDC/NHS + Fn (PNAF)	73,28	21,93	4,75	0,30	0,065

A Tabela 4.5 ilustra o aumento expressivo de nitrogênio presente nas superfícies das amostras PNF e PNAF, que só pode ter sido originado das moléculas de proteína. Ainda foi possível avaliar o forte efeito de adsorção protéica em superfícies superhidrofílicas (PNF) que possuem uma quantidade de nitrogênio ainda mais alta do que em PNAF. A pequena mudança na porcentagem de nitrogênio nas superfícies das amostras PF e PAF, em associação com os resultados já apresentados, sugere que estas também tenham incorporado moléculas de fibronectina, mas em menor intensidade do que as amostras previamente hidrolisadas. Através das razões atômicas N/C de cada amostra, foi possível detectar uma quantidade de proteína quase que quatro vezes maior nos arcabouços previamente hidrolisados. Esses dados tornam a hidrólise uma etapa fundamental para a ativação das superfícies de arcabouços poliméricos.

Os resultados apresentados na Tabela 4.5, em associação com os resultados obtidos por ângulo de contato, reafirmam a possibilidade de haver alguma diferença de conformação entre as proteínas imobilizadas sobre as diferentes superfícies de PHB. Observou-se que a concentração do átomo de nitrogênio, característico da presença de proteína, foi muito diferente quando comparados arcabouços com e sem tratamento de hidrólise, indicando diferentes concentrações protéicas sobre estas superfícies, enquanto o ângulo de contato não apresentou diferença significativa.

Para a determinação da presença de ligação covalente entre os arcabouços ativados e a fibronectina, foi analisado o pico C 1s, em que foram detectados três componentes: 284,8 eV; o componente a aproximadamente 286,5 eV; e o componente a

288,5-288,9 eV. Esses três componentes foram atribuídos, respectivamente, aos grupos C-C e/ou C-H; grupos C-N e/ou C-O; e grupos C=O e/ou O=C-O (Vallières *et. al.*, 2007). No caso das amostras PAF, PN e PNF, foi identificado mais um componente que foi associado a impurezas presentes no material. A Tabela 4.6 lista as porcentagens referentes às quantidades relativas dos componente C-C, C-N/C-O e C=O dos picos encontrados no espectro C 1s; as impurezas não foram levadas em consideração:

Tabela 4.6- Quantidades relativas dos componentes do espectro C 1s para cada diferente amostra (em porcentagem).

	C-C	**C-N/C-O**	**C=O**
Sem modificação	60%	26%	14%
Modificado por Fn (PF)	60%	26%	14%
Modificado por EDC/NHS + Fn (PAF)	56%	28%	14%
Modificado por NaOH (PN)	56%	20%	18%
Modificado por NaOH + Fn (PNF)	56%	30%	13%
Modificado por NaOH + EDC/NHS + Fn (PNAF)	55%	30%	15%

Através da análise da Tabela 4.6, não é possível observar mudanças na composição dos arcabouços que não foram submetidos ao tratamento por hidrólise, exceto pelo aumento de 2% dos grupamentos -CN/-CO na amostra PAF. Tendo em vista que se trata de um arcabouço hidrofóbico e com poucos sítios para ativação, o resultado está de acordo com o esperado. Em PF não foi detectada, pelo espectro de C 1s, a presença da proteína na superfície.

Quando analisados os arcabouços submetidos ao processo de hidrólise, é possível detectar grandes mudanças. A amostra PN reafirma o efeito de erosão de superfície provocado pelo tratamento, uma vez que as porcentagens de -CN/-CO e -CC diminuíram, indicando a retirada do contaminante nitrogenado da superfície do arcabouço e a quebra das cadeias poliméricas. Ainda é possível observar que a porcentagem do componente C=O/O=C-O também foi expressivamente aumentada, confirmando a incorporação de grupamentos oxigenados (grupos carboxílicos e hidroxílicos). Por esses resultados, pode ser confirmada a eficácia do tratamento por hidrólise.

A partir das análises das amostras PNF e PNAF, foi possível confirmar a presença de proteína imobilizada sobre os arcabouços. As amostras PNF e PNAF,

quando comparadas à PN, apresentaram aumento grande da quantidade referente ao componente –CN, evidenciando a presença da proteína nas suas superfícies. Porém, a baixa quantidade de grupamentos C=O presentes na amostra PNF, quantidade esta menor do que a observada nos arcabouços sem modificação, sugere que foi obtido um recobrimento protéico por adsorção física na sua superfície. Por outro lado, na amostra PNAF, o mesmo grupamento apresentou aumento quando comparado aos arcabouços sem modificação. O aumento desses grupamentos oxigenados, associado ao aumento do componente –CN, sugere a formação da ligação covalente (ligação peptídica: NH-C=O) na superfície da amostra PNAF (Vallières *et. al.*, 2007).

Análises de imagens de AFM das superfícies modificadas foram realizadas a fim de detectar diferenças na rugosidade (RMS) e avaliar a distribuição da fibronectina. Os valores encontrados para a rugosidade estão listados na Tabela 4.7. A fim de melhor avaliar a distribuição da proteína sobre as superfícies, foi feita, com base no eixo Z da superfície de cada amostra, a análise das possíveis mudanças de amplitude, cujos valores estão listados na Tabela 4.8. O alto desvio padrão observado nas medidas de AFM foi atribuído à grande heterogeneidade da superfície da amostra, com muitas reentrâncias características do processo de evaporação do solvente e muitos poros superficiais:

Tabela 4.7- Valores de rugosidade (RMS) medidos por AFM sobre superfícies de arcabouços de PHB expostos a diferentes estratégias de modificação (30 μm x 30 μm).

Amostra	**Rugosidade - RMS (nm)**
Sem modificação	434 ± 23
Modificado por Fn (PF)	451 ± 194
Modificado por EDC/NHS + Fn (PAF)	684 ± 138
Modificado por NaOH (PN)	1230 ± 286
Modificado por NaOH + Fn (PNF)	1202 ± 250
Modificado por NaOH + EDC/NHS + Fn (PNAF)	499 ± 77

Tabela 4.8- Avaliação da altura máxima encontrada no eixo Z, medidas por imagens de AFM 30 µm x 30 µm, sobre superfícies de diferentes arcabouços.

Amostra	Amplitude (nm)
Sem modificação	487 ± 19
Modificado por Fn (PF)	561 ± 144
Modificado por EDC/NHS + Fn (PAF)	515 ± 71
Modificado por NaOH (PN)	634 ± 3
Modificado por NaOH + Fn (PNF)	733 ± 29
Modificado por NaOH + EDC/NHS + Fn (PNAF)	533 ± 9

A partir da Tabela 4.7, foi possível avaliar o recobrimento protéico pela diferença das rugosidades entre cada arcabouço com e sem proteína. Levando-se em conta que sobre superfícies mais planas a proteína tem maior liberdade de arranjo conformacional do que sobre superfícies mais rugosas (Vallières *et. al.*, 2007) e que a estratégia de imobilização é um ponto de grande importância na determinação da conformação da proteína (Zang *et. al.*, 2007), a variação de rugosidade sobre as amostras PF e PAF já era esperada. Sugere-se que tais resultados estejam relacionados à variação conformacional da proteína.

Na amostra PF, como a rugosidade não apresentou variação quando comparada ao arcabouço sem modificação, pode-se sugerir que as proteínas ali presentes estavam acompanhando o relevo do substrato. Como já determinado pelos resultados de XPS, a quantidade de proteína presente nessas amostras foi baixa; considerando-se tratar de uma superfície com características hidrofóbicas, o recobrimento protéico não parece ter sido completo, o que pode ser observado pelo alto valor de desvio padrão. Nas amostras PAF a rugosidade aumentou quando comparada ao arcabouço sem modificação; nesses arcabouços, parece que os poucos pontos de ativação presentes promoveram efeito de especificidade de ligação, com possível distribuição irregular da proteína nestas superfícies, indicada pelo alto desvio padrão. Pela análise da Tabela 4.8, foi observado que não houve diferença de amplitude entre as amostras PAF e PF.

A alta rugosidade presente nas amostras PN remete mais uma vez ao efeito de erosão causado pela hidrólise, já mostrado nos espectros de XPS e no efeito de superhidrofilicidade. Quando modificado por fibronectina, tais amostras hidrolisadas apresentaram morfologias de superfície muito diferentes de acordo com a estratégia de

imobilização utilizada: enquanto nas amostras PNF a rugosidade se manteve muito próxima à do arcabouço hidrolisado, nas amostras PNAF a diminuição da rugosidade foi muito grande. Os resultados de rugosidade para PNF e PNAF, associados aos resultados obtidos por XPS, sugerem que houve grande recobrimento protéico destas superfícies.

Apesar de não terem sido conduzidos testes para avaliar a conformação da fibronectina imobilizada, algumas hipóteses podem ser levantadas com base nos estudos de Zang *et. al.* (2007) relacionados à comparação das propriedades biológicas de filmes de poli(tereftalato de etileno) recobertos por fibronectina por meio de adsorção ou conjugação. Estes autores mostraram que a saturação da fibronectina adsorvida sobre superfícies hidrofílicas é dada quando esta forma uma monocamada sobre o material. No caso de PNF, pode ter sido formada a monocamada de proteína que acompanhou o relevo da superfície. Na amostra PNAF, houve uma grande diminuição da rugosidade da superfície, o que pode estar relacionado ao efeito da ligação covalente. Uma hipótese para explicar tal comportamento é a formação de múltiplas camadas de proteína sobre o biomaterial (ilustrado na Figura 4.13). Nesse processo de imobilização, os pontos de ancoramento na proteína são grupamentos amino da lisina; como em cada subunidade da proteína existem aproximadamente 76 resíduos de lisina, a proteína é forçada a se desenovelar sobre os vários portos de ligação do substrato. Conforme o grupamento amino, que é carregado positivamente, vai sendo imobilizado sobre o substrato, a proteína passa a expor seus domínios negativos, formando uma superfície com cargas negativas concentradas. Essa superfície negativa promove a interação eletrostática de mais moléculas de fibronectina. Tal força de ligação é tão intensa que as proteínas são forçadas a se desenovelarem, formando uma nova camada adsorvida (Zang *et. al.,* 2007). Por esse processo, a fibronectina poderia ser imobilizada por diversas vezes, formando múltiplas camadas com alta estabilidade.

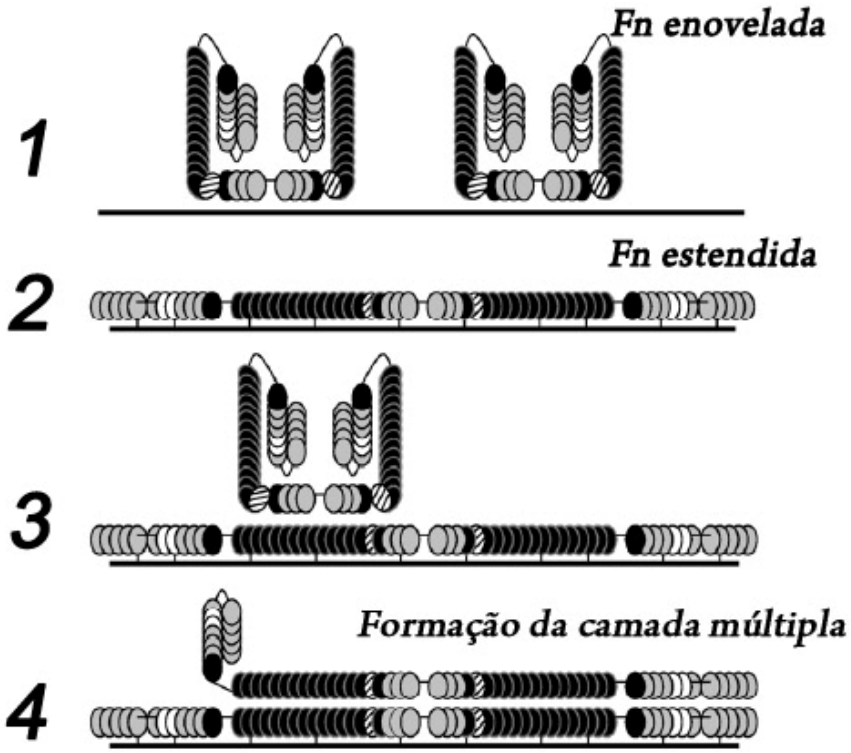


Figura 4.13- Esquema de formação de múltiplas camadas de fibronectina a partir de ligação covalente com o substrato (Adaptado de Zang *et. al.*, 2007).

A diminuição de amplitude, observada pela análise da Tabela 4.8, nos arcabouços PNAF, quando comparados a PN, pode estar relacionada à formação das múltiplas camadas por toda a superfície do arcabouço. Já o aumento de amplitude, visto nos arcabouços PNF, poderia ser atribuído à alta adsorção de proteínas na superfície, devido à grande afinidade promovida pelo fenômeno de superhidrofilicidade (Figura 4.14). A melhoria na molhabilidade da superfície promove maior adsorção e deposição de moléculas inorgânicas, como íons de Ca e P, e moléculas orgânicas, como proteínas e peptídeos (Brandão *et al*., 2010). O mesmo efeito pode ser visto em superfícies mais rugosas, por exemplo, superfícies com sulcos ou poros, por exporem maior região de contato (Dee *et al.*, 2002). Por ser um fenômeno dependente de interação de cargas de superfícies e não de sítios específicos de ligação, as proteínas devem estar adsorvidas por diferentes regiões da sua estrutura, gerando alta variação de amplitude quando analisado o eixo Z:

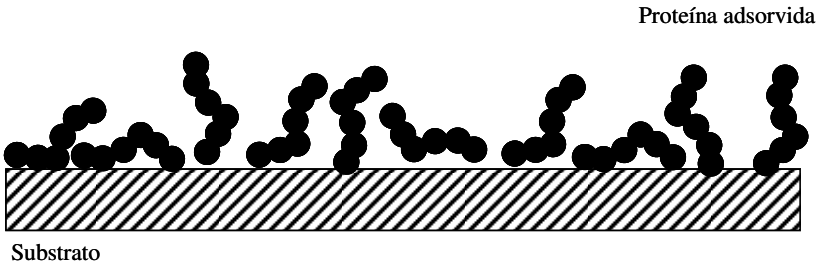


Figura 4.14- Esquema de adsorção de proteínas sobre superfícies muito hidrofílicas. Adaptado de Dee *et al.* (2002).

Com o objetivo de estimar as cargas da superfície, associando-as ao fenômeno de formação de múltiplas camadas, os arcabouços de PHB sem modificação, PN, PNAF e PAF foram submetidos à coloração pelo corante de carga positiva, cristal violeta. A água destilada foi utilizada como branco (0% de absorbância). Como o cristal violeta é um forte corante para o PHB mesmo que sem nenhuma modificação, foram avaliadas não só as absorbâncias das soluções de eluição do corante em metanol (dado quantitativo), mas também o quanto de corante restou fixado em cada arcabouço (dado qualitativo complementar). Os resultados estão expostos na Figura 4.15.

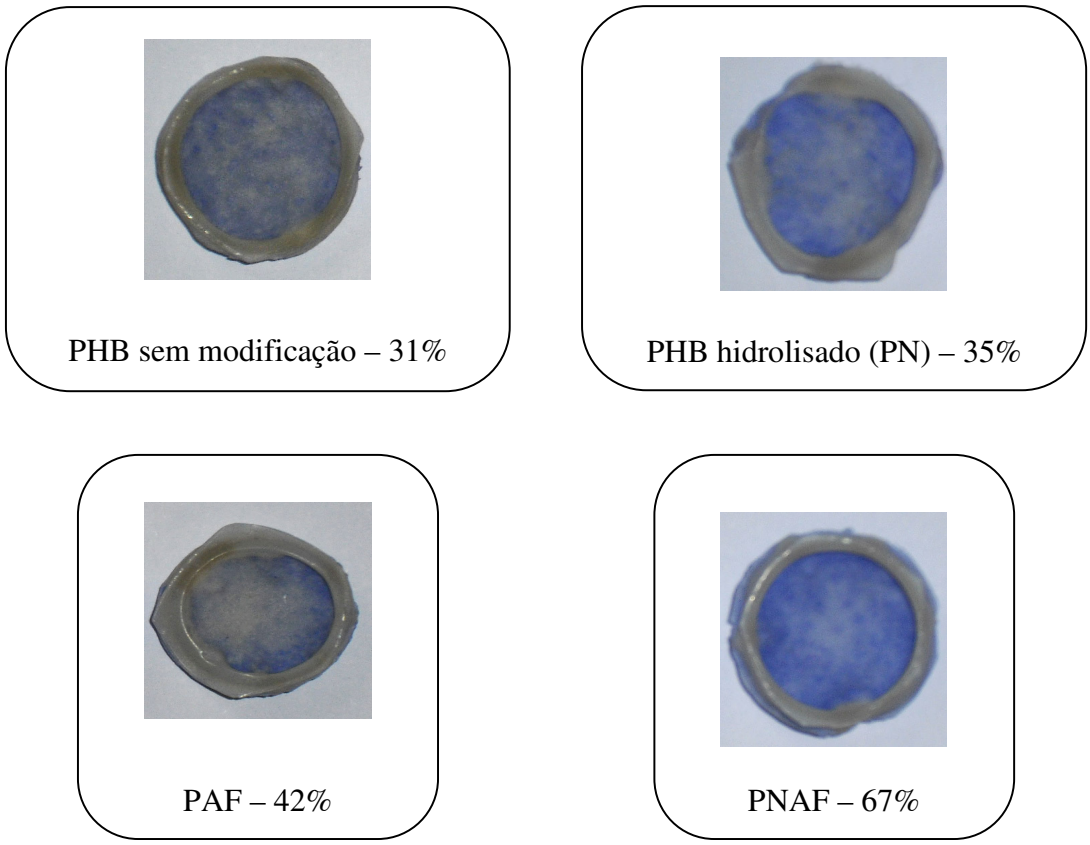


Figura 4.15- Arcabouços corados por cristal violeta, após eluição do corante por metanol, com seus respectivos valores de absorbância em porcentagem de absorção de luz

O cristal violeta colora os arcabouços em tons de azul e, quando as cargas negativas da superfície estão em alta concentração, a eluição com o metanol não consegue retirar todo o corante, deixando-o em diferentes tonalidades de azul. A partir das imagens da Figura 4.15, pode ser detectado aumento nas cargas da superfície dos arcabouços hidrolisados, tanto pela porcentagem quanto pela imagem do arcabouço corado. No caso da amostra PN, esse efeito se deve à incorporação de grupamentos carboxílicos na superfície. No caso dos arcabouços PNAF, esse efeito pode ser explicado pela possível ocorrência da formação de múltiplas camadas. No arcabouço PAF, a coloração não se mostrou tão intensa quanto em PNAF, assim como o valor encontrado para a absorbância. Tal resultado está relacionado à presença de poucos pontos de ancoramento da proteína nessas superfícies, devido à ocorrência de poucos sítios ativos para a carbodiimida. A partir das análises realizadas, é possível confirmar a

formação de superfícies mais negativas após a imobilização covalente da fibronectina sobre arcabouços previamente hidrolisados.

A Figura 4.16 mostra as imagens de AFM, em escala bidimensional, dos arcabouços modificados pelo recobrimento de fibronectina, ilustrando o que foi discutido anteriormente. A partir dessas imagens, foi possível observar não só o efeito da modificação por hidrólise na superfície do arcabouço de PHB, como também a diferença na disposição da fibronectina imobilizada.

Nos arcabouços PF e PAF, foi possível observar modificação da morfologia de superfície quando comparados ao arcabouço sem modificação, mostrando um efeito de recobrimento. Porém entre esses a morfologia de superfície não apresentou diferença expressiva, com a proteína parecendo estar numa conformação estendida. Assim, nos arcabouços não-hidrolisados, a ativação por EDC/NHS indicou não causar diferença na conformação da proteína imobilizada.

A Figura 4.16(b) mostra que o tratamento por hidrólise causou grande erosão da superfície e, quando avaliados tais arcabouços com fibronectina imobilizada, a morfologia da superfície se mostrou muito diferente em relação aos arcabouços não-hidrolisados. Comparando as amostras PNF e PNAF às amostras não-hidrolisadas, a proteína parece não estar numa conformação estendida. Nas amostras PNF também foi possível observar o efeito de recobrimento de superfície quando comparado à amostra PN. Na amostra PNAF, observaram-se muitas formas arredondadas, originadas, provavelmente, por aglomerados protéicos nas superfícies (indicados por seta na Figura 4.16 (f)). Essas formas arredondadas não estão presentes em grande concentração nas amostras PNF (indicada por seta na Figura 4.16(d)), caracterizando possível diferença na disposição das proteínas imobilizadas nas superfícies PNF e PNAF.

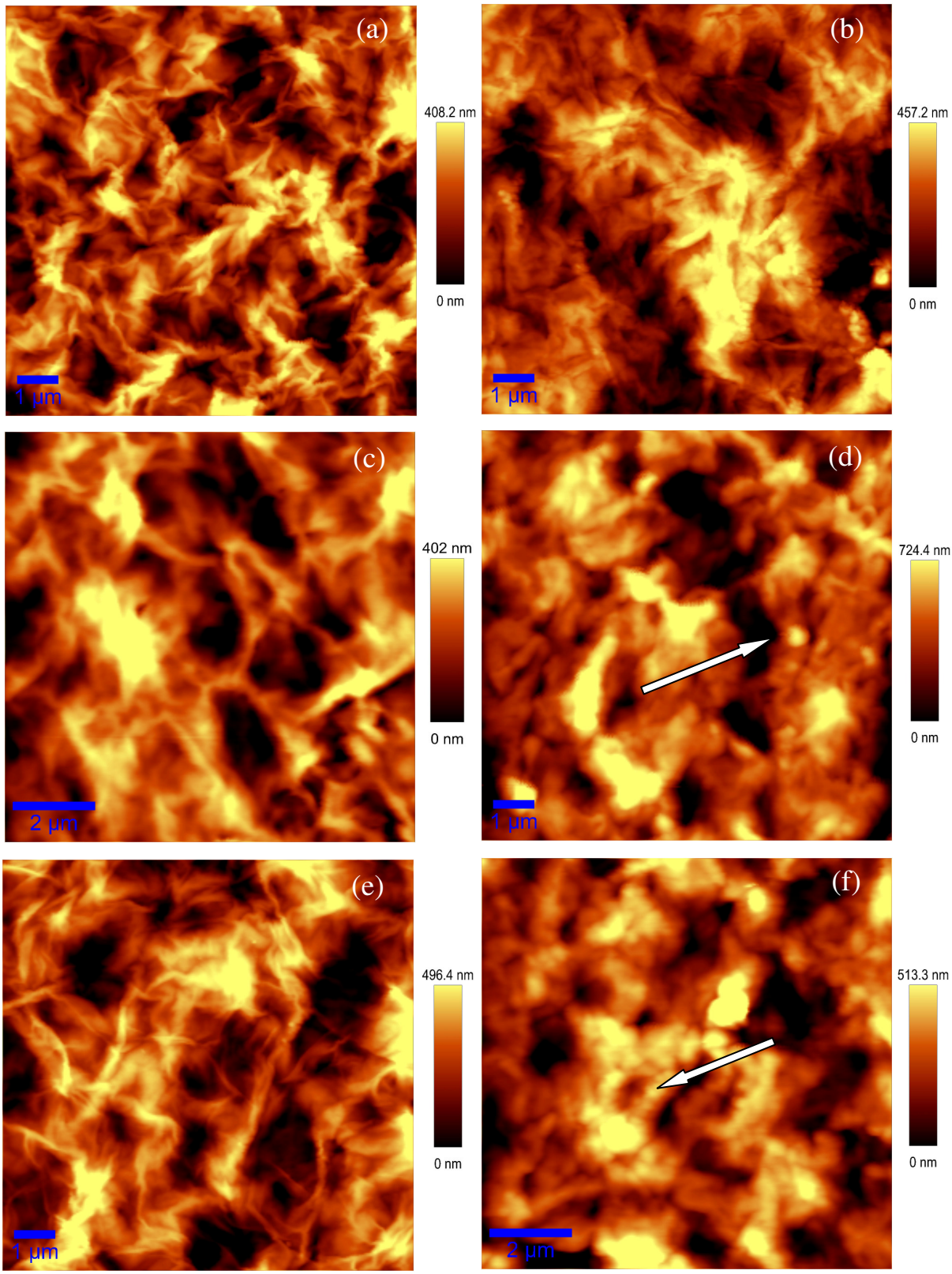


Figura 4.16- Imagens de topografia obtidas por AFM 10 x 10 µm da superfície dos arcabouços Sem modificação (a); PN (b); PF (c); PNF (d); PAF (e) e PNAF(f).

4.5. Estimativa do efeito de dessorção

A estabilidade das ligações produzidas entre o substrato de PHB e a fibronectina pelos processos de adsorção física e ligação covalente foi estudada pela avaliação do efeito de dessorção da proteína. As amostras utilizadas na análise aqui apresentada foram: arcabouço sem modificação, arcabouços com fibronectina adsorvida (PF) e arcabouço hidrolisado com fibronectina ligada covalentemente (PNAF). Os extratos utilizados foram os mesmo produzidos para a análise de citotoxicidade, obtidos a partir da exposição das amostras ao meio de cultura sem soro, por 24 horas. A fim de descontar a influência de componentes liberados pela degradação do arcabouço ao longo das 24 horas de produção, o extrato do arcabouço sem modificação foi utilizado como branco para a leitura no NanoDrop. A Tabela 4.9 lista os valores encontrados para cada amostra:

Tabela 4.9- Valores de absorbância obtidos a partir da leitura dos extratos dos arcabouços de PHB com diferentes modificações.

	Absorbância (D.O.)
Sem modificação	0,00
Modificado por Fn (PF)	0,26
Modificado por NaOH + EDC/NHS + Fn (PNAF)	0,06

A partir da observação da Tabela 4.9, é possível detectar aumento de mais de quatro vezes no valor da absorbância medida para arcabouços com proteína adsorvida, quando comparados com arcabouços com proteína ligada covalentemente. Por esses dados, pode-se inferir que a imobilização da fibronectina por adsorção física não possui força muito grande. O aumento do valor lido no NanoDrop só pode ser referente à proteína presente no meio, uma vez que o meio de cultura para a produção dos extratos não possuía soro e os possíveis interferentes oriundos da degradação do PHB foram anulados pela utilização do arcabouço sem modificação como branco.

A pequena variação de leitura obtida para os arcabouços PNAF deve estar relacionada à liberação das moléculas de fibronectina adsorvidas na última camada protéica, em que a imobilização já não deve apresentar traço muito forte devido à saturação da superfície.

Custódio *et. al.* (2009) mostraram o efeito da natureza da ligação à fibronectina sobre membranas de quitosana quando estas foram expostas a meio de cultura. Segundo os autores, após 24 horas de exposição, as membranas cuja proteína foi imobilizada covalentemente resistiram muito mais ao efeito de dessorção do que as membranas cuja proteína foi apenas adsorvida. Ainda na mesma pesquisa, quando avaliado o efeito da natureza da ligação em cultura de células *in vitro*, foi mostrado que as duas superfícies foram igualmente eficazes no processo inicial de adesão celular, porém, após sete dias de cultivo *in vitro*, o processo de proliferação foi muito melhor em superfícies com proteína ligada covalentemente do que nas superfícies com proteína adsorvida. Uma possível explicação para esse fenômeno é que, por se soltar do substrato para o sobrenadante pelo efeito de dessorção, a fibronectina presente no meio de cultura pode ter induzido as novas células oriundas da divisão meiótica a se ligarem à proteína que estava solta. Assim, o meio de cultura com fibronectina presente no sobrenadante poderia ter criado um falso ambiente para a ligação celular.

4.6. Análise citotóxica

A análise citotóxica foi conduzida sobre arcabouços de PHB sem modificação, arcabouços modificados pela adsorção física de fibronectina (PF) e arcabouços modificados pela ligação covalente da fibronectina sobre superfícies previamente hidrolisadas (PNAF). Os controles utilizados no experimento foram:

- Fenol 2% - por seu efeito extremamente tóxico para as células, foi utilizado como controle positivo (tóxico), garantindo a morte de todas as células em cada poço.
- Poliestireno – por não causar nenhuma perturbação ao crescimento celular, foi utilizado como controle negativo (não-tóxico).
- Controle – foram chamados de "controle" os poços onde as células cresceram em contato somente com o meio de cultura, não sendo expostos a nenhum extrato.
- Controle de *feedback* – nestes poços foram adicionados os reagentes, para que no valor final lido pelo espectrofotômetro pudesse ser descontado o valor de *feedback* do reagente; em tais poços não havia qualquer resquício de célula.

A primeira análise conduzida do teste multiparamétrico de viabilidade celular foi o XTT, em que a avaliação da atividade respiratória celular foi realizada pela quantificação, por espectrofotometria, da mudança da coloração amarela do sal

tetrazólio hidrossolúvel (XTT) para a coloração laranja, característica do composto de formazana. Tal conversão do XTT em formazana acontece por ação da enzima desidrogenase presente na mitocôndria. Os resultados para esse teste estão expostos na Figura 4.18. Através dessa ilustração, é possível dizer que a atividade respiratória das células não foi afetada negativamente pela exposição aos extratos, pois nenhum deles está abaixo do valor encontrado para o controle negativo (poliestireno). Os extratos dos arcabouços apresentaram efeito de aumento da atividade respiratória quando comparados ao poliestireno. Porém, no arcabouço PF, a atividade respiratória ficou abaixo dos valores encontrados para o arcabouço sem modificação e para o PNAF, sugerindo que o feito de dessorção da Fn discutido no item anterior possa realmente ter causado o desprendimento celular das placas de cultivo para o substrato. Tal desprendimento diminuiria a quantidade celular presente em cada poço, o que acarretaria uma medida menor para respiração celular dos poços, quando comparados ao extrato dos demais arcabouços:

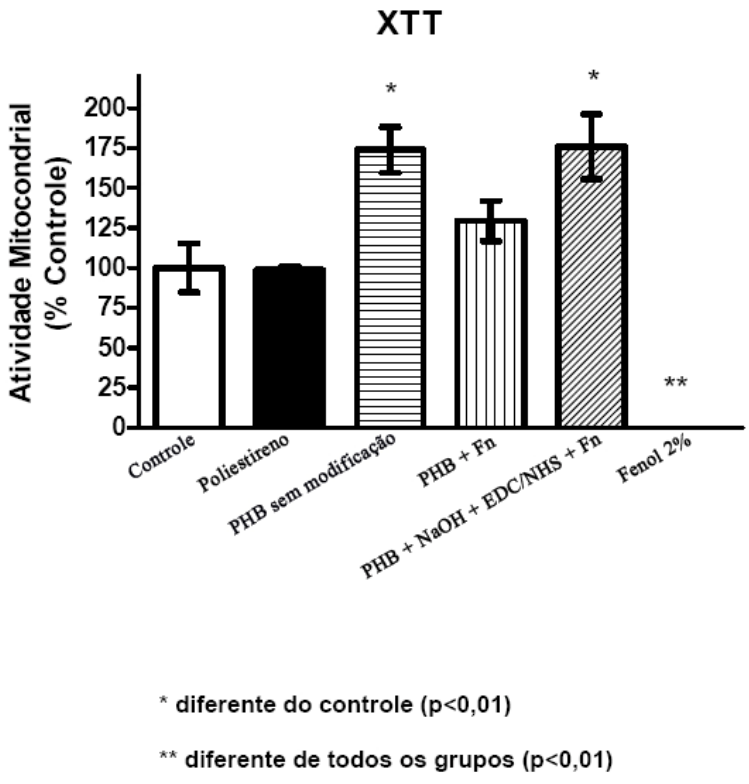


Figura 4.17- Gráfico da análise de citotoxicidade da atividade respiratória de fibroblastos. Constam os valores encontrados para cada amostra e os controles, e as suas respectivas barras de erro.

A segunda análise realizada foi a capacidade de incorporação do corante vermelho neutro pelas células presentes nos poços. Esse teste avaliou a sobrevivência/viabilidade celular, uma vez que o corante é englobado pelos lisossomos acumulados na membrana íntegra. Ao final da análise, as células presentes nos poços foram mortas e fixadas para a eluição do corante e leitura da intensidade da coloração das soluções em espectrofotômetro. O gráfico da Figura 4.18 mostra os resultados obtidos nesse teste para cada mostra. É possível dizer que os arcabouços testados não apresentaram caráter tóxico para as células, uma vez que não houve diferença significativa entre os valores encontrados para os diferentes extratos dos arcabouços e o controle celular (que não foi exposto a nenhum tipo de extrato). Mesmo sem apresentar significância estatística, é possível observar valor um pouco mais baixo quando observado o arcabouço PF, o que pode estar reafirmando a discussão mencinada no parágrafo anterior:

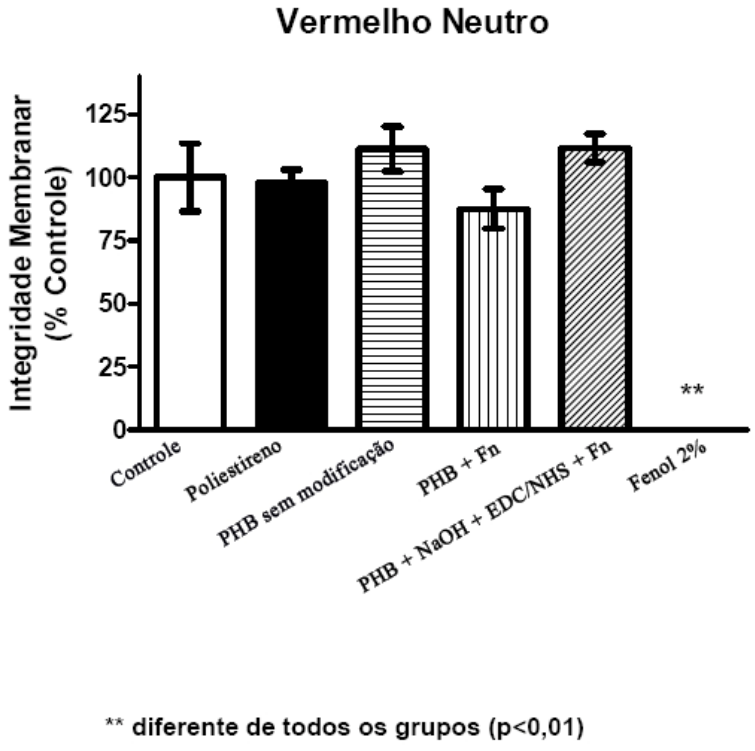


Figura 4.18- Gráfico da análise de citotoxicidade da incorporação do corante vermelho neutro pelos lisossomos dos fibroblastos. Constam os valores encontrados para cada amostra e os controles, e as suas respectivas barras de erro.

O último teste realizado para a viabilidade celular em contato com os extratos dos arcabouços com e sem modificação foi a inclusão do corante cristal violeta no material genético das células já mortas e fixadas nos poços. Por esse teste, foi possível avaliar a densidade celular presente em cada poço. Os resultados estão expostos no gráfico da Figura 4.19. Como era esperado, os arcabouços de PHB sem modificação e PNAF não causaram efeito de variação da concentração celular nos poços, ao passo que o arcabouço PF mostrou-se significativamente diferente dos demais arcabouços testados e dos controles celular e negativo. Reafirmou-se a diminuição da densidade celular presente nesses poços:

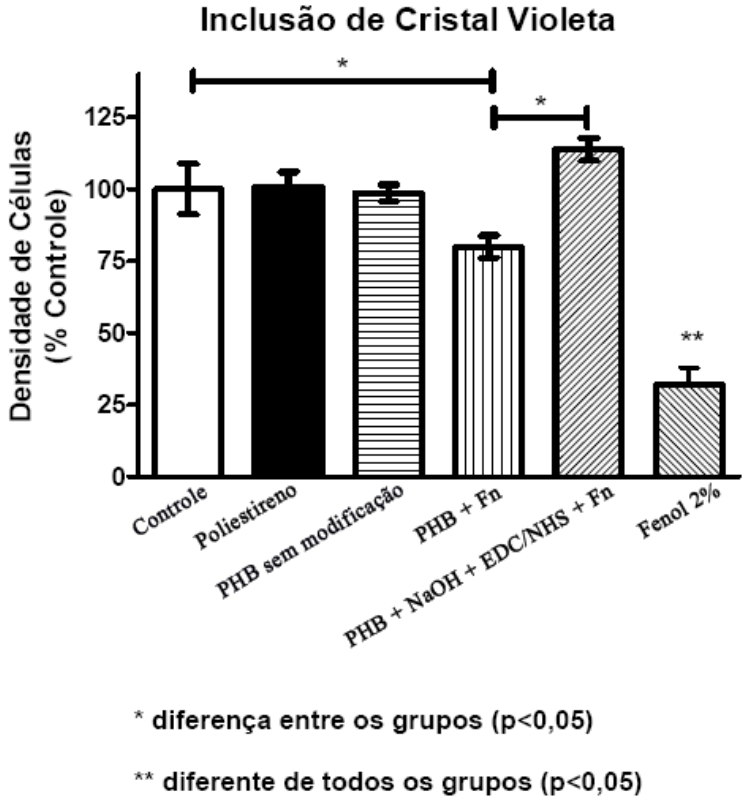


Figura 4.19- Gráfico da análise de citotoxicidade da inclusão do corante cristal violeta no DNA dos fibroblastos. Constam os valores encontrados para cada amostra e os controles, e as suas respectivas barras de erro.

Ao final do teste de citotoxicidade, foi possível concluir que o arcabouço de PHB sem modificação e os modificados com fibronectina ligada de forma covalente ou imobilizada por adsorção física não apresentaram efeito tóxico para as células. Todos

foram aprovados em todos os três testes propostos, mostrando resultados estatisticamente semelhantes ou acima dos encontrados para os controles negativo (poliestireno não-tóxico) e celular (poços de cultivo sem contato com qualquer tipo de extrato). Também pelos testes anteriormente referidos foi possível avaliar o efeito da dessorção da fibronectina adsorvida aos arcabouços (PF), mostrando o desprendimento celular dos poços de cultivo, o que, possivelmente, causará efeito não desejado quando tais arcabouços forem testados em cultura *in vitro*, podendo levar ao desprendimento das células da superfície dos arcabouços para o sobrenadante, como foi visto por Custódio *et. al*. (2009).

4.7. Considerações finais

Ao final de cada processo de modificação foi obtido um arcabouço com diferentes características de superfície, como descrito a seguir:

- Modificado por Fn (PF) – Apesar da quantidade de Fn detectada por XPS ter sido muito pequena, o ângulo de contato desta superfície foi baixo, sugerindo que a modificação causou efeito positivo na molhabilidade pela imobilização da proteína por adsorção (comportamento bifásico da Fn). Pela análise de AFM, foi avaliada a diminuição da rugosidade quando comparada a arcabouços não modificados, sugerindo um recobrimento protéico da superfície. Assim, nessas superfícies, as moléculas de fibronectina poderiam estar numa conformação estendida e em quantidade suficiente para alterar a energia de superfície, diminuindo o ângulo de contato e aumentando a biocompatibilidade. Porém as fracas forças de adsorção presentes nessa interface não permitiram a estabilidade da proteína (análise de dessorção).

- Modificado por NaOH + Fn (PNF) – A análise de XPS detectou grande quantidade de proteína nesta superfície e a avaliação da energia de ligação presente nos picos C 1s mostrou que a estratégia de imobilização adotada foi por adsorção. Por ser uma superfície com efeito de superhidrofilicidade, devido à grande quantidade de grupamentos oxigenados e à alta rugosidade, a adsorção protéica foi muito alta. Pela análise de AFM, foi possível sugerir que o recobrimento de superfície foi formado por uma monocamada que acompanhou o relevo da amostra.

- Modificado por EDC/NHS + Fn (PAF) – A análise de XPS não detectou a presença de grande quantidade de Fn nestas superfícies, muito provavelmente porque

para a ativação das superfícies é necessário que estas possuam sítios de ligação para a EDC/NHS. Os sítios presentes nas superfícies não modificadas de PHB se limitam as terminações de cadeias. Sendo assim, a ativação teve pouco efeito nessas superfícies. O efeito de incorporação de proteína também pode ser confirmado a partir da diminuição do ângulo de contato, quando comparada ao arcabouço modificado somente por EDC/NHS.

- Modificado por NaOH + EDC/NHS + Fn (PNAF) – A hidrólise com NaOH promoveu a erosão da superfície, levando à exposição de muitos sítios para a ligação de EDC/NHS, ou seja, formando superfícies passíveis de serem ativadas para a ligação covalente com a proteína. Por XPS não só foi detectada a presença de grande quantidade de proteína nessas superfícies, como também a formação da ligação covalente pela análise dos picos em C1s. As análises de AFM mostraram a diminuição da rugosidade, relacionada, possivelmente, à formação da multicamada protéica nas superfícies. A estabilidade dessa interface pode ser avaliada pelo seu bom desempenho no teste de dessorção.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

5.1. Conclusões

- A produção dos arcabouços porosos de PHB pela técnica de lixiviação de sal foi eficaz, empregando um período de dois dias para imersão em água destilada sob agitação constante.
- A utilização de NaCl com alta granulometria como agente porogênico possibilitou a produção de arcabouços com uma fina camada de PHB sobre a região porosa com boa distribuição de poros no volume total do material. Possibilitou, também, a obtenção de arcabouços com tamanho médio de poros e porosidade na faixa adequada para a bioengenharia óssea: (124 ± 47) μm e (41 ± 6)%, respectivamente.
- A modificação por hidrólise introduziu grupamentos oxigenados pela quebra das cadeias poliméricas e promoveu um grande aumento da rugosidade da superfície, levando esta ao efeito de superhidrofilicidade. Nessas superfícies, a imobilização de fibronectina foi quantitativamente mais expressiva, independentemente de terem passado pelo processo de ativação por EDC/NHS.
- Nos arcabouços não-hidrolisados, a etapa de ativação com EDC/NHS não influenciou de forma significativa a quantidade de fibronectina imobilizada. Assim, o tratamento de hidrólise mostrou ser uma etapa importante no processo de ativação de superfícies por EDC/NHS.
- Foi possível, pelas análises de AFM, sugerir que houve diferença de morfologia entre as moléculas de fibronectina imobilizadas por adsorção física ou por ligação covalente sobre as superfícies dos arcabouços hidrolisados (PNF e PNAF).
- Pela análise de dessorção, foi possível avaliar a maior estabilidade da proteína quando ligada covalentemente sobre a superfície dos arcabouços.
- O teste multiparamétrico de viabilidade celular considerou os materiais não-citotóxicos.
- Considerando-se a estabilidade da ligação e a quantidade de proteína imobilizada sobre o arcabouço, é possível sugerir que o arcabouço de PHB modificado

por NaOH e ativado por EDC/NHS apresentou o maior potencial para aplicação em bioengenharia de tecidos.

5.3. Sugestões para trabalhos futuros

- Analisar as propriedades mecânicas do arcabouço poroso de PHB, a fim de promover um bom desempenho deste para o carregamento celular quando testado *in vitro* e *in vivo*.
- Avaliar o tempo de degradação do arcabouço quando implantado no organismo.
- Determinar a conformação da fibronectina imobilizada sobre a superfície dos arcabouços por análises de dicroísmo circular e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), por exemplo.
- Avaliação da influência da conformação da fibronectina imobilizada sobre os processos de adesão e proliferação celular.
- Estudar o efeito do recobrimento protéico sobre a organização celular, avaliando aspectos como: a capacidade de organização do citoesqueleto quando em contato com tais superfícies, a produção de matriz extracelular e a formação do novo tecido.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2010, "Biologia molecular da célula" 5ª edição, pp. 125-152, Editora Artmed, Porto Alegre.

ALVES DA CUNHA, M.A., SILVA, S.S., CARVALHO, W., SANTOS, J.C., 2005, "Uso de células imobilizadas em gel de PVA:uma nova estratégia para produção biotecnológica de Xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar" *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 26, n. 1, p. 61-70

ARIMA, Y., IWATA, H., 2007, "Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers" *Biomaterials*, v. 28, pp. 3074–3082

ATALA, A, 2007, "Engineering tissue, organs and cells" *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v.1, pp. 83-96.

BARBANTI, S.H., ZAVAGLIA, C.A.C, DUEK, E.A.R, 2005, "Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos" *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, nº 1, pp. 13-21.

BISSON, I., *et al.*, 2002, "Acrylic acid grafting and collagen immobilization on poly(ethyleneterephthalate) surfaces for adherence and growth of human bladder smooth muscle cells" *Biomaterials*, v. 23, pp. 3149–3158

BORA, U., CHUGH, L., NAHAR, P., 2002, "Covalent immobilization of proteins onto photoactivated polystyrene microtiter plates for enzyme-linked immunosorbent assay procedures" *Journal of Immunological Methods*, v. 268, pp. 171– 177

BRANDÃO, M.L., ESPOSTI, T.B.D., BISOGNIN, E.D., HARARI, N.D., VIDIGAL JR, G.M., CONZ, M.B., 2010, "Superfície dos Implantes Osseointegrados x Resposta Biológica" *Revista Implantnews*, v. 7, n°. 1, pp. 95-101.

CARVALHO, A.C, 1997, "Aspectos tecnológicos e mercadológicos da reciclagem de plásticos descartados de lanchonetes" Dissertação de mestrado, Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano (IMA/UFRJ) Rio de Janeiro, Brasil.

CHEN, GUO-QIANG, WU, Q., 2005, "The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials" *Biomaterials*, v. 26, pp. 6565–6578.

CROLL, T.I., O'CONNOR, A.J., STEVENS, G.W., COOPER-WHITE, J.J, 2004 "Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: Physical, chemical, and theoretical aspects" *Biomacromolecules*, v. 5, pp. 463-473.

CUSTÓDIO, C.A., ALVES, C.M., REIS, R.L., MANO, J.F., 2009, "Immobilization of fibronectin in chitosan substrates improves cell adhesion and proliferation" *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, DOI: 10.1002/term.

DEE, K.C., PULEO, D.A., BIZIOS, R., 2002, "An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions", pp. 1-247, Editora John Wiley & Sons, Nova Jersey.

DE-DEUS, G., *et. al.*, 2009, "Optimal Cytocompatibility of a Bioceramic Nanoparticulate Cement in Primary Human Mesenchymal Cells" *Journal of Endodontics*, v.35, n. 10, pp. 1387-1390.

DUNKELMAN, N.S., *et al.*, 1995, "Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in a closed bioreactor system" *Biotechnology and Bioengineering*, v. 46, pp. 299-305.

ELIA, C.N., LIMA, J.H.C., SANTOS, M.V., 2008, "Modificações na superfície dos implantes dentários: da pesquisa básica à aplicação clínica" *Revista Implantnews*, v. 5, nº. 5, pp. 467-76.

FREED LE, VUNJAK-NOVAKOVIC G, "Tissue Engineering Bioreactors". In: LANZA RP, LANGER R, CHICK WL, 1997, "Principles of tissue engineering", 2ª edição, pp. 143-156, USA: R.G. Landes Co, Austin - Texas.

FREIER, T., KUNZE, C., NISCHAN, C., KRAMER, S., STERNBERG, K., SA, M., HOPT, U.T., SCHMITZ, K., 2002, "In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patchbased on poly(3-hydroxybutyrate)" *Biomaterials*, v. 23, pp. 2649–2657.

GILDING, D.K., 1981, "Biodegradable polymers". In *Biocompatibility of Clinical Implants Materials*, Williams DF (ed.), pp. 209-223, CRC Press: Boca Raton, USA.

GILLES, M.A., HUDSON, A.Q., BORDERS, C.L.JR., 1990, "Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution" *Analytical Biochemistry*, v. 189, pp. 244-248

GOLDSTEIN, J., *et al.*, 2002, "Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis" 3ª edição, Editora Kluwer Academy/Plenum Publishers, Nova York

GRIFFITH, L.G., 2000, "Polymeric biomaterials" *Acta materialia*, v. 48, pp. 26-277.

GRINNELL, F., FELD, M.K., 1982, "Fibronectin Adsorption on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces Detected by Antibody Binding and Analyzed during Cell Adhesion in Serum-containing Medium" *The Journal of Biological Chemistry*, v. 257, nº. 9, pp. 4888-4893.

GROSSKINSKY, U., 2006, "Biomaterial regulations for tissue engineering" D*esalination*, v. 199, pp. 265–267.

HILBORN, J., BJURSTEN, L., 2007, "A new and evolving paradigm for biocompatibility" *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 1, pp. 110-119.

HILDEBRAND, K.A., GALLANT-BEHM, C.L., KYDD, A.S., et al., 2005, "The basic of soft tissue healing and general factors that influence such healing" *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, v. 13, pp. 136-144.

HOLLINGER, J.O., BATTISTONE, G.C., 1986, "Biodegradable bone repair materials - synthetic-polymers and ceramics" *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 207, pp. 290-305.

HORBETT, T.A., SCHWAY, M.B., RATNER, B.D., 1985, "Hydrophilic-hydrophobic copolymers as cell substrates - effect on 3t3 cell-growth rates" *Journal of Colloid Interface Science*, v. 104, pp. 28–39

HUTMACHER, D.W., 2000, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage" *Biomaterials*, v. 21, pp. 2529-2543.

KAI, Z., YING, D., CHEN, GUO-QIANG, 2003, "Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates" *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, pp. 115–123

KARAGEORGIOU, V., KAPLAN, D., 2005, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis" *Biomaterials*, v. 26, pp. 5474–5491

KOWALCZYNSKA, H.M., NOWAK-WYRZYKOWSKA, M., KOŁOS, R., DOBKOWSKI, J., KAMINSKI, J., 2004, "Fibronectin adsorption and arrangement on copolymer surfaces and their significance in cell adhesion" *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v.72A, n. 2, pp. 228-236.

KRAMMER, A., LU, H., ISRALEWITZ, B., SCHULTEN, K., VOGEL, V, 1999, "Forced unfolding of the fibronectin type III module reveals a tensile molecular

recognition switch" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 96, pp. 1351–1356.

LANGER, R., VACANTI, J.P., 1993, "Tissue Engineering" S*cience,* V. 260, pp. 920-926.

LENZ, R.W., MARCHESSAULT, R.H., 2005, "Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology" *Biomacromolecules*, v. 6, n 1, pp. 1-8.

LI ,S.T., 1995, "Biologic biomaterials: tissue-derived biomaterials (collagen)". In: *The USA Biomedical Engineering Handbook*, Bronzino JD (ed.), pp.627-647, CRC Press: Boca Raton, USA.

LUNDBLAD, R.L., NOYES, C.M., 1984, "Chemical reagents for protein modification", v. 2, pp.108-110, CRC Press, Nova York.

MA, Z., GAO, C., GONG, Y., SHEN, J., 2005, "Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor" *Biomaterials*, v. 26, pp. 1253–1259

MA, Z., MAO, Z., GAO, C., 2007, "Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering" *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 60, pp. 137–157.

MASSIA, S.P., HUBBELL, J.A., 1991, "An RGD spacing of 440nm is sufficient for integrin aVb3-mediated fibroblast spreading and 140nm for focal contact and stress fiber formation" *The Journal of Cell Biology*, v. 114, pp. 1089–100

MENDONÇA, R.H., 2008, "Imobilização de fibronectina na superfície de suportes porosos de PHB para aplicação em engenharia óssea" Dissertação de mestrado, Instituto Alberto Luis Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa em Engenharia, Rio de Janeiro, Brasil.

MIDDLETON, J.C., TIPTON, A.J., 2000, "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices" *Biomaterials*, v. 21, pp. 2335-2346.

MIKOLAJCZYK, M., KIELBASINSKI, P., 1981, "Recent developments in the carbodiimide chemistry" *Tetrahedro*n, v. 37, pp. 233-284

MISRA, S.K., VALAPPIL, S.P., ROY, I., BOCCACCINI, A.R., 2006, "Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications", *Biomacromolecules,* v. 7, pp 2249-2258.

MORRA, M., 2006, "Biochemical modification of titanium surfaces: peptides and ECM proteins*" European Cells and Materials*, v. 1 2, pp. 1-15.

MOULEDER, J.F., STICKLE, W.F., SOBOL, P.E., BOMBEN, K.D., 1992, "Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy" editor: Chastain, J., Perkin-Elmer Corporation, Physical Electronics Division, Eden Prairie, Minnesota, Estados Unidos.

MULLENDER, M.G., HUISKES, R., 1995, "Proposal for the regulatory mechanism of Wolff´s law" *Journal of Orthopaedic Research*, v. 13, pp. 503-512.

NAGAI, M., HAYAKAWA, T., MAKIMURA, M., YOSHINARI, M., 2006, "Fibronectin immobilization using water-soluble carbodiimide on poly-l-lactic acid for enhancing initial fibroblast attachment" *Journal of Biomaterials Applications*, v. 21, pp. 33-47

NAHAR, P., BORA, U., 2004, "Microwave-mediated rapid immobilization of enzymes onto an activated surface through covalent bonding" *Analytical Biochemistry*, v. 328, pp. 81–83

NAHAR, P., WALI, N.M., GANDHI, R.P., 2001, "Light-Induced Activation of an Inert Surface for Covalent Immobilization of a Protein Ligand" *Analytical Biochemistry*, v. 294, pp. 148–153

NAIK, S., VENU GOPAL, S.K., SOMAL, P., 2008, "Bioproduction of polyhydroxyalkanoates from bacteria: a metabolic approach" *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, pp. 2307–2314.

NAM, K., KIMURA, T., KISHIDA, A., 2007, "Preparation and characterization of cross-linked collagen-phospholipid polymer hybrid gels" *Biomaterials*, v.28, pp. 1-8

NASCENTE, P.A.P., 2005, "Materials characterization by X-ray photoelectron spectroscopy" *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v 228, pp. 145-150.

NAZAROV, R., JIN, H-J., KAPLAN, D.L., 2004 "Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin" *Biomacromolecules,* v. 5, pp. 718-726

NOMI, M., ATALA, A., COPPI, P.D., SOKER, S., 2002, "Principals of neovascularization for tissue engineering" *Molecular Aspects of Medicine*, v. 23, pp. 463-483.

ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S, 2006, "Biomateriais – fundamentos e aplicações", pp. 239-249, Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro.

PALECEK, S.P., *et al.*, 1997, "Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratrum adhesiveness" *Nature*, v. 385, pp. 537–40

SADER, M., FERREIRA, M., DIAS, M., 2006, "Preparação e Caracterização de Estruturas Porosas de Poli(3-hidroxibutirato)" *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 16, nº. 1, pp. 12-18.

SCHENSE, J.C., HUBBELL, J.A., 2000, "Three-dimensional migration of neurites is mediated by adhesion site density and affinity" *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, pp. 6813–6818

SEAL, B.L., OTERO, T.C., PANITCH, A., 2001, "Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration" *Materials Science and Engineering*, v. 34, pp. 147-230.

SHIN, H., JO, S., MIKOS, A.G., 2003, "Biomimetic materials for tissue engineering" *Biomaterials*, v. 24, pp. 4353–4364.

SUDESH, K., ABE, H., DOI, Y., 2000, "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters" *Progress in Polymer Science*, v. 25, pp. 1503-1555.

THIRÉ, R.M.S.M., MEIGA, T.O., ANDRADE, L.R., 2006, "Effect of surface treatment on the biocompatibility of phb films" In: CD dos Anais do 4º COLAOB, Caxambu-MG, Brasil.

THIRÉ, R.M.S.M., MEIGA, T.O., DICK, S., ANDRADE, L.R., 2007, "Functionalization of biodegradable polyester for tissue engineering applications" *Macromolecular Symposia*, v. 258, nº 1, pp. 38-44.

TSOUGENI, K., PETROU, P.S., TSEREPI, A., KAKABAKOS, S.E, GOGOLIDES, E., 2009, "Nano-texturing of poly(methyl methacrylate) polymer using plasma processes and applications in wetting control and protein adsorption" *Microelectronic Engineering*, v. 86, pp. 1424–1427.

VALLIÈRES, K., CHEVALLIER, P., SARRA-BOURNET, C., TURGEON, S., LAROCHE, G., 2007, "AFM imaging of immobilized fibronectin: Does the surface conjugation scheme affect the protein orientation/conformation?" *Langmuir*, v. 23, nº 19, pp. 9745-9751

VERCIK, L.C.O., ASSIS, C.M., LIA FOOK, M.V., SANTOS, M.L., GUASTALDI, A.C., 2003, "Recobrimento de apatitas "in vitro" sobre titânio – Influência do tratamento térmico" *Eclética Química, São Paulo*, v. 28, nº 1, pp. 25-31

VERT, M., 2007, "Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future" *Progress in Polymer Science*, v.32, pp. 755–761.

VERT, M., LI, M.S., SPENLEHAUER, G., GUERIN, P., 1992, "Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters" *Journal of Material Science*, v. 3, pp. 432-46

WEI, J., IGARASHI, T., OKUMORI, N., IGARASHI, T., MAETANI, T., LIU, B., YOSHINARI, M., 2009, "Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts" *Biomedical Materials*, v. 4, pp. 45002 (7pp).

WILLIAMS, S.F., MARTIN D.P., HOROWITZ, D.M., PEOPLES O.P., 1999, "PHA applications addressing the price performance issue I. Tissue engineering" *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 25, pp. 111-121.

YANG, J., BEI, J.Z., WANG, S.G., 2002, "Enhanced cell affinity of poly (d,l-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage" *Biomaterials*, v. 23, pp. 2607–2614

YANG, Y., PORTÉ, M., MARMEY, P., HAJ, A.J.EL, AMÉDÉE, J., 2003, "Covalent bonding of collagen on poly(L-lactic acid) by gamma irradiation" *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 207, pp. 165–174.

YOUNG, J.H., TEUMER, J., KEMP, P.D., PARENTEAU, N.L., "Approaches to Transplanting Engineered Cells and Tissues". In: LANZA RP, LANGER R, CHICK WL, 1997, "Principles of tissue engineering", 2ª edição, pp. 281-292, USA: R.G. Landes Co, Austin – Texas.

ZARB, G., ALBREKTSSON, T., 1991, "Osseointegration – a requiem for the periodontal ligament? – An editorial" *International journal of periodontics and restorative dentistry*, v. 11, pp. 88–91.

ZHANG, D.M., CUI, F.Z., LUO, Z.S., LIN, Y.B., ZHAO, K., CHEN, G.Q., 2000, "Wettability improvement of bacterial polyhydroxyalkanoates via ion implantation" *Surface and Coatings Technology*, v. 131, pp. 350-354.

ZHANG, Y., CHAI, C., JIANG, X.S., TEOH, S.H., LEONG, K.W., 2007, "Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET" *Material Science and Engineering*, v.27, pp. 213-219.

ZHU, Y., GAO, C., LIU, X., SHEN, J., 2002, “Surface modification os policaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of humas endothelial cells” *Biomacromolecule*, v. 3, pp. 1312-1319