



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS

**FIBRAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO)/POLIISOPRENO
PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Douglas Ramos Marques

Porto Alegre

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DE MINAS,
METALÚRGICA E DE MATERIAIS

**FIBRAS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO)/POLIISOPRENO
PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Engenharia. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais.

Doutorando: MSc. Douglas Ramos Marques

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto dos Santos

Porto Alegre

2015



**Já não sofro, já não brilho,
mas somos a mesma coisa:**

**Uma coisa tão diversa
da que pensava que fôssemos**

Carlos Drummond de Andrade

Agradecimentos

Se cheguei até aqui por meus próprios passos e com meus próprios tropeços, é porque tinha sempre alguém a meu lado para me estender a mão e incentivar a seguir adiante. A cada um de vocês, minha gratidão.

Mãe e pai, sem vocês, não sou nada.

Luis Alberto, és mais que um orientador, és um amigo.

Julie and Sarah, thanks for letting me be a part of your group and make Manchester my home.

Colegas de Labiomas, cada um de vocês tem influência neste momento.

Amigos são poucos os que ficam nos momentos bons e ruins, mas eu tenho desses: Larissa, Hugo, Duda, Tamara, Deh, Keka. Minha devoção a vocês.

Mitchell, it was magic! Thank you!

Eu sei que, sem vocês, não chegaria aqui!

Por ter vocês eu sei: não acaba aqui!

EPÍGRAFE.....	III
AGRADECIMENTOS.....	IV
ÍNDICE.....	V
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIV
1. Revisão Bibliográfica.....	1
1.1. Engenharia de Tecidos.....	1
1.2. Técnicas de Processamento	5
1.3. Polímeros Naturais	10
1.4. Polímeros Sintéticos.....	18
1.5. Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) / Poliisopreno.....	23
2. Objetivos.....	30
3. Materiais e Métodos.....	31
3.1. Processo de Obtenção de Materiais.....	31
3.1.1. <i>Blenda Polimérica</i>	32
3.1.2. <i>Fibras Poliméricas - Gotejamento</i>	32
3.1.3. <i>Fibras Poliméricas - Electrospinning</i>	33
3.2. Caracterização - Blenda Polimérica	34
3.2.1. <i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier</i>	34
3.2.2. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i>	34
3.2.3. <i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>	35
3.2.4. <i>Análise Termogravimétrica</i>	35

3.2.5.	<i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>	35
3.2.6.	<i>Molhabilidade</i>	36
3.2.7.	<i>Ensaio de Tração</i>	36
3.3.	<i>Caracterização - Fibras Poliméricas</i>	36
3.3.1.	<i>Diâmetro de Fibras</i>	36
3.3.2.	<i>Porosidade e Densidade</i>	37
3.3.3.	<i>Ensaio de Compressão - Scaffolds</i>	37
3.3.4.	<i>Ensaio de Tração - Scaffolds</i>	38
3.4.	<i>Caracterização in vitro</i>	38
3.4.1.	<i>Subcultura e Manutenção de Células Mamárias</i>	38
3.4.2.	<i>Cultura Celular</i>	40
3.4.3.	<i>Azul de Toluidina</i>	41
3.4.4.	<i>Alamar Blue</i>	42
3.4.5.	<i>Quantificação de DNA de Cadeia Dupla</i>	43
3.4.6.	<i>Quantificação de Lactato Desidrogenase - LDH</i>	45
3.4.7.	<i>Ensaio Live/Dead</i>	46
4.	Resultados e Discussão	47
4.1.	<i>Caracterização - Blenda Polimérica</i>	47
4.1.1.	<i>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier</i>	47
4.1.2.	<i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i>	48
4.1.3.	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>	50
4.1.4.	<i>Análise Termogravimétrica</i>	52
4.1.5.	<i>Cromatografia de Permeação em Gel</i>	55
4.1.6.	<i>Molhabilidade</i>	56
4.1.7.	<i>Ensaio de Tração</i>	57
4.2.	<i>Caracterização - Fibras Poliméricas</i>	61
4.2.1.	<i>Diâmetro de Fibras</i>	61

4.2.2. Porosidade e Densidade	63
4.2.3. Molhabilidade - Scaffolds	65
4.2.4. Propriedades Mecânicas - Scaffolds	66
4.3. Caracterização <i>in vitro</i> - Observação Preliminar	71
4.3.1. Mioblastos Murinos	71
4.4. Caracterização <i>in vitro</i> - Fibras de <i>Electrospinning</i>	73
4.4.1. Efeito das Fibras Sobre Meio de Cultura.....	73
4.4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	76
4.4.3. Calorimetria Exploratória Diferencial.....	77
4.4.4. Análise Termogravimétrica.....	79
4.5. Caracterização <i>in vitro</i> - Fibras de Gotejamento	80
4.5.1. Mioblastos Murinos	81
4.5.2. Fibroblastos Dérmicos Humanos	86
4.5.3. Condrócitos Bovinos	90
4.5.4. Hepatocarcinomas Humanos	94
5. Conclusões.....	99
6. Sugestões de Trabalhos Futuros	101
7. Referências Bibliográficas	102
8. Publicações Originadas da Tese	131

Resumo

A perda ou falha de um órgão ou tecido é um dos problemas mais severos da saúde humana. A engenharia de tecidos, definida como o cultivo e adesão de células humanas *in vitro* em um *scaffold* ou arcabouço, surge como uma alternativa viável para reposição de órgãos e tecidos. Estas células proliferam, migram e se diferenciam num tecido específico enquanto produzem os componentes de matriz extracelular (ECM) necessários para criar este tecido. A obtenção de *scaffolds* fibrosos a partir da blenda polimérica de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) (PLGA) e Poliisopreno (PI) é proposta como uma alternativa à engenharia de tecidos moles. Este material foi processado como estrutura fibrosa por meio de métodos de gotejamento (FD) e *electrospinning* (FS). Caracterização físico-química foi aplicada à blenda e às fibras geradas. Também foi averiguada a viabilidade das fibras em culturas de mioblastos murinos, fibroblastos dérmicos humanos, condrócitos bovinos e hepatocarcinomas. Nota-se que o processo de obtenção da blenda não apresentou alterações na estrutura química dos polímeros, sendo apontada também a imiscibilidade entre eles. A ductilidade do material foi apontada como efeito da presença de PI na blenda, embora esta composição apresente similar molhabilidade entre a mistura e os polímeros puros. As fibras geradas por *electrospinning* geraram um *scaffold* com menor porosidade do que as fibras obtidas por gotejamento, mesmo apresentando um diâmetro menor e uma orientação paralela entre fibras. As fibras obtidas por gotejamento apresentaram fibras emaranhadas de maior diâmetro, mas maior tamanho de poros, gerando *scaffolds* de maior porosidade. As propriedades mecânicas de ambos *scaffolds* indicam sua aplicação enquanto substitutos de tecidos moles. Ensaio de viabilidade celular condenaram o uso das fibras FS, uma vez que estas apresentaram solvente residual no interior da fibra, causando indesejada lise celular. As fibras FD apresentaram resultados de adesão e proliferação adequados para mioblastos, fibroblastos e condrócitos, porém os resultados foram considerados impróprios para hepatócitos.

Palavras-Chave: arcabouço, Cellprene, condrócito, *electrospinning*, fibroblasto, gotejamento, mioblasto, PI, PLGA.

Abstract

The loss or failure of an organ or tissue is one of the most severe problems in human health. Tissue engineering, defined as the seeding and adhesion of human cells *in vitro* over a *scaffold*, arises as a viable alternative for reproduction of organs and tissues. These cells proliferate, migrate and differentiate into a specific tissue while producing extracellular matrix components. The obtaining of fibrous *scaffolds* from a polymeric blend of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid) (PLGA) and Polyisoprene (PI) is proposed as an alternative to soft tissue engineering. This material was processed as a fibrous structure through dripping (FD) and *electrospinning* (FS) methods. Physical-chemical characterization was applied to the blend and to the generated fibres. Fibres viability was also observed for murine myoblasts, human dermal fibroblasts, bovine chondrocytes and hepatocellular carcinoma cultures. It was noticed that the blending process didn't have any influence over polymer's chemical structure, being observed the immiscibility between the raw materials. Blend's ductile behaviour was pointed out as an effect of PI presence, although this mixture presents similar wettability to the one presented by these raw polymers. Fibres obtained by electrospinning generated a *scaffold* with smaller porosity, even presenting fibres with smaller diameter and a parallel organized topography. The fibres obtained by dripping presented a tangled structure of thicker fibres, but assembling a *scaffold* with higher porosity and inner space. Mechanical properties of both *scaffolds* indicate their applicability as soft tissue substitutes. Cell viability assays condemn the use of FS fibres, seen that they present residual solvent trapped into the fibre, causing undesirable cell lysis. On the other hand, FD fibres presented positive adhesion and proliferation results for myoblasts, fibroblasts and chondrocytes cell lines, however the results were considered inappropriate for hepatocytes.

Key-Words: Cellprene, chondrocyte, dripping, electrospinning, fibroblast, myoblast, PI, PLGA.

Lista de Ilustrações

Figura 1: etapas da engenharia de tecidos (BARBANTI et al., 2004).....	2
Figura 2: Estrutura interna de <i>scaffolds</i> obtidos por (a) separação de fase por indução térmica (NAM & PARK, 1999), (b) <i>electrospinning</i> (SMITH & MA, 2004), (c) expansão de gás (LIPS, et. al., 2005), e (d) manufatura aditiva (BASTIEN, 2009).....	6
Figura 3: Traqueotomia: (a) stent em espiral Øext 9,1mm #1mm; (b) incisão longitudinal e exposição da traquéia (seta); (c) posicionamento do stent (seta) no interior da traqueia; (d) sutura externa.	26
Figura 4: Craniotomia (a) local do posicionamento da blenda; (b) sutura externa; (c) blenda <i>in situ</i> aos 60 dias de pós-operatório; (d) imagem de análise histológica apresentando Intensa neovascularização nos tecidos circunjacentes à blenda.....	28
Figura 5: Fluxograma experimental.....	31
Figura 6: Amostras (a) FD tridimensional - vista de topo, (b) FD bidimensional, (c) FS tridimensional - vista de topo, e (d) FS bidimensional.	34
Figura 7: Espectro de infravermelho de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.	47
Figura 8: Espectro de RMN da blenda PLGA/PI.....	49
Figura 9: Termogramas de DSC de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.....	51
Figura 10: Curvas (a) TGA de PLGA, PI e blenda PLGA/PI e (b) derivadas das curvas TGA.....	53
Figura 11: Ângulo de contato para PLGA, PI e blenda PLGA/PI.....	57
Figura 12: Curvas tensão-deformação em tração de (a) PLGA, (b) PI, e (c) PLGA/PI.	58
Figura 13: Microscopia óptica de fibras (a) FD e (b) FS.....	61
Figura 14: Diâmetro de fibras e tamanho de poros em <i>scaffolds</i> FD e FS..	62
Figura 15: Porosidade de <i>scaffolds</i> FD e FS.....	63
Figura 16: Densidade de <i>scaffolds</i> FD e FS.....	64
Figura 17: Ângulo de contato para <i>scaffolds</i> FD e FS.....	65
Figura 18: Curva tensão-deformação em compressão de fibras (a) FD e (b) FS.....	67

Figura 19: Curvas tensão-deformação em tração de fibras (a) FD e (b) FS. 69

Figura 20: Microscopia óptica de cultura celular linhagem C2C12 em grupo controle, fibras FD e fibras FS. Barra de escala: 200µm. 72

Figura 21: Determinação de quantidade de lactato desidrogenase para C2C12 em diferentes meios de cultura.*diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$)..... 73

Figura 22: Microscopias de fluorescência de culturas celulares em diferentes meios de cultura após um e três dias. Barra de escala: 100µm. 75

Figura 23: Espectro de infravermelho de fibras FD e FS..... 76

Figura 24: Termogramas de DSC de fibras FS e FD..... 78

Figura 25: Curvas (a) TGA das fibras FS e FD e (b) derivadas das curvas TGA..... 79

Figura 26: Determinação de quantidade celular de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$)..... 82

Figura 27: Determinação de quantidade de dsDNA de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$)..... 82

Figura 28: Microscopia óptica de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. Barra de escala: 200µm..... 83

Figura 29: Microscopia óptica de mioblastos sobre fibras FD e grupo controle. Setas indicam formação de matriz extracelular. Barra de escala: 50µm. 86

Figura 30: Determinação de quantidade celular de fibroblastos sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$)..... 87

Figura 31: Determinação de quantidade de dsDNA de fibroblastos sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$)..... 87

Figura 32: Microscopia óptica de fibroblastos sobre fibras FD e grupo controle. Barra de escala: 200µm..... 88

Figura 33: Determinação de quantidade celular de condrócitos sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	91
Figura 34: Determinação de quantidade de dsDNA de condrócitos sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	91
Figura 35: Microscopia óptica de condrócitos sobre fibras FD e grupo controle. Barra.....	92
Figura 36: Determinação de quantidade celular de hepatocarcinomas sobre fibras FD e grupo controle. A linha pontilhada representa a quantidade de células semeadas no início da cultura. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	95
Figura 37: Determinação de quantidade de dsDNA de hepatocarcinomas sobre fibras FD e grupo controle. *diferença significativa **diferença não significativa - ANOVA ($\alpha=0,025$).....	95
Figura 38: Microscopia óptica de hepatocarcinomas sobre fibras FD e grupo controle. Barra de escala: 200 μ m.....	96

Lista de Tabelas

Tabela 1: composições de meios de cultura.

Tabela 2: propriedades de massa molecular e índice de polidispersão de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.

Tabela 3: propriedades mecânicas de PLGA, PI e blenda PLGA/PI.

Tabela 4: propriedades mecânicas de compressão de *scaffolds* FD e FS.

Tabela 5: propriedades mecânicas de tração de *scaffolds* FD e FS.