

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CAROLINA LUCCHESI

**CULTURA DE CÉLULAS VERO SOBRE MEMBRANAS DE
POLI(HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO) (PHBV)
TRATADAS POR PLASMA GASOSO**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título
de Mestre em Biologia Celular e
Estrutural, na área de Histologia .

Orientador(a): Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

Campinas, 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

L962c

Lucchesi, Carolina

Cultura de células vero sobre membranas de poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) tratadas por plasma gasoso / Carolina Lucchesi. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Paulo Pinto Joazeiro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Biomateriais. 2. Poly (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). 3. Células vero. 4. Plasma. I. Joazeiro, Paulo Pinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Campinas, 27 de Julho de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro (Orientador)

Assinatura

Prof(a). Dra. Patrícia da Luz Moreira

Assinatura

Prof. Dr . Arnaldo Rodrigues dos Santos

Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Eliana Aparecida de Rezende Duek

Assinatura

**Uma coletânea de pensamentos é uma farmácia moral onde se encontra remédios para
todos os males (Voltaire)**

AGRADECIMENTOS

Obrigada à DEUS por ter me privilegiado, colocando duas pessoas maravilhosas em meu caminho, meus queridos orientadores, Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, por sempre estar a meu lado e mesmo nos momentos mais difíceis nunca me deixou desistir, me estimulando e mostrando-me meu valor, e a Prof^a Dr^a Eliana Aparecida de Rezende Duek, uma grande amiga, a quem não tenho para palavras para agradecer e nem em uma vida inteira eu conseguirei retribuir.

À Daniel Green Short Baptista, meu companheiro, que esteve presente, da prova de ingresso a preparação desta dissertação, e mesmo estando longe, sempre me apoiou e mesmo nos momentos mais difíceis não me deixou desistir, sempre mostrando a importância do trabalho.

Aos meus pais e a minha avó Isaura, por terem nos mostrado a importância do estudo, em especial minha mãe que mesmo com dificuldades, nunca nos negou um livro.

Aos meus sogros queridos e a Dona Dora, por todo incentivo e carinho durante tanto os momentos bons quanto aos ruins.

Ao Amigo Tirone, pelo apoio e auxílio durante os estudos, ainda que não tenha a menor idéia do que seja a cinase da cadeia leve da miosina, valeu!!

À Eliana Lippe, sempre disposta a ajudar, além dos maravilhosos bolos de brigadeiro, os quais muito me estimularam a estudar, principalmente durante os finais de semana.

Obrigada a todos os amigos de bancada e colegas da pós-graduação, seja na Histologia, Engenharia Mecânica ou no Laboratório de Biomateriais, os quais sempre procuraram colaborar no que podiam especialmente ao Marcelo “José” Roberto Pinto, Grazielle Baraúna e Débora Cristina Coraça pela companhia, amizade, alegria e estímulo.

À Dra. Emília Uzumaki Lambert pelo auxílio com as análises estatísticas.

À Renata Giardini pelo auxílio com os textos em inglês.

Ao Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior e ao Prof. Leandro Petinari pela paciência e auxílio com os cultivos celulares.

À Dr^a Betina Mara Pereira Ferreira, pela amizade, apoio e principalmente pelo auxílio durante todo mestrado.

ABREVIACES UTILIZADAS

AFM – Microscopia de força atômica

MEC – Matriz extracelular

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium

PMMA – Poli(metacrilato de metila)

PVC – Poli(cloreto de vinila)

PGA – Poli(cido glicólico)

PLA – Poli(cido lático)

PLGA – Poli(cido lático-co-ácido glicólico)

PLLA – Poli(L-cido lático)

PCL – Poli(caprolactona)

PDS – Poli(dioxanona)

PHB – Poli(hidroxibutirato)

PHBV – Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

PEO – Poli(xido de etileno)

PHA – Poli(hidroxialcanoato)

Poli(HEMA) – poli(hidroxietilmetacrilato)

Poli(HEMA-co-AA) - poli(hidroxietilmetacrilato)-co-ácido acrílico

SFB – Soro fetal bovino

ARTIGO QUE COMPÕEM A TESE**INCREASING VERO CELLS RESPONSE TO PHBV MATRICES PLASMA TREATED**

Lucchesi, C.^a; Ferreira, B.M.P.^b; Duek, E.A.R.^b; Santos Jr, A.R.^c; Joazeiro, P.P.^{a*}, submetido a revista Journal of Materials Science: Materials in Medicine.

ARTIGO PUBLICADO PARALELO A TESE

Rezende, C.A.; Lucchesi, C.; Peris-Barbo, M.L.; Duek, E.A.R. Membrana de Poli (Ácido Lático-co-Ácido Glicólico) como curativos para pele. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 15, nº 3, p. 232-238, 2005.

RESUMO

O copolímero Poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) tem sido intensamente estudado como substrato para a engenharia de tecidos, sendo conhecido como um poliéster hidrofóbico. A modificação da superfície por plasma é uma técnica efetiva e econômica para os materiais e tem ganhado crescente interesse da engenharia biomédica, por melhorar a biocompatibilidade da superfície. Neste estudo, avaliou-se as vantagens da modificação da superfície de membranas de PHBV tratadas por plasma de Oxigênio e Nitrogênio a fim de acelerar o processo de adesão e proliferação celular. O PHBV foi dissolvido em cloreto de metileno à temperatura ambiente. Membranas de PHBV foram submetidas ao tratamento de plasma de Oxigênio e Nitrogênio, através de um gerador de plasma. As membranas foram esterilizadas por radiação UV por 30 min e colocadas em placas de 96 poços. Células Vero foram semeadas sobre as membranas, sendo determinada a proliferação celular sobre as matrizes, a citotoxicidade e adesão celular. Após 2, 24, 48 e 120h de incubação, o crescimento e proliferação dos fibroblastos foram observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises das membranas indicaram que o tratamento por plasma aumentou o ângulo de contato e a rugosidade, alterando a morfologia da superfície, e conseqüentemente, melhorou o comportamento hidrofílico do polímero. A microscopia eletrônica de varredura das células Vero mostrou que as modificações da superfície proporcionaram melhor adesão, espalhamento e proliferação celular. O tratamento da superfície do polímero somado às suas propriedades químicas é um caminho para obtenção de estruturas aplicáveis a engenharia de tecido.

Palavras-chave: Biomateriais, Poli(hidroxibutirato-co-hidrovalerate) (PHBV), célula Vero, plasma.

ABSTRACT

The copolymers poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) (PHBV) are being intensely studied as a tissue engineering substrate. It is known that Poly(hydroxybutyric) (PHB) and their copolymers are quite hydrophobic polyesters. Plasma-surface modification is an effective and economical surface treatment technique for many materials and of growing interest in biomedical engineering. In this study we investigate the advantages of oxygen and nitrogen plasma treatment to modify the PHBV surface to enable the acceleration of Vero cell adhesion and proliferation. PHBV was dissolved in methylene chloride at room temperature to obtain membranes that were modified by oxygen or nitrogen-plasma treatments using a plasma generator. The membranes were also sterilized by UV irradiation for 30 min and placed in 96-well plates. Vero cells were seeded onto the membranes and their proliferation was also determined by cytotoxicity and cell adhesion assay. After 2, 24, 48 and 120h of incubation, growth of fibroblasts on matrices was observed by scanning electron microscopy (SEM). The analyses of the membranes indicated that the plasma treatment increased the contact angle and their roughness, it also changed the surface morphology, and consequently, enhanced the hydrophilic behavior of PHBV polymers. Scanning electron microscopy analysis of Vero cells adhered to plasma treated PHBV showed that the modified surface had allowed better cell attachment, spreading and growth than the untreated membrane. This combination of surface treatment and polymer chemistry is a valuable guide to prepare appropriated surface for tissue engineering application.

Keywords: Biomaterials, Poly(hydroxybutyrate-co-hydrovalerate) (PHBV), Vero cell, plasma.

ÍNDICE

Agradecimentos	5
Abreviações Utilizadas	6
Artigos que compões esta tese	7
Trabalhos paralelos desenvolvidos durante o mestrado	7
Resumo	8
Abstract	9
1. Introdução	11
1.1. Biomateriais.....	12
1.2. Poli(hidroxialcanoatos).....	15
1.3. Tratamento de superfícies.....	18
1.4. Engenharia de Tecidos.....	20
1.5. Adesão celular.....	21
1.6. Célula Vero.....	23
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivos específicos.....	26
3. Material e métodos.....	27
3.1. Preparação das Amostras de PHBV.....	28
3.2. Tratamento por Plasmas de Oxigênio e Nitrogênio.....	28
3.3. Caracterização das Membranas.....	29
3.4. Cultivo de Células.....	30
4. Artigo.....	34
5. Conclusão.....	54
6. Bibliografia.....	56
7. Apêndice.....	64

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da área de Biomateriais surgiu com a necessidade de se obter materiais alternativos para solucionar problemas relacionados às lesões causadas por acidentes, traumas ou doenças. Estudos visando à regeneração tecidual através do crescimento e proliferação celular sobre um suporte obtido a partir de um biomaterial, deram origem a uma nova linha de pesquisa dentro da área de Biomateriais, a Engenharia de Tecidos. A Engenharia de Tecidos é baseada na regeneração de tecidos do próprio paciente, os quais são produzidos fora do organismo através do recrutamento de células saudáveis e cultivadas sobre suportes de um dado biomaterial (LANGER E VACANTI, 1993).

A engenharia de tecidos despontou nas últimas décadas como um revolucionário campo de pesquisa. Os avanços recentes têm como base a combinação de técnicas na ciência, englobando a engenharia dos materiais, medicina e biologia molecular, celular e dos tecidos com o objetivo de acelerar as reações celulares, reduzindo o tempo para a reparação de tecidos lesados. De modo geral, os estudos nesta área, têm como foco principal, o potencial para a regeneração de tecidos e órgãos como pele, cartilagem, osso, vasos sanguíneos, nervos e fígado, utilizando dispositivos poliméricos. Atualmente, muitos investigadores têm se dedicado ao desenvolvimento de suportes biocompatíveis, que permitam as células proliferarem, diferenciarem e manterem seu fenótipo, para desempenharem funções características dos tecidos, ainda que em substitutivos sintéticos. Uma limitação desta técnica, entretanto, é a carência de um controle de sinais bioquímicos precisos. Para reverter este obstáculo, pesquisadores têm dado atenção para o desenvolvimento de substitutivos que mimetizem um ambiente extracelular, capaz de gerar sinais biológicos específicos para o crescimento e reorganização tecidual. Para esta finalidade pesquisadores das áreas das ciências de materiais e biológicas têm um grande desafio pela frente (SEAL *et al*, 2001).

1.1 BIOMATERIAIS

Biomaterial é definido como todo material utilizado para substituir - no todo ou em parte - sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987).

Como característica imprescindível, estes materiais devem ser biocompatíveis e atóxicos aos tecidos e ao organismo como um todo, comportando-se de maneira não tóxica e não destrutiva para com as células e os fluídos corporais, ou seja, devem atender ao requisito de funcionabilidade para o qual foram projetados, provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias, quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos (HENCH, 1998). Embora o conceito de funcionabilidade seja algo não muito preciso, é consenso que a funcionabilidade está associada à aplicação a que se destina. Assim surgiram os biomateriais metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos. Conseqüentemente, para uma dada aplicação, costuma haver mais de um material e/ou processo de fabricação disponível. Esta abordagem conduziu a um catálogo razoavelmente grande de biomateriais “quase inertes”, que inclui de 2 a 3 milhões de dispositivos implantados anualmente (ORÉFICE *et al*, 2006). O desafio no campo dos biomateriais se deve ao fato de que todos os dispositivos para implantes, devem substituir tecidos vivos cujas propriedades físicas são resultado de milhões de anos de otimização evolutiva, e que tem a capacidade de crescimento, regeneração e reparo. Assim, todos os biomateriais artificiais usados para reparo ou restauração do corpo requerem um ajuste de características e propriedades (HENCH & ETHRIGDE, 1982; ORÉFICE *et al*, 2006).

Pesquisadores que desenvolvem materiais com características químicas desejáveis para aplicações médicas, preocupam-se com a morfologia da superfície, porosidade e degradação dos materiais. Estes parâmetros têm um papel significativo na adesão, proliferação, diferenciação celular e secreção de moléculas de matriz extracelular e devem, portanto, serem considerados para o desenvolvimento de novos polímeros (CHU *et al*, 2002). Em consideração a outras propriedades inerentes, o material deve ser biocompatível. O material não deve ser imediatamente atacado e encapsulado pelo organismo, não deve provocar respostas imunes, deve ser capaz de regenerar o endotélio, permitir a inclusão de fatores bioativos etc, sendo todos estes parâmetros levados em consideração no desenvolvimento de novos materiais (SEAL *et al*, 2001). O material, quando degradável, deve ainda induzir as células do corpo a trocar o suporte temporário pelos componentes nativos do tecido.

Os materiais metálicos têm sido usados na confecção de implantes devido às suas boas propriedades mecânicas, sendo bem tolerados pelo organismo em quantidades limitadas, porém em quantidades elevadas, são altamente agressivos, em virtude da corrosão metálica que se constitui em fator limitante de sucesso, uma vez que a corrosão é passível de ocorrer em ambiente

fisiológico, além de levar a deterioração das propriedades mecânicas do material, comprometendo o desempenho da sua função (AKESON *et al.*, 1975).

Os materiais cerâmicos são compostos inorgânicos não-metálicos, com abrangente aplicação na área médica (SOBALLE *et al.*, 1996). Porém pesquisadores relatam a migração de partículas, ausência de reabsorção ou baixa resistência mecânica como os principais inconvenientes de sua utilização na Engenharia de Tecidos (BARTH *et al.*, 1988).

No intuito de substituir os materiais metálicos e cerâmicos, ou melhorar a biointegração, vários polímeros têm sido estudados e indicados para aplicações na área médica (PAVANATTI, 1994; SZYCHER *et al.*, 1994).

Os materiais poliméricos são macromoléculas formadas pela reunião de unidades fundamentais (meros) repetidamente, que dão origem a cadeias longas. Podem ter origem biológica - os polímeros naturais - ou serem produzidos através da polimerização de monômeros, sendo transformados em macromoléculas - os polímeros sintéticos. Podem ainda serem classificados como polímeros puros, apresentando apenas um monômero; como copolímeros, quando a cadeia apresenta dois ou mais monômeros diferentes ligados quimicamente; ou como blends que são uma mistura física de dois polímeros puros sem que haja uma ligação química entre eles (HENCH E ETHRIGDE, 1982).

Ao longo das últimas 6 ou 7 décadas os esforços na busca de substitutivos adequados levaram ao emprego de polímeros sintéticos. As primeiras informações são sobre a utilização de suturas a base de poliamidas sintéticas (Nylon) (BORETOS, 1973). Um pouco mais tarde (1945), foram documentadas as primeiras aplicações de poli(metacrilato de metila) (PMMA), poli(tereftalato de etileno) (Dacron) e poli(cloreto de vinila) (PVC) (BORETOS, 1973). Já em 1950, polímeros como polietileno, poliuretano, poli(tetraflúor etileno) (Teflon) começaram também a ser usados em aplicações biomédicas (BORETOS, 1973). Atualmente, mais de 20 tipos diferentes de polímeros sintéticos são usados neste tipo de aplicação (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Tendo em vista aspectos biomecânicos e composição dos diferentes tecidos, é altamente desejável que determinados dispositivos biomédicos e odontológicos sofram processo de degradação espaço-temporalmente regulada quando no ambiente corpóreo. Destacam-se neste grupo o poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e seus copolímeros, poli(caprolactona), poli(dioxanona), poli(hidroxibutirato), entre outros. Esses polímeros apresentam grupamentos polares em suas estruturas que são suscetíveis ao ataque hidrolítico e de enzimas. A partir do

momento que estes polímeros foram testados como biomateriais e mostraram resultados satisfatórios, eles se tornaram rapidamente uma opção para este tipo de aplicação. Mas, alcançar a combinação ou gradiente de propriedades físicas necessárias para o desenvolvimento de um biomaterial, através da interface entre seres vivos e substratos inertes é um desafio científico formidável (ORÉFICE *et al*, 2006).

O interesse na área de Biomateriais vem crescendo nas últimas décadas e cada vez mais novos materiais são sugeridos para diferentes aplicações. Hoje, aliado aos avanços tecnológicos, tem se destacado o desenvolvimento de biomateriais com superfícies modificadas, como é o caso das modificações de superfícies produzidas farmacologicamente, biomimeticamente ou por engenharia celular, engenharia de tecido ou mesmo por meios físico-químicos (LANGER *et al*, 2004).

O uso de materiais poliméricos em aplicações na área biomédica é um campo de pesquisa relativamente novo, em contínuo crescimento e para o qual os profissionais de diversas áreas de conhecimento unem seus esforços para encontrar soluções de problemas previamente sem resposta (WILLIAMS, 1987; HENCH, 1998).

No Brasil, são poucos os grupos trabalhando nessa área, mas tem-se verificado um crescimento constante. Vários pesquisadores vêm estudando os polímeros bioreabsorvíveis *in vitro* e sua interação *in vivo* (ZOPPI *et al*, 1999; DUEK *et al*, 1999; ZOPPI, *et al*, 2001; FERREIRA *et al*, 2001; LUCIANO *et al*, 2002; SCAPIN *et al*, 2003; BARBANTI *et al*, 2004; MARRECO *et al*, 2004; REZENDE *et al*, 2005; SILVA *et al*, 2006; PEREIRA *et al*, 2006).

1.2 Poli(hidroxialcanoatos) (PHAs): PHB e seu copolímero PHBV

Um dos polímeros que ultimamente vem despertando interesse na busca de novos e eficientes biomateriais são os poli(hidroxialcanoatos) (PHAs), polímeros de aplicabilidade promissora para uma variedade de dispositivos ou substitutivos biomédicos incluindo liberação controlada de drogas, suturas cirúrgicas, cobertura de feridas, uso ortopédico entre outros, por possuírem uma grande variedade de propriedades mecânicas, serem biodegradáveis e biocompatíveis. Além disso, preenchem os requisitos necessários para atuarem como suporte para engenharia de tecidos por serem biocompatíveis, suportarem o crescimento e organização celular e os produtos de sua degradação serem atóxicos (WILLIAMS *et al*, 1999). Os

poli(hidroxialcanoatos) são uma classe de poliésteres naturais, que podem ser produzidos por uma grande variedade de microorganismos, sendo um dos maiores grupos de polímeros termoplásticos conhecidos, com mais de 100 tipos, os quais têm diferentes estruturas e conseqüentemente, diferentes propriedades físico-mecânicas e cinética de degradação (WILLIAMS *et al*, 1999; STEINBÜCHEL, 2001). A grande vantagem destes polímeros, é a degradação por simples hidrólise das ligações ésteres em meio aquoso (Fig.1). Os produtos da degradação (dióxido de carbono e água) são metabolizados pelo organismo, evitando a necessidade de uma segunda cirurgia para remoção do implante (LUCIANO *et al*, 2002).

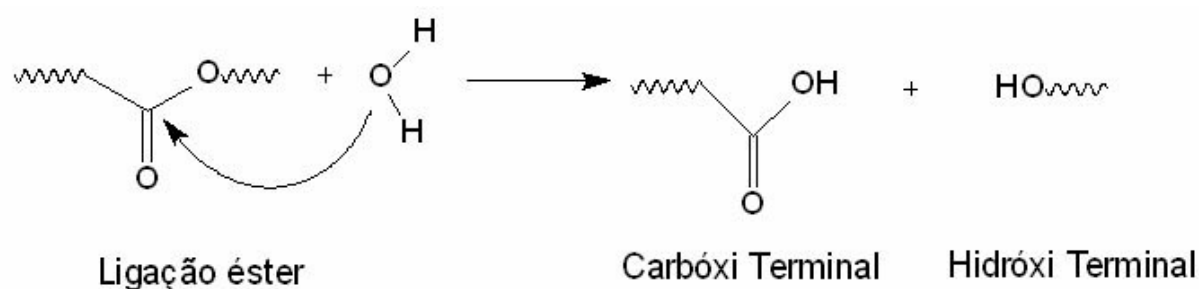


Figura 1 – Na presença de água, as ligações ésteres presentes nestes poliésteres, são rompidas, ocasionando a quebra da cadeia, gerando uma porção carbóxi terminal e outra hidróxi terminal (PEZZIN, 2001).

Um grupo de PHAs amplamente investigado tanto *in vitro* quanto *in vivo* são os membros da família dos poli(hidroxibutirato) (PHB) e seu copolímero o PHBV poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (Fig.2). O PHB é um polímero altamente cristalino, tendo boa biocompatibilidade, porque seus derivados são produtos do metabolismo celular, estando presentes no sangue e tecidos. Entretanto, devido ao fato de ser quebradiço e ter baixa força mecânica, sua aplicação é limitada. Embora exista uma diversidade de PHAs conhecidos, poucos têm sido investigados como o copolímero poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) (VOLOVA *et al*, 2003).

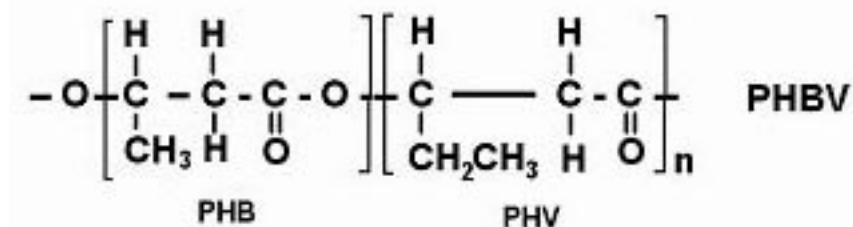


Figura 2 – Representação esquemática dos monômeros de hidroxiburato e hidrovalerato ligados covalentemente (ROSA & PANTANO FILHO, 2003).

O PHB e seus copolímeros randômicos contendo unidades do 3-hidroxibutirato e 3-hidroxivalerato (PHBV) têm sido produzidos a partir de bactérias como *Alcaligenes eutrophus* (MADISON & HUISMAN, 1999). Nos microorganismos, PHB serve como energia intracelular e reserva de carbono. Os copolímeros do hidroxibutirato com hidroxivalerato (PHBV) são menos cristalinos, mais flexíveis e mais facilmente processados do que o próprio PHB (GASSNER *et al*, 1996). Suas várias propriedades como origem natural, biodegradabilidade, biocompatibilidade, estereoespecificidade, piezoeletrecidade, atividade óptica e termoplasticidade permitem uma apropriada variedade de aplicações direcionadas à indústria da saúde (POUTON *et al*, 1996; KOSE *et al*, 2003_a).

Estudos recentes demonstraram a biocompatibilidade do PHB e PHBV por meio de testes toxicológicos *in vitro* e *in vivo*. Estes testes evidenciaram que Poli (3HB-co-3HV) com alto grau de pureza não possui ação citotóxica, quando empregado para o cultivo de diferentes tipos de células animais ou implantado em músculo estriado esquelético, sugerindo que estes materiais são apropriados para obtenção de substitutivos ou biopróteses (KOSE *et al*, 2003_b; VOLOVA *et al*, 2003).

O PHBV tem sido reconhecido por ser um copolímero biocompatível, degradável através de uma simples hidrólise, sendo seus produtos removidos do corpo através de processos metabólicos normais (HOLLAND *et al*, 1986; GÖPFERICH, 1996).

Apesar da reconhecida biocompatibilidade do copolímero PHBV (VOLOVA *et al*, 2003), a interação células Vero/polímero não se mostrou imediata *in vitro* (Santos Jr *et al*, 2004). Os PHBs são biomateriais hidrofóbicos (FERREIRA *et al*, 2001; HASIRCI *et al*, 2003), apresentando ângulo de contato por volta de 80°, porém a maior parte das células exibem boa

adesão celular sobre superfícies com ângulo de contato abaixo de 60° (YAMAGUCHI *et al*, 2004). Ferreira e colaboradores (2001) relatam que o PHBV é copolímero com características hidrofóbicas, apresentando baixa adesão celular.

A interação das células com os materiais é uma importante característica da biocompatibilidade e estudos de citocompatibilidade *in vitro*. Os principais parâmetros da interação célula/biomaterial são adesão celular e proliferação (van WACHEM *et al*, 1985; HYNES, 1994; WEBB, *et al*, 1998; PU *et al*, 2002; van KOOTEN *et al*, 2004). Em muitos estudos há uma clara distinção entre os materiais que suportam ou não a adesão celular. A inabilidade dos materiais para suportar adesão e proliferação celular realça a possibilidade de observar mudanças no comportamento de adesão celular, induzidas por modificações da superfície do material (RAMIRES *et al*, 2000; PU *et al*, 2002). Isto por consequência, pode ser usado para compreendermos como as propriedades da superfície, estimulando quando necessária e/ou desejada, a adesão, espalhamento e crescimento celular.

1.3 Tratamento de superfícies

Devido a grande dificuldade em se obter materiais que permitam principalmente a rápida adesão, proliferação e diferenciação celular, são numerosos os estudos que procuram adequar às propriedades das superfícies de compostos por meio de tratamentos especiais. Conseqüentemente, a modificação de superfícies está se tornando uma estratégia amplamente utilizada para obtenção de dispositivos multifuncionais com propriedades biomecânicas adequadas e biocompatibilidade necessárias aos substitutivos biomédicos. Há de se ressaltar que, a busca de novos materiais e estratégias para torná-los biocompatíveis, obviamente, demanda despesas vultosas e um longo tempo para serem desenvolvidos (SIOHANSI, 1987).

Têm-se demonstrado que modificações químicas na superfície dos materiais têm um importante papel na adesão, proliferação e diferenciação celular, além de propiciar que células diferenciadas possam produzir e remodelar a matriz extracelular depositada (DALBY *et al*, 2002). Isto indica que, atenção deve ser dada, tanto à estrutura tridimensional do polímero quanto ao tratamento de suas superfícies e/ou incorporação de elementos bioativos capazes de influenciar o comportamento celular (SEAL *et al*, 2001).

Estudos têm demonstrado que a hidrofiliicidade/hidrofobicidade, energia e carga da superfície do material influenciam fortemente a adesão e o crescimento celular no material (YANG *et al*, 2002, CHU *et al*, 2002).

As propriedades da superfície podem ser alteradas de modo a se tornarem mais adequadas para aplicações biomédicas. As técnicas mais comumente utilizadas incluem desgaste químico, tratamento por plasma gasoso, radiação γ e radiação por feixe de elétrons (KEEN *et al*, 2006). Entre estas técnicas, o tratamento por plasma é particularmente versátil porque a modificação é restrita a superfície, sem comprometer as propriedades do material como um todo (CHAN, 1993). O tratamento por plasma pode ser usado para modificar a superfície do polímero de maneira não específica por mudanças na molhabilidade ou mais especificamente, introduzindo-se uma variedade de grupos funcionais dependendo do tipo de gás utilizado (KEEN *et al*, 2006).

O plasma é considerado um quarto estado da matéria e é composto por átomos, moléculas, íons e radicais altamente excitados, sendo obtidos a partir de gases excitados a estados energéticos por meio de radio frequência, microondas ou descargas de elétrons (CHU *et al*, 2002). Como resultado, o processo de modificação da superfície por plasma é uma técnica econômica e efetiva para os materiais e está ganhando campo na área biomédica, tornando-se cada vez mais comum. A grande vantagem da técnica de plasma é a capacidade de modificação da superfície, tornando-a mais biocompatível ou mimetizando melhor o tecido sem alterar suas propriedades e, com isso oferecer um alto grau no controle de qualidade, dando confiança e reproduzindo o que seria difícil por técnicas convencionais (MANDL & RAUSCHENBACH, 2000; CHU *et al*, 2002). Além disso, o tratamento por plasma torna a superfície estéril, através da destruição de microorganismos, matando bactérias e vírus, podendo ser utilizado para dispositivos biomédicos, instrumentos cirúrgicos, engenharia de tecidos e aplicações clínicas, representando mais uma vantagem (CHU *et al*, 2002).

Um grande número de pesquisadores têm investigado o tratamento por plasma para a modificação da superfície de polímeros como o PHBV. Kose e colaboradores (2003) modificaram as características químicas e físicas da superfície por plasma de oxigênio, aumentando a afinidade de osteoblastos, que cresceram sobre o material, proliferaram e se diferenciaram, dando início a produção de uma matriz, mostrando-se um tratamento promissor para a engenharia de tecidos. Wan *et al*, (2004), melhoraram a hidrofiliicidade da superfície do PHBV através da modificação por plasma de oxigênio, mostrando que células mesenquimais

cresceram melhor na superfície tratada. Langowski & Uhrich, (2005), estudaram a modificação do PHBV por plasma de oxigênio, resultando num aumento da hidrofilicidade do material. Keen *et al*, (2006), utilizaram plasma de amônia e aminólise etilenodiamina, promovendo a adição de grupos funcionais, e observaram que o tratamento por plasma acrescentou uma quantidade maior de grupos amina.

1.4 Engenharia de tecidos

Células isoladas não podem formar tecidos, pois requerem um ambiente específico, o qual normalmente inclui a presença de um material suporte, que sirva como arcabouço, agindo como uma matriz para o crescimento, servindo como suporte físico e substrato adesivo para o crescimento de células isoladas durante a cultura de células e subsequente implante (ATALA, 2004).

As vantagens do transplantes de células sobre o transplante de órgãos, estão no fato de populações de células isoladas expandirem-se *in vitro* com a utilização de técnicas de cultura celular, necessitando somente de um pequeno número de células doadoras para preparar o subsequente implante. O tecido é removido de um doador autólogo (próprio paciente), homólogo (doador da mesma espécie) ou heterólogo (doador de outra espécie) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004), dissociado em células, ou grupo delas, fixadas ou encapsuladas em um suporte polimérico e transplantadas ao paciente, sendo desnecessário a parte doadora sacrificar um órgão todo. O uso de células isoladas de pacientes autólogos, também permite a remoção daquelas indesejáveis, as quais podem ser alvo de resposta imune, influenciando no processo de rejeição, além das cirurgias entre doadores e receptores e seus riscos inerentes poderem ser evitados e os custos dos procedimentos significativamente reduzidos (FREED *et al*, 1993).

Considerado de forma integrada, sob o aspecto da ciência dos materiais e do tipo de tecido e reparo necessário, a seleção do polímero segue, segundo Hutmacher (2000), basicamente duas estratégias: na primeira, o material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, desde a inoculação até o ponto de formação do tecido prematuro e implante no organismo hospedeiro. Neste caso, o implante ocorre antes da formação *in vitro* de tecido maturado. No organismo, o polímero é degradado numa razão proporcional ao crescimento celular e à solicitação mecânica. Sua função é proporcionar suporte para o crescimento celular e,

adicionalmente, servir como substituto mecânico/estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua bioreabsorção completa.

Na segunda estratégia, o implante ocorre com tecido maduro formado. O dispositivo polimérico é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequado para a inoculação das células até a sua inserção num bioreator, onde ocorre a formação completa do tecido maduro. Nesta etapa, as células semeadas proliferam-se e secretam matriz extracelular durante a cultura estática e/ou dinâmica, enquanto o polímero é degradado e absorvido gradualmente, permitindo espaço para a proliferação celular e formação do tecido no reator biológico. Após a formação do tecido, o implante é inserido no organismo. Definido e baseado nas estratégias anteriores, o primeiro estágio na Engenharia de Tecidos inicia-se com o desenvolvimento, seleção e preparação dos suportes de polímeros bioreabsorvíveis. Em aplicações na reconstrução de tecidos, o objetivo dos dispositivos temporários como suporte para a cultura de células é reparar o defeito até que o processo natural de recuperação tenha se completado. Nesse sentido, o estudo de implantes de polímeros sintéticos, tem direcionado suas pesquisas para materiais biocompatíveis, biofuncionais e, principalmente, para aqueles que são degradáveis e bioreabsorvíveis pelo corpo humano (RAI *et al.*, 2005).

1.5 Adesão Celular ao Substrato

O processo de adesão celular tem como etapa inicial a adsorção de proteínas provenientes de fluidos biológicos sobre as superfícies do substrato (VOGLER & BUSSIAN, 1987). Esta adsorção é diretamente relacionada às cargas da superfície e tem influência direta sobre a adesão celular (KESELOWSKY *et al.*, 2003). Bigerelle & Anselme (2005) definem a fase de adesão celular, como um processo que ocorre num curto espaço de tempo, no qual as ligações físico-químicas entre as células e substrato são resultantes de forças iônicas, de van der Waals, que se formam entre moléculas do substrato e as várias moléculas biológicas, como as proteínas do citoesqueleto, da membrana celular e de matriz extracelular. Esta cadeia apresenta interações que resultam na transdução de sinais, promovendo a transcrição de fatores e consequentemente regulação da expressão de genes (ANSELME, 2000).

Uma vez aderidas, as células se espalham, ampliando sua área de contato com o substrato com conseqüentes modificações da forma (influenciada pela topografia do substrato), o que

contribui para seu comportamento fenotípico. A natureza da matriz influencia principalmente programas de crescimento, diferenciação e apoptose, sendo que a composição determinará o programa a ser selecionado. As células “percebem” e reagem ao substrato, a exemplo da matriz extracelular (MEC), por meio de sinais dependentes da ativação das integrinas e mediadores intracelulares. Elas produzem respostas altamente dinâmicas que podem levar à reorganização do citoesqueleto e alterações de funções em resposta a sinais mecânicos externos (OWEN *et al*, 2005; GEORGES & JANMEY, 2005).

Tal sensibilidade ao ambiente se faz necessário devido aos múltiplos desafios aos quais as células estão submetidas durante o desenvolvimento, regeneração de órgãos e respostas celulares, como as imunitárias. Conseqüentemente, a conversão de estímulos mecânicos em sinalização bioquímica intracelular - mecanotransdução - é um processo crítico para o crescimento e desempenho das funções normais dos tecidos (GEORGES & JANMEY, 2005). Deste modo, as células respondem aos biomateriais por meio de vias de sinalização inter e intracelulares (OWEN *et al*, 2005; GEORGES & JANMEY, 2005). Muitos destes sinais se originam e propagam-se a partir dos receptores de componentes de matriz representados por proteínas integrais de membrana, as integrinas, mecanicamente ligadas aos filamentos do citoesqueleto por meio de uma grande variedade de proteínas que se associam para formar os complexos macromoleculares de ancoragem, reconhecidos como complexos focais ou adesão focal (OWEN *et al*, 2005).

Deste modo, as forças mecânicas aplicadas sobre as integrinas são transferidas para pontos distantes no meio intracelular, incluindo o núcleo, por intermédio de microfilamentos, bem como outros elementos do citoesqueleto, microtúbulos e filamentos intermediários, os quais estão interconectados (HYNES, 1987; HYNES, 2002).

A transmissão eficiente dos estímulos através desta trama macromolecular e a resposta mecanotransdutora resultante pode ser alterada pela modulação da tensão isométrica no interior do citoesqueleto, conseqüentemente a morfologia, energia e química da superfície do material tem um papel importante na adesão celular à superfície (SEAL *et al*, 2001).

A biocompatibilidade dos materiais está diretamente associada ao comportamento das células frente a um determinado substrato, particularmente pela adesão à sua superfície, sendo este um fator importante para determinar o sucesso do material. As características da superfície do material, topografia, composição química e superfície energética, são essenciais à adesão de células nos biomateriais (YANG *et al*, 2002). Além disto, a adesão e a proliferação, que

correspondem à primeira fase de interação célula/material irão influenciar a capacidade das células, se diferenciarem em contato com o implante. (ANSELME, 2000; DI SILVIO *et al*, 2002). Segundo Vogler e Bussian (1987), a taxa de adesão celular inicial é crítica para este processo e é o maior determinante da citocompatibilidade *in vitro*, sugerindo ser uma possível determinante da biocompatibilidade *in vivo* (VOGLER e BUSSIAN, 1987; OWEN *et al*, 2005); portanto culturas de células, particularmente dependentes de ancoragem, constituem-se uma ferramenta útil para avaliação de biomateriais (EL-AMIN *et al.*, 2003).

1.6 Células Vero

Células Vero são uma linhagem celular provenientes de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e são amplamente utilizadas como um modelo de crescimento em cultura (BIANCHI & AYRES, 1971). As células desta linhagem crescem em monocamadas, possuem formas alongadas, sendo similares a células fibroblásticas, com pouca granulação citoplasmática. Quando essas células atingem a confluência, deve-se realizar o subcultivo, caso contrário, as células degeneram e descolam-se da superfície do frasco de cultivo, pois apresentam inibição por contato (GENARI & WADA, 1998).

As células Vero têm sido amplamente empregadas, particularmente para o reconhecimento de aspectos da replicação viral e produção de vacinas, sendo utilizadas para o crescimento de poliovírus (TREPANIER *et al*, 1990). Diversos estudos vêm sendo realizados utilizando-se a célula Vero como modelo, devido a esta ser uma linhagem internacionalmente recomendada para estudos de citotoxicidade (ISO 10993-5 (1992-E); Kirkpatrick, 1992; ASTM F813-83). Sydiskis & Gerhardt, (1993), estudaram a citotoxicidade de materiais utilizando a célula Vero como modelo e para estudos da interação célula-substrato com biomateriais, além disso, esta célula não necessita da presença de soro fetal bovino para os ensaios *in vitro* (ASAKURA *et al*, 2004). Vogler & Bussian, (1987), estudaram a taxa de adesão celular utilizando células Vero sobre substratos biocompatíveis, concluindo que, medir as taxas iniciais de adesão celular é um método preciso e conveniente para se comparar a compatibilidade celular a vários substratos plásticos. Lim *et al*, (1992), estudaram o crescimento de células Vero sobre microcarreadores macroporosos para promoção da cinética de adesão.

Estudos realizados por Genari *et al* (1998), mostraram que as células Vero em condições de estresse nutricional, podem sofrer transformações celulares, apresentando alterações em seu padrão de crescimento, adesão e síntese protéica. Eisenbarth *et al*, (2002) estudaram a modificação da superfície do titânio, observando que o tratamento, protegeu as células Vero de agentes tóxicos. Asakura *et al*, 2004, estudaram a adesividade de células Vero em proteínas da seda. Marreco *et al*, 2004, avaliaram dois métodos de esterilização de membranas de quitosana utilizando células Vero nos ensaios de citotoxicidade não apresentando os efeitos tóxicos às células.

Atualmente diversos estudos vêm sendo desenvolvidos, para avaliação *in vitro* de polímeros bioabsorvíveis no Brasil, utilizando célula Vero como modelo. Lombello *et al*, (2000), estudaram a morfologia das células Vero utilizando poli(HEMA-co-AA) como substrato, concluindo que o copolímero é mais apropriado como substrato que o poli(HEMA) puro. Santos Jr *et al*, (2001), verificaram o crescimento de células Vero sobre suportes de PLLA com diferentes diâmetros de poro, observando que estes podem alterar seu padrão de diferenciação, de acordo com o tamanho dos poros. Lombello *et al*, (2002), mostraram que a adesão de células Vero aos biomateriais pode ser afetada pelas características físicas e químicas do substrato. Santos Jr *et al*, (2003), avaliaram os efeitos da dexametasona sobre a diferenciação de células Vero, omitindo-se ou não soro fetal bovino, verificando que glicocorticóides possuem múltiplos efeitos sobre a diferenciação de células Vero. Em outro estudo Santos Jr *et al*, (2004), cultivaram células Vero em membranas de PLLA, PHBV e suas blendas, e verificaram que o crescimento celular mostrou-se baixo nos materiais puros. Posteriormente estes autores verificaram que células Vero sobre diferentes blendas de PLLA/PHBV, apresentam alteração em sua morfologia de acordo com a proporção da blenda (Santos Jr *et al*, 2005).

2. OBJETIVO GERAL

Este estudo visou reconhecer os padrões das alterações superficiais de membranas do copolímero PHBV modificadas por plasma de oxigênio e nitrogênio, com a finalidade de obter informações do comportamento celular sobre as amostras do copolímero, através do processo de adesão e proliferação celular, buscando-se avaliar a viabilidade da aplicação das membranas de PHBV com a superfície tratadas por plasma, como suporte para cultura de células Vero.

II.1 Objetivo Específico

A partir das modificações resultantes dos tratamentos com plasma, buscou-se reconhecer resposta das células Vero, às modificações da superfície de matrizes de PHBV. Visando o objetivo proposto, exploraram-se os seguintes aspectos:

1. Verificar a alteração da hidrofiliicidade/hidrofobicidade da superfície, através de análises de ângulo de contato;
2. Verificar a morfologia da superfície das membranas, através de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM);
3. Observar possíveis efeitos citotóxicos originados pelo tratamento da superfície polimérica;
4. Avaliar adesão e morfologia das células Vero cultivadas sobre as membranas de poli(hidroxibutirato-co-hidrovalerato) (PHBV) tratadas por plasmas gasosos, verificando a influência da modificação da superfície.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Preparação das Amostras de PHBV

As amostras foram preparadas através do método de evaporação do solvente. O copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) com teor de 12% de hidroxivalerato (Aldrich) Mw 240.000 g/mol, foi dissolvido no solvente cloreto de metileno (MERCK), utilizando-se 1,65 gramas do polímero para 33 mililitros de solvente, sendo a solução vertida lentamente em uma placa de vidro, evitando-se a formação de bolhas de ar. O solvente evaporou a temperatura ambiente, dentro de uma cuba de vidro com saturação de solvente, em torno de 24 horas. Em seguida, as membranas obtidas foram armazenadas sob vácuo. A figura 3 representa a preparação das membranas de PHBV.

Cuba para Evaporação do Solvente

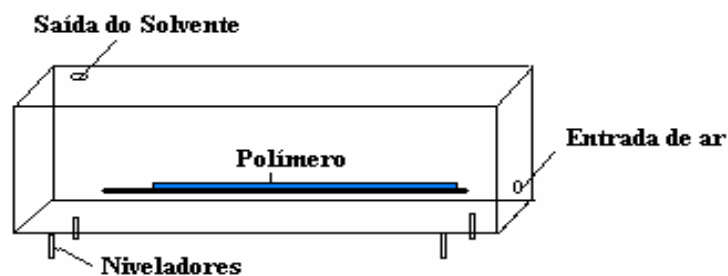


Figura 3: Esquema do procedimento de preparação das amostras de PHBV (cuba para evaporação do solvente).

3.2 Tratamento por Plasmas de Oxigênio e Nitrogênio

Após a preparação das amostras, estas foram colocadas em uma câmara de vácuo, a uma potência menor de 50 a 100 W. Ao alcançar a pressão desejada (na faixa de 20 a 80 Pa) introduziu-se o gás (oxigênio - O_2 ou nitrogênio - N_2), iniciando o processo de ionização dos gases para obtenção do plasma. Após o tempo de 600 segundos, desligou-se a corrente, desfez-se o vácuo e retiraram-se as amostras. Para este tratamento foi utilizado um equipamento de plasma do tipo de "descarga de elétrons" (Anatech LTD PLASMA SERIES).

As diferentes potências, pressão e tempos de ionização dos gases foram escolhidos conforme estudos preliminares realizados, assim como dados retirados de literatura (TEZCANER *et al*, 2003), sendo apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados no estudo *in vitro*. O PHBV sem tratamento por plasma foi utilizado como controle. O # (4) se refere aos maiores valores de potência e pressão empregados e o # (5) referem-se aos dados encontrados em literatura, como sendo os melhores parâmetros para cultivo celular (TEZCANER *et al*, 2003).

Amostra	Potência (W)	Pressão (Pa)	Tempo
PHBV	---	---	---
PHBV O ₂ (4)	100	80	600s
PHBV O ₂ (5)	100	40	600s
PHBV N ₂ (4)	100	80	600s
PHBV N ₂ (5)	50	20	600s

3.3 Caracterização das membranas

3.3.1 Caracterização das Amostras segundo o Ângulo de Contato com Água

As membranas obtidas foram separadas em cinco lotes de acordo com o tratamento empregado (Tab. 1). Todos os lotes foram caracterizados através das análises de ângulo de contato com a água. Os ângulos de contato foram medidos após deposição de gotas de 2μL de água desmineralizada e deionizada. Para tanto, se empregou imagens capturadas com uma câmera CCD Sony Color Video XC999P e a análise por meio de um “software” Matrox Inspectro com placa Meteor II especialmente concebido para este tipo de análise. Foram realizadas cerca de dez medidas independentes, em diferentes lados de cada amostra, sendo que houve em média três amostras para as diferentes variações de plasma (potência, pressão e tempo). As amostras de PHBV foram mantidas em dessecador sob vácuo até o momento de realização dos ensaios *in vitro*. Os materiais preparados foram caracterizados através das análises de ângulo de contato.

3.3.2 Caracterização ultra-estrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das membranas após tratamento com plasmas.

A MEV foi utilizada para investigar a superfície das membranas. Amostras da superfície superior das membranas foram coladas em um suporte metálico e recobertas com ouro, utilizando-se um metalizador de amostras Sputer Coater Baltec SCD 050. Em seguida, as membranas foram observadas ao microscópio eletrônico de varredura JSM 5900-LV ARP.

3.3.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As análises de microscopia de força atômica foram realizadas em um microscópio NanoScope IIIa - Scanning Probe Microscope Controller da Digital Instruments no laboratório de microscopia de força atômica do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). As imagens foram obtidas no modo *stapping mode* à temperatura ambiente. Utilizou-se cantilever comercial de Silício (Si), com forças constantes de 13-70 N/m. As imagens foram obtidas na frequência de ressonância fundamental dos cantilevers de Si, por volta de 300kHz. A velocidade de varredura durante a leitura foi de 1Hz, usando cabeças de varredura com escala máxima de 10 x 10 μm . Todas as imagens foram obtidas com uma amplitude direcional de $A_0 \approx 500 \text{ nm}$.

3.4 Cultivo de Células

As células Vero, linhagem de células fibroblásticas provenientes de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), foram obtidas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. Estas células constituem linhagem recomendada para estudos de citotoxicidade e para interações célula-substrato com biomateriais (ISO 10993-5, 1992; KIRKPATRICK, 1992; SANTOS JR *et al*, 2001).

As células Vero foram mantidas em meio Ham F-10 (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, São Paulo, Brasil), com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, São Paulo, Brasil), em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Realizaram-se as trocas do meio sempre que houve acidificação e os repiques foram realizados sempre que a cultura

atingiu a confluência. Para avaliar a viabilidade celular e adequação do inóculo para os testes, após 48 horas de incubação em estufa de CO₂, utilizou-se o método de exclusão pelo Azul de Tripán, onde os meios de cultura tripsinizados foram coletados, diluídos na razão de 1:1 em solução de Azul de Tripán 0,1% salina 0,9% e as células viáveis foram contadas em Câmara de Neubauer.

3.4.1 Teste de Citotoxicidade Direta

Para a análise da citotoxicidade direta, as membranas de PHBV tratadas com plasma de oxigênio (O₂) (#4 e #5) e nitrogênio (N₂) (#4 e #5) e amostras não tratadas, foram colocadas no fundo de placas de cultura com 96 poços (Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA), assim como, discos de látex embebidos em fenol, sendo todos previamente esterilizados em radiação ultravioleta (UV) por 30 min (van KOOTEN *et al*, 2004). A própria placa de poliestireno foi utilizada como controle negativo e os discos de látex embebidos em fenol como controle positivo para determinar citotoxicidade de suportes. Os poços receberam 100 µL de meio Ham F-10 sem soro fetal bovino, sendo pré-incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas, conforme as normas da ISO 10993-5. Após a pré-incubação, o meio foi retirado e os poços receberam 2 x 10⁵ células/mL em meio de cultura Ham F-10 com 10% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas durante 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Após a incubação o meio foi retirado e os poços foram lavados rapidamente com o mesmo meio de incubação. Após a lavagem, adicionou-se a cada poço 100µL de meio fresco sem SFB e 50 µL de meio contendo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium (MTT) (5mg/mL), seguindo-se um período de incubação de 4 horas à 37° C no escuro. Após esse tempo, os 150 µL contendo MTT foram substituídos por uma solução de 200 µl de DMSO e 25 µl de tampão Glicina/Sorensen. Em seguida, 180 µl das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa, e a absorbância do MTT foi lida em leitor de microplacas Multiskan Bichromatic Version 1.06 com emprego de filtro com comprimento de onda de 540 nm.

3.4.2. Adesão celular em membranas de PHBV submetidas ao tratamento com plasmas

As membranas de PHBV com dois tratamentos por plasma (#4 e #5) de O₂, ou de N₂ e sem tratamento, foram colocadas no fundo de placas de cultura com 96 poços (Corning/Costar Corporation, Cambridge, MA, USA). Além das membranas do copolímero foram empregados discos de teflon e a própria placa de poliestireno, tradicionalmente utilizados nos ensaios de adesão como controles negativo e positivo respectivamente. Todos os poços receberam 100µL de meio de cultura Ham F-10 sem SFB, sendo incubados durante 24 horas à 37°C em atmosfera saturada de vapor e 5% CO₂. Após a incubação, retirou-se o meio e inoculou-se 100µL de suspensão celular (2×10^5 células/mL), com meio Ham F-10 e 10% de SFB por poço, incubando-se por mais 2 horas nas mesmas condições.

Após cultivo, o meio foi retirado e os poços foram lavados novamente com o meio, e em seguida adicionou-se 100µL de meio de cultivo contendo 50 µL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazolium (MTT) (5mg/mL) incubando-se nas mesmas condições de cultivo durante 4 horas no escuro. Após este tempo, a solução de cada poço foi substituída por 200 µL de DMSO e 25 µL de tampão Glicina/Sorensen. Em seguida, alíquotas de 180 µL das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa. A absorbância das alíquotas foi medida em um leitor de microplacas Multiskan Bichromatic Version 1.06, utilizando-se filtros no comprimento de onda de 540 nm.

Previamente a realização dos ensaios envolvendo o MTT, as amostras foram incubadas em condições semelhantes aos testes de citotoxicidade e adesão celular, porém adicionando-se meio de cultivo sem células para verificar uma possível reação do MTT com as membranas.

3.4.3 Microscopia eletrônica de varredura

As células Vero foram observadas após 2, 24, 48 horas de cultivo. Condições semelhantes de cultivo e o mesmo inóculo celular dos testes de adesão celular foram utilizados nos estudos ultra-estruturais ao microscópio eletrônico de varredura (MEV). As amostras foram fixadas durante 1 hora a temperatura ambiente em solução fixadora contendo 2,5% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído, 0,06% ácido pícrico, 1% ácido tânico, dissolvidos em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4. Todos os reagentes utilizados são da marca Sigma. Posteriormente, as amostras

foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (Sigma) e desidratadas em etanol em concentrações crescentes. As amostras foram secas em Ponto Crítico (Balzers CTD 030), recobertas por ouro (Balzers SCD 050) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5800 LV).

INCREASING VERO CELLS RESPONSE TO PHBV MATRICES TREATED BY PLASMA

Lucchesi, C.^a; Ferreira, B.M.P.^b; Duek, E.A.R.^b; Santos Jr, A.R.^c; Joazeiro, P.P.^{a*}

^aDepartment of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil,

^bDepartment of Physiological Sciences, Faculty of Biological Sciences, Pontifical Catholic University of Sao Paulo (PUC-SP), Sorocaba, SP, Brazil

^cDepartment of Cell Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

*Correspondent author: 55 (19) 37886248

email address : pjoaz@unicamp.br

Abstract

The copolymers poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) (PHBV) are being intensely studied as a tissue engineering substrate. It is known that Poly(hydroxybutyric) (PHB) and their copolymers are quite hydrophobic polyesters. Plasma-surface modification is an effective and economical surface treatment technique for many materials and of growing interest in biomedical engineering. In this study we investigate the advantages of oxygen and nitrogen plasma treatment to modify the PHBV surface to enable the acceleration of Vero cell adhesion and proliferation. PHBV was dissolved in methylene chloride at room temperature. The PHBV membranes were modified by oxygen or nitrogen-plasma treatments using a plasma generator. The membranes were sterilized by UV irradiation for 30 min and placed in 96-well plates. Vero cells were seeded onto the membranes and their proliferation onto the matrices was also determined by cytotoxicity and cell adhesion assay. After 2, 24, 48 and 120h of incubation, growth of fibroblasts on matrices was observed by scanning electron microscopy (SEM). The analyses of the membranes indicated that the plasma treatment increased the contact angle and their roughness, it also changed the surface morphology, and consequently, enhanced the hydrophilic behavior of PHBV polymers. Scanning electron microscopy analysis of Vero cell adhered to plasma treated PHBV showed that the modified surface had allowed better cell attachment, spreading and growth than the untreated membrane. This combination of surface treatment and polymer chemistry is a valuable guide to prepare appropriated surface for tissue engineering application.

Keywords: Biomaterials, Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV), Vero cell, plasma.

1. Introduction

Development of novel biomaterials for medical applications has attracted much interest in recent years. Biodegradable polyesters are probably the group of polymers most widely studied for this application [1]. Given the importance of strategies for acceleration of tissue healing following surgical interventions, several research groups have been performing many experiments for *in vitro* testing of biomaterials as a prerequisite to *in vivo* evaluation [2-13].

PHBV are now being intensely studied as tissue engineering substrates [14], however it is known that they are quite hydrophobic polyesters [15]. Among biomaterials, the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) is a polyester that has been gaining increasing attention because of their variety of applications in medicine and industry [16], such as the construction of many biomedical products such as heart valves [17], blood vessels, pericardial substitutes, orthopedic applications [18] and drug release systems [19]. Recently it was demonstrated that untreated samples showed a good biocompatibility for fibroblast *in vitro* and no adverse events, such as inflammation, necrosis, calcification of fibrous capsule or *in vivo* malignant tumor formation [1,20]. More recently, studies with PHBV matrices showed that surface treatment enhanced its water absorbing capacity [15] and bone cell adhesion [21].

Establishment of a stable interface between a biomaterial and the host environment is driven by both the material surface properties and the type and state of the biological tissue [22]. Surface characteristics of materials such as topography, wettability, chemistry or surface energy are important because they affect the biological interactions on material [15,22] and they are also an important feature for *in vitro* biocompatibility and cytotoxicity studies. The control of cell adhesion to the polymer substrate is one of the most important issue in tissue engineering, which assures the ability to guide proliferation, migration and differentiation of the cells to construct an equivalent tissue [14].

The cell-biomaterial interaction must provide conditions for cell adhesion as well as its spreading and many studies had showed the clear distinction between materials supporting or not cellular adhesion. The inability of certain materials to support cell adhesion/spreading enhances the possibility to observe changes in cell adhesion induced by, e.g. surface modification or surface coating. As consequence, it can be used to gain knowledge at the surface properties that might stimulate cell adhesion, and its subsequent spreading and growth. The drawback of this approach is that differences in cellular responses to both groups of materials are contrasted in a black-white fashion, as a result of the strong differences in the morphologies of spreading and non-spreading cells [23].

Surface properties can be altered to suit a specific biomedical application. [24]. Plasma treatments offer a method of altering the surface characteristics of materials without affecting their physical

properties [25]. A number of studies have investigated plasma treatments for the modification of PHBV, and have demonstrated that plasma treatment, lead to creation of a more hydrophilic structure in comparison to the untreated material [14,15,21]. Plasma-surface modification is an effective and economical surface treatment technique for many materials and of growing interest in biomedical engineering [26].

The use of cell cultures to assess the bioactivity and cytotoxicity of biomaterials has overcome some of the limitations of *in vivo* studies. The aim of this study was to investigate the advantages of oxygen and nitrogen plasma treatment to modify the PHBV surface in cultured Vero cells. We had to studied cell growth and differentiation as well as their interactions with biomaterials [10] as these cells are recommended for such investigations in standard protocols [27,28,29].

2. Materials and Methods

2.1 Preparation of PHBV membranes

The PHBV was dissolved in methylene chloride (5%W/V) and the solution was poured slowly onto a glass plate, watching out for not alloying air bubbles. The solvent evaporated at room temperature, inside a glass recipient saturated with solvent, for about 24 hours. The obtained membranes were stored under vacuum until they were plasma-treated. The plasma treatment was performed using a radio frequency Anatech LTD Ashing plasma apparatus. Tables 1 summarize the plasma conditions employed in the treatment: O₂ or N₂ gas, power in the range of 50-100 W, pressure of 20 to 80 Pa and time 600s. The values of power, pressure, and time were chosen based on preliminary studies; and the #5 plasma for each polymer refers to data reported by Tezcaner *et al* [14] as the best treatment parameters for PHBV. The membranes were sterilized by UV irradiation for 30 min and placed in 96-well plates before cell culture [23].

Table 1: Gas pressure, power and time used in the plasma of nitrogen (N₂) and oxygen (O₂) for PHBV. PHBV without treatment was used as control. The # (4) plasma refers to the largest potency values and pressure used and the # (5) plasma refers to the data found in literature, as being the best parameters for cellular cultivation [14].

Samples	Power (W)	Pressure (Pa)	Time
PHBV	---	---	---
PHBV O ₂ (4)	100	80	600s
PHBV O ₂ (5)	100	40	600s
PHBV N ₂ (4)	100	80	600s
PHBV N ₂ (5)	50	20	600s

2.2 Contact Angle

The contact angles were measured in air, using a CCD Sony Colo Video XP999P camera, and the image acquisition was performed using a Matrox Inspectro software and a Metsor II board. It was used demineralized and deionized water in the contact angle measurements.

2.3 Atomic force microscopy (AFM)

The AFM analyses were performed using a Digital Instruments NanoScope IIIa Scanning Probe Microscope Controller. It was employed a Si cantilever with constant forces of 13-70 N/m. The images were obtained in the tapping mode at room temperature, in the fundamental resonance frequency of Si of about 300 kHz. The scanning rate was 1 Hz, and the maximum scale for the scanning heads was 10x10 µm. All images were obtained with directional amplitude of A₀ ≈ 500 nm.

2.4 Cell Culture

Vero cells, a fibroblastic cell line established from the kidney of the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*), obtained from the Adolfo Lutz Institute, Sao Paulo, Brazil, were used. These cells were cultured in Ham's F10 medium (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, by Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brazil) at 37°C. Vero cells

are a recommended lineage for studies of cytotoxicity and for cell-substratum interactions for biomaterials research [26,28,29].

2.5 Cell Adhesion and Direct Cell Cytotoxicity Assays

Identification of the effects of plasma treatments on early cell adhesion and late cytotoxicity were carried out by performing the MTT assay, a modification of Mosmann's [30] method, which was used for both Cell Adhesion and Direct Cell Cytotoxicity Assays [8]. Previously, the sterilized PHBV membranes were placed in a 96-well plate (Corning) with 100 μ l of culture medium and kept at 37°C for 24 h, according to Santos Jr, *et al* (2005). After incubation, 2×10^5 cells/mL in 100 μ l F-10 Ham medium supplemented with 10% FCS were added to the wells containing the membranes. The cells were cultured for 2 h and 24 h to cell adhesion and direct cell cytotoxicity assays, respectively. After washed twice with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, at 37°C and incubated with 100 μ l F-10 Ham medium, a MTT assay mixture [10 μ l per well, containing 5mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide - MTT, Sigma] was added to each well and incubated for 4 h at 37°C. After 4h, 100 μ L of Dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma) and 25 μ l of Glycine/Sorensen buffered was substituted to each well to dissolve the formazan crystals. The absorbance was quantified spectrophotometrically at 540 nm, using a Bio-Rad Model 550 microplate reader (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). The MTT is an incolor tetrazolium salt that, when oxidized by mitochondria, form a dark compound detected by spectrophotometry. Latex membranes and the culture plate itself (polystyrene) were used as positive and negative controls, respectively for cytotoxicity assay and teflon dishes and the culture plate itself were used as negative and positive control for cell adhesion.

We also read the absorbance of all experimental conditions. Comparison of continuous variables for all groups was done with the ANOVA. When a significant difference was found ($p < 0,05$), the groups were compared using the Tukey's test.

2.6 Scanning Electron Microscopy (SEM)

The membranes were sterilized by UV irradiation for 30 min and placed in 96-well plates. Approximately 2×10^5 cells/mL Vero cells in Ham's F10 medium supplemented with 10% FCS were seeded in each well containing the PHBV membranes and cultured at 37° C.. After 2, 24 and 48 h, the samples were fixed in a fixative solution prepared by dissolving 2,5% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0,03% picric acid, 1% tannic acid in 0,1M cacodylate buffer and the same volume of Ham F-10 medium for 1h at room temperature (RT), washed in 0.1M cacodylate buffer, post-fixed in 1%

osmium tetroxide in water for 1h at RT in the dark, washed in water, dehydrated with ethanol, critical point dried [Balzers CDT 030] and coated with gold in a sputter coater [Blazers CDT 050]. The coated specimens were observed with a JEOL 5800 scanning electron microscope.

3. Results and Discussion

3.1. The hydrophilicity of plasma treated PHBV samples

The micro topography of untreated and oxygen and nitrogen plasma treated PHBV samples were evaluated by SEM (Fig.1). The exposition to oxygen or nitrogen plasma caused a reduction in the contact angle (Tab.2). The significantly lower contact angle at room temperature indicates that the plasma treatment becomes more hydrated. This increase in the hydrophilicity is related to the plasma treatment conditions (gas, power, pressure, and time) which were observed. At the PHBV plasma treated membranes, the contact angle diminished to one half of its initial value even for low values of pressure, power, and treatment time. The PHBV treated with oxygen plasma seemed to be more effective on that compared to the nitrogen plasma. This decrease in the contact angles and consequent increase in the hydrophilicity suggest an increase in the polar groups formed by the plasma treatment [31]. The membrane samples treated using the parameters mentioned by Tezcaner et al. [14] presented, as expected, intermediate values of contact angle between the maximum and minimum values of pressure, power, and time.

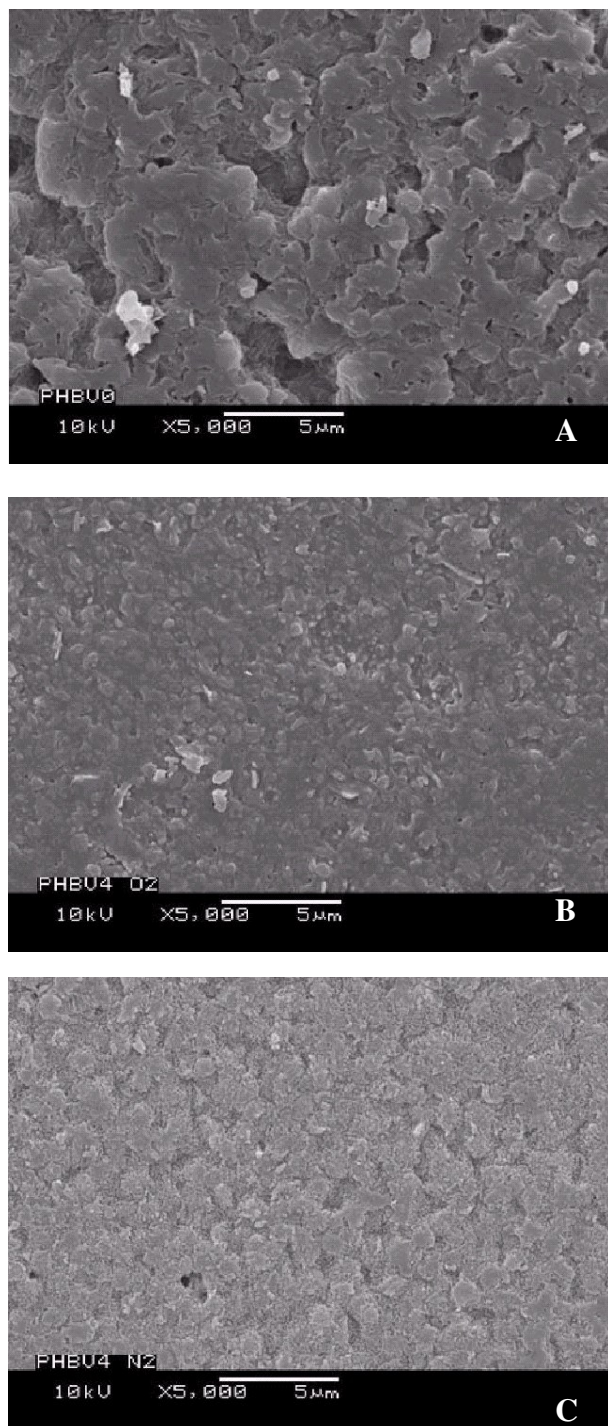


Figure 1: SEM micrographics obtained from the surfaces of the PHBV membranes, where (A) PHBV without treatment, (B) PHBV (4) with treatment of plasma of O_2 , (C) PHBV (4) with treatment of plasma of N_2 .

Table 2 – Contact angle measurement for samples of untreated PHBV and PHBV treated with Nitrogen (N₂) and Oxygen (O₂) plasma at different pressures of the gas, power and time.

Samples	Ângle (deg)
PHBV	82
PHBV O ₂ (4)	22
PHBV O ₂ (5)	38
PHBV N ₂ (4)	37
PHBV N ₂ (5)	43

3.2 Qualitative and quantitative analyses of surface of PHBV after treatments of both O₂ and N₂ plasmas

The Atomic Force Microscopy (AFM) gives a detailed analysis of the substrates surface. Nano-roughness pattern of PHBV films were showed as laterally ordering conical or ellipsoid structures perpendicular to the substrate plane (Fig.2) The average height roughness of the structures are showed in Table 3. The AFM showed that the films kept their nano pattern in roughness after plasma treatment, but it is clear that plasma composition can affect the film morphology. It can be observed that the surface morphologies were clearly modified by the treatments of both O₂ and N₂ plasmas. The PHBV presented a rough surface even before the plasma treatment. The O₂ plasma treatment showed morphology of peaks (Fig. 2b) while the N₂ plasma treatment presented a morphology consisting of a set of ellipsoids (Fig. 2c). The PHBV treated by O₂ plasma presented the highest roughness values. It is supposed that the plasma etches preferentially the amorphous regions, leaving the crystalline regions practically with no alteration as it was showed by Riccardi *et al*, 2003 [32]. The modification of the amorphous regions gives rise to surfaces with novel physical and chemical properties [32]. Also, according to Yang et al. [33], the increase in the roughness is one of the reasons for the enhancement of the hydrophilicity in the plasma treated samples, since the surface wettability is a consequence of the surface roughness.

In summary, we can modify completely the physical and chemical properties of the polymer surfaces by using O₂ and N₂ plasma treatments. Not only the chemical changes of the surfaces, but also the topographic changes can contribute independently for the modifications in the hydrophilicity of the PHBV polymer. Although the increase in the roughness causes an enhancement in the hydrophilicity of the polymer, this is not the only factor, as mentioned by Yang et al.[33].

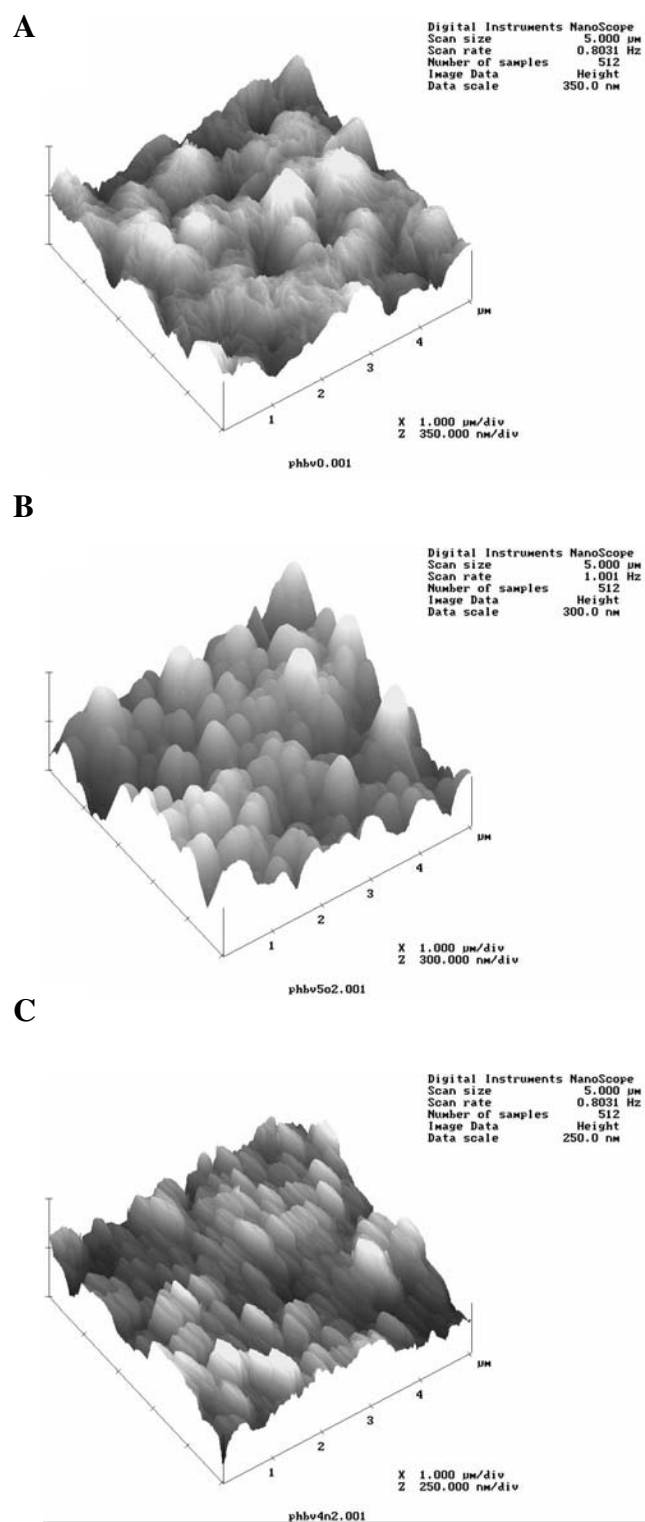


Figure 2: Atomic force microscopy for the PHBV membranes with or without plasma treatment. A) PHBV without treatment, B) PHBV(4) treated with O_2 , C) PHBV(5) treated with N_2 .

Table 3: Rugosity measurement Ra (nm) of PHBV membranes treated by N₂ and O₂ plasma in different parameters, obtained through the analysis of atomic force microscopy with different scanning.

N ₂	Rugosity Ra (nm)	O ₂	Rugosity Ra (nm)
PHBV 0	52,0	PHBV 0	52,0
PHBV 4	63,9	PHBV 4	81,8
PHBV 5	37,6	PHBV 5	66,9

3.3 Vero Cell behavior by Direct Cell Cytotoxicity Assays and Cell Adhesion

3.3.1 Analyses of PHBV Cytotoxicity after both O₂ and N₂ plasma treatments

The results obtained by direct cytotoxicity assay, showed that all samples studied not present cytotoxic effects to Vero cells. Untreated PHBV showed similar results than PHBV O₂ (5) and PHBV N₂ (4) and better results than PHBV O₂ (4) and PHBV N₂ (5) ($p < 0.05$). No difference could be noticed between PHBV O₂ (4) and PHBV O₂ (5) ($p > 0.05$), although a difference between PHBV O₂ (4) and PHBV N₂ (4) ($p < 0.05$) and between PHBV N₂ (4) and PHBV N₂ (5) ($p < 0.05$). The membranes, independently of the treatment showed better results than positive and negative control ($p < 0.05$).

The MTT assay revealed that all the materials in the study did not affected the mitochondrial activity of Vero cells (Fig 1). However, toxic substances do not act at one specific level but affect several cellular functions [34]. In our opinion, the early determination of the mitochondrial activity in terms of cell sensitivity would be enough to evaluate cell viability, despite the late cell proliferation. The absence of cytotoxicity does not confer information about the biocompatibility of a biomaterial. However, the determination of potential cytotoxicity is an important aspect of biomaterial testing standards such as ISO and ASTM [27,28], but MTT by itself cannot be used to make a strong statement about the proliferative status of a cell population as suggested in some strategies for cell proliferation [34, 35] A great challenge in the development of novel biomaterials is to support the interpretation of the cytotoxicity results by the materials characteristics. In particular, degradable polymers display variable behavior in biological systems, depending on various properties such as molecular weight, hydrophobicity, distribution of charge, residual monomer and pH of the degradation products. Therefore, these factors, combined with the degradation kinetics, are important in determining the toxicity of promising biomaterials [34].

Our results are similar to other authors that showed both the biocompatibility of PHB and PHBV [5,35] and that the O₂ and N₂ plasma do not induce cytotoxicity, but there is increasing evidence that

changes in scaffold surface chemistry and topography alter cellular activity [21]. Now a days gaseous plasma treatment may be an effective and widely used method for modifying the surface of a material for cell adhesion even under shear stress field [33].

3.3.2 Analysis of Cell Adhesion to plasma treated PHBV samples

The results of the one-way ANOVA showed that there were significant differences among adhesion absorbance in the different samples. Tukey's test was used to compare the samples showed that cell adhesion on all PHBV membranes was significantly different when compared to negative controls ($p < 0.05$) (Fig.4). Untreated PHBV showed lower result than positive control ($p < 0.05$). The greatest cell adhesion was observed on the PHBV N₂ (5), which was higher than positive control ($p < 0.05$). The PHBV treated by oxygen plasma or PHBV N₂ (4) membrane, were not significantly different from the positive control ($p < 0.05$).

Our results showed that PHBV N₂(5) membrane had better cell adhesion capacity than the positive control (Fig. 2). The values observe in the control are similar to the ones reported for untreated PHBV that does not present good cell adhesion and have poor cell–matrix interaction [5]. The quantification of cell adhesion on plasma treated surfaces showed considerable differences between the oxygen and nitrogen treatments. This result is in accordance with the ones in which the surface chemical composition and/or topography affect the interaction force that acts between the biomaterial and biological medium, for instance, water and ion adsorption, protein adsorption, adhesion, cellular expansion and proliferation [6]. Many studies showed that the cells adhere, spread, and grow in an easier manner on substrates with moderate hydrophilicity than on hydrophobic or highly hydrophilic substrates [14,30], because hydrophilic surfaces permits the adsorption of serum proteins with labile and reversible bond. It is believe that this mechanism is to be slower on extremely hydrophobic or hydrophilic surfaces, which is probably one reason that may contribute for cells not adhere and proliferate so well on them [32,33]. It is known that adhesion and spreading are the morphologic phenomena of a series of molecular events occurring in and around the cell, mediated by trans-membrane receptors for extracellular matrix proteins, the integrins [23]. However, other authors [48] suggest that some chemical groups have more significant role in cell adhesion than the general surface properties. Both studies are in accordance with our results, where cells showed better adhesion on treated PHBV surfaces. It is clear that specific surface properties have pivotal role on cell adhesion behavior. The data generated by this battery of assays allow a response on the cytotoxic potential of materials or devices with a higher grade of certainty. Therefore, direct test allowed determining not significant induction of cytotoxicity and did present the ideal surface properties for Vero cells adhesion and proliferation [33].

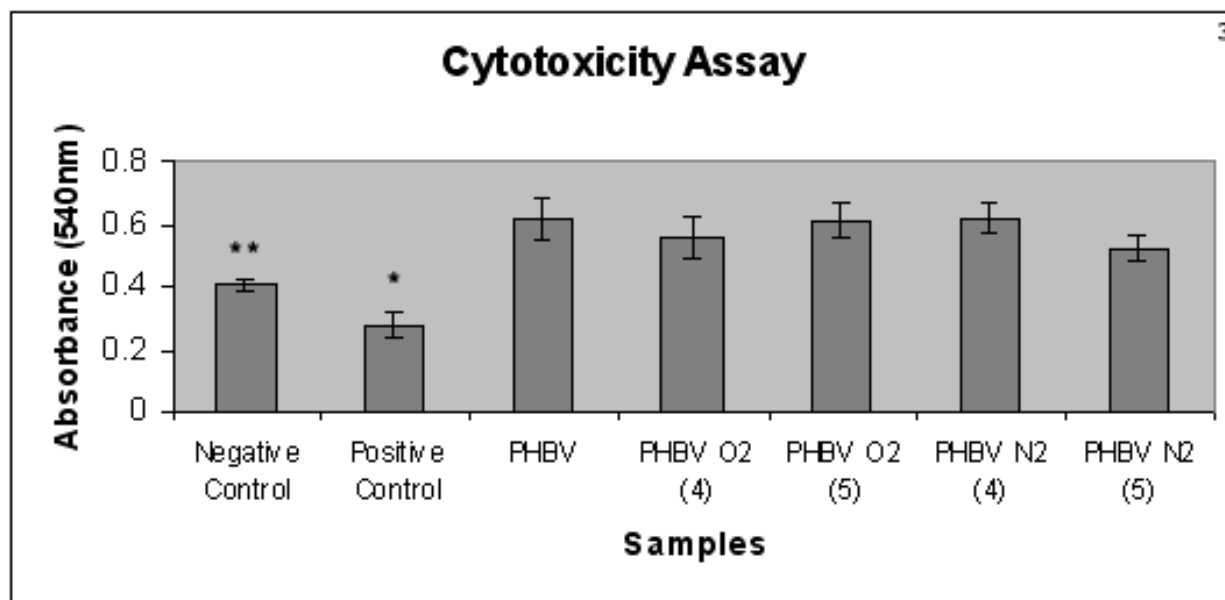


Figure 3 – PHBV treated and untreated showed better results than positive (látex and fenol) (* $p < 0,00000005$) and negative control (polystyrene) (** $p < 0,0005$). Negative control versus positive control are significantly different ($p < 0,0005$), (ANOVA, analysis of variance $F=72,55332$, $p=0$).

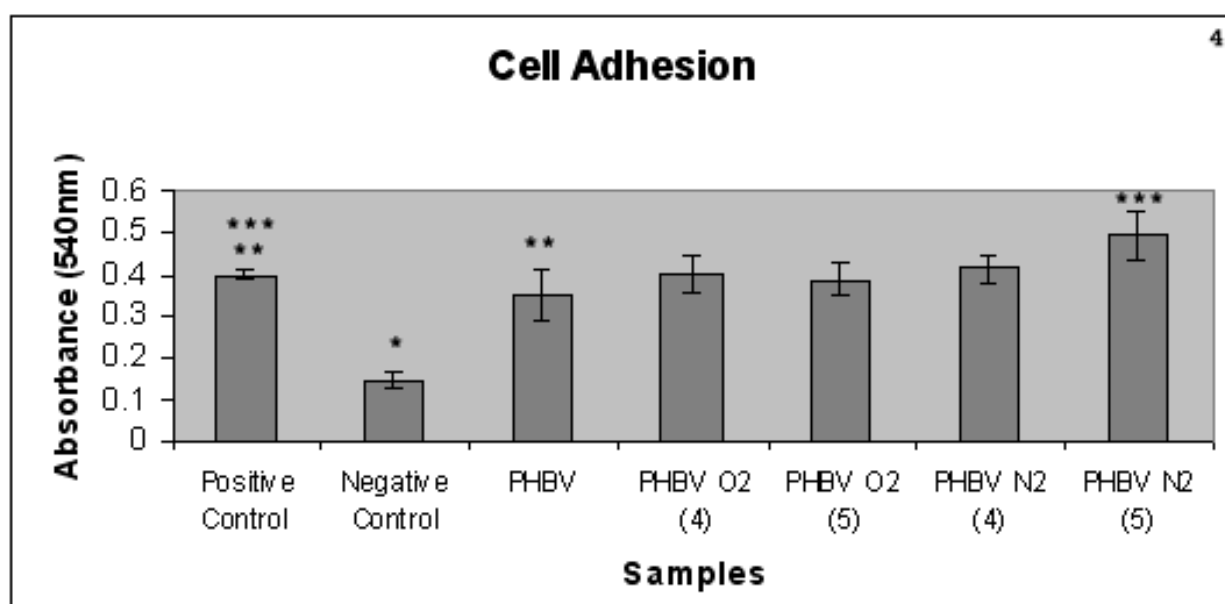


Figure 4 - All membranes showed good capacity to stimulate cell adhesion after two hours compared with the teflon dishes used like negative control (* $p < 0,00005$). The PHBV membrane showed low cell adhesion than positive control (** $p < 0,05$) and the PHBV N₂ (5) membrane showed better cell adhesion capacity than the positive control (*** $p < 0.0005$), (ANOVA, analysis of variance $F=54,21636$, $p=0$).

3.4 Ultrastructural analysis of cell adhesion

With scanning electron microscopy we could observe morphological aspects of cell growth in all studied treatment, suggesting that the material was innocuous to the cells. Early cell grown on the untreated PHBV showed round or spreading cells attached on biomaterial surfaces by thin cytoplasmatic filaments (Fig 5A), such behavior was observed previously for Vero cells seeded on untreated scaffolds by our group [3,6,9,10,12]. After 2 hours of Vero cells cultivation on the plasma treated PHBV it is noticed a larger density of adhered cells (Fig. 5B-5E). The morphology of the cells on oxygen treated membranes and mainly nitrogen were quite different. The cell on the oxygen treated membranes showed some times a round profile (Figs 5B-5C) of still moving cells, while nitrogen treatment shows a larger number of cells with philopodes and large lamellipods on their edges (Figs 5D-5E) as it was observed on the surfaces where cells will complete their movement and adhere tightly, forming focal contacts within a shorter time of cultivation [37]. Surface charge of substratum is a very important factor for Vero cells to adhere [3,6,7,38]. We have successfully induced surface modifications to improve cell adhesion. The results of Vero cells culture *in vitro* showed that the polar creation of functionalities on PHBV surface was favorable for Vero cells to adhere and spread due to the enhancement of the interaction between membrane polar groups and the surface cells. Consequently, the cells could grow and proliferate naturally in a short lapse of time. Nitrogen plasma enhances rapidly (2 hours) the interaction between Vero cell and PHBV membrane promoting anchor to the substrate and spreading and the proliferation ratio became higher than that on the oxygen and untreated membranes. Therefore, it can be concluded that the charge of the substrate surface would greatly influence the growth of Vero cells in adhesive experiments [39].

After surface attachment, the high number of round cells observed on all plasma treated membranes at 24 hours (Fig. 6) could be associated with cell proliferation during this time, demonstrating that plasma treatment not only support adhesion but division and growth properly. Previous study demonstrated that very low cell proliferation ratio are due to lower attachment ratio, on negative charged membrane resulting in negative proliferation ratio which means many cell death during a short period of time [40].

After cultured for 48 hours, all cells seeded on plasma modified membranes anchored on substrate and displayed flattened and spreading morphology, mainly on N₂ treated PHBV (Fig. 7), as a result of a good arrangement of (COOH and NH) polar groups on treated substrate that improves its cytocompatibility to Vero cells. Cell number reached confluence on all samples, as it can be observed in long-term culture, and also displays a behavior of aligned fibroblastic cells that probably increase their adherence to surface, as compared to cell seeded to polish surfaces [37, 41].

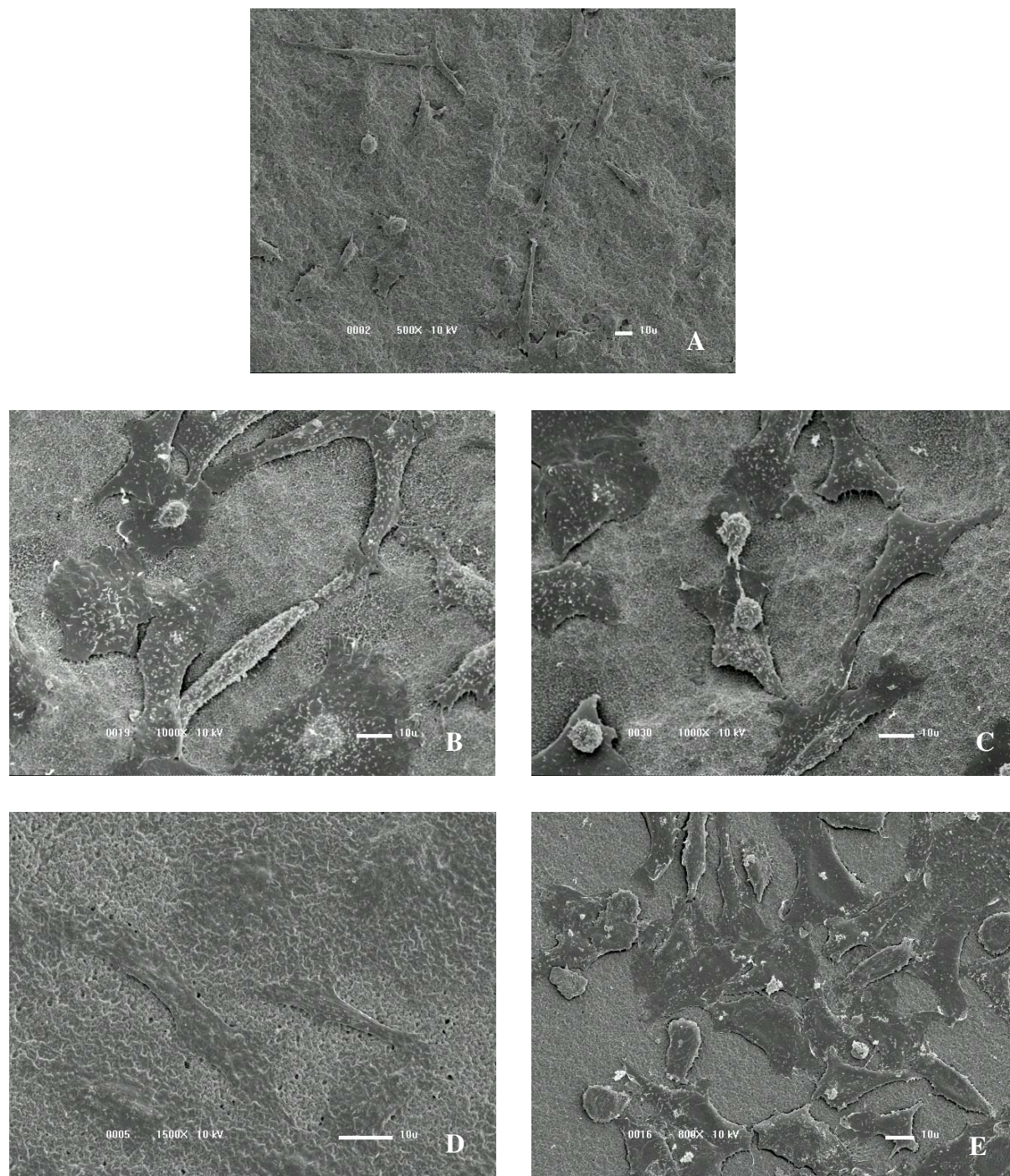


Figure 5 – Scanning Microscopy Electronic (SEM) of Vero cells on PHBV membranes after 2 hours. A) Untreated PHBV, showed few cells adhered; B) PHBV O₂ # 4, showed round cells with thicker filopodia, lamellapodia and vesicles; C) PHBV O₂ # 5 showed similar aspects to PHBV O₂ # 4; D) Observe flat cells stretched on PHBV N₂ # 4 and # 5 (E). Bar: 10µm

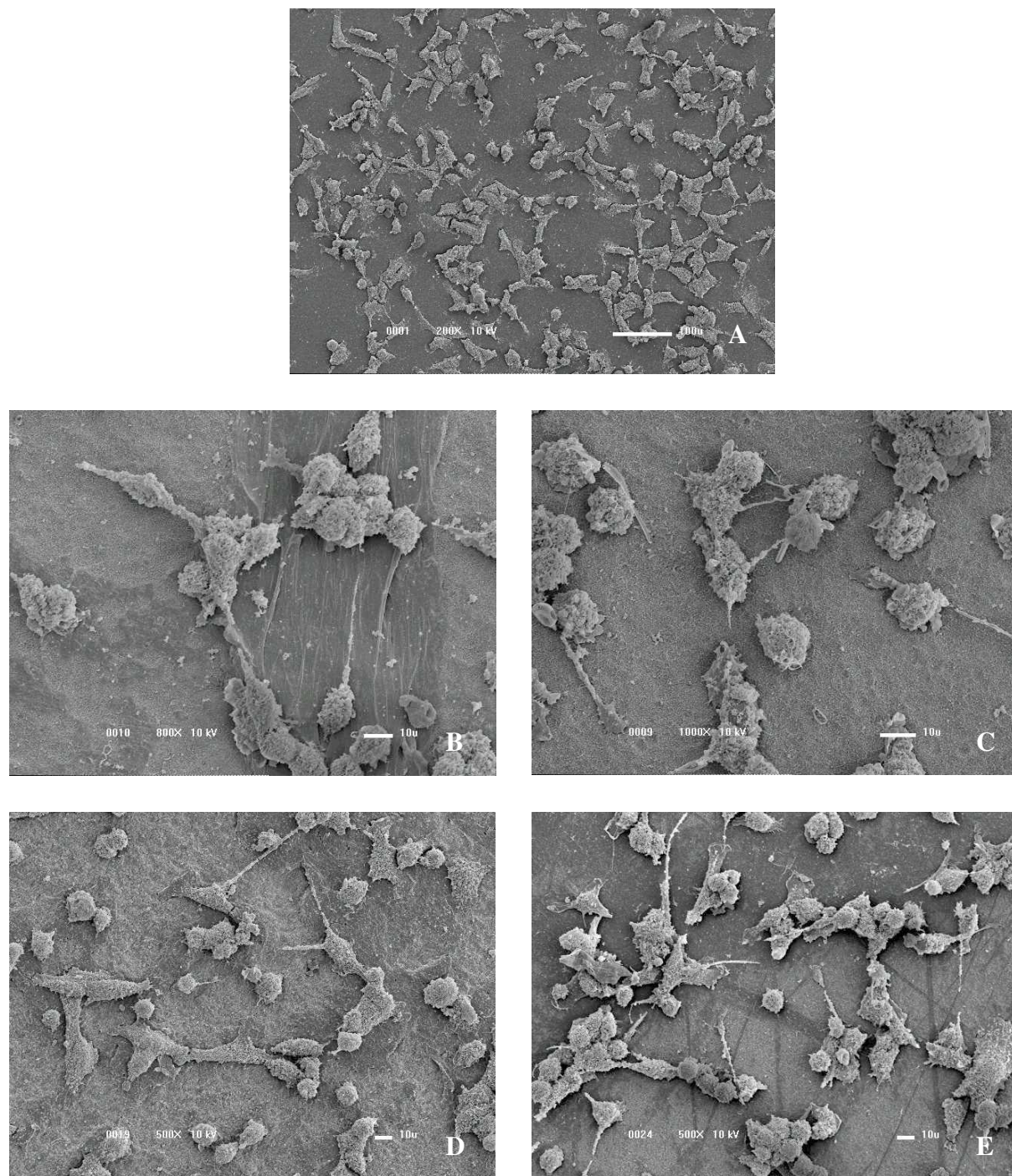


Figure 6 – Scanning Microscopy Electronic (SEM) of Vero cells on PHBV after 24 hours of cultivation. A) Untreated PHBV has similar outlines of lamellipodia than that in membranes of treated PHBV (B-E); B) PHBV O₂ # 4, showed more round cells like PHBV O₂ # 5 (C); D) PHBV N₂ # 4, showed more lamellipodia than PHBV O₂. A) Bar: 100 μm; B-E) Bar: 10 μm.

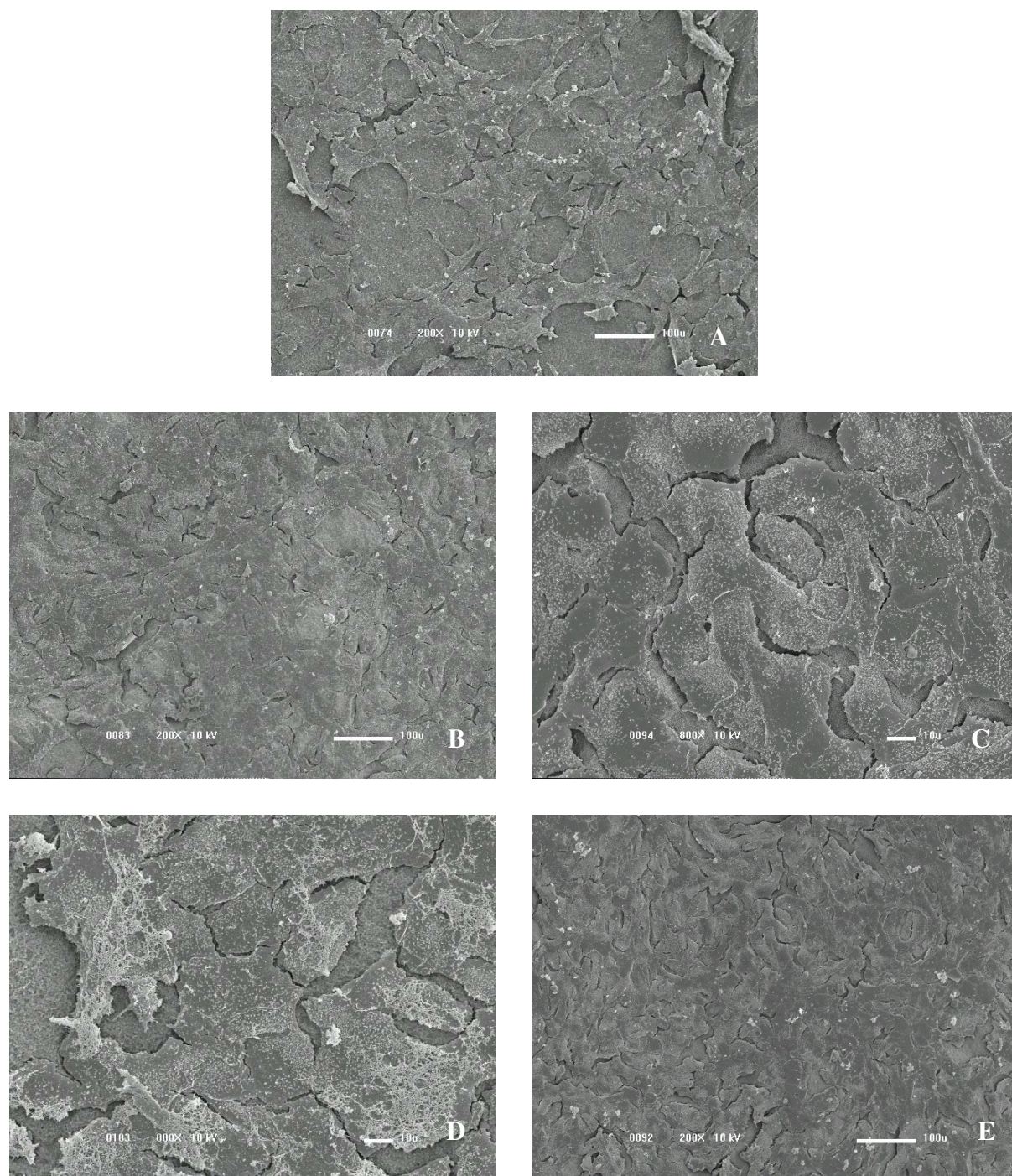


Figure 7 – Scanning Microscopy Electronic (SEM) of Vero cells on PHBV membranes after 48 hours of cultivation. A) Untreated PHBV; B) PHBV O₂ # 4; C) PHBV O₂ # 5; D) PHBV N₂ # 4; E) PHBV N₂ # 5. Cell number reached confluence on all samples, as it can be observed in long-term culture and displayed flattened and spreading morphology. A, B, E scale bar: 100 µm; C-D, bar: 10 µm.

4. Conclusion

Our results showed that plasma treatment at PHBV increases nano-roughness pattern of PHBV films and consequently their gain a moderate hydrophilicity. This physicochemical change modified Vero cell behavior stimulating cell adhesion, cell growth and spreading. A very early time of cultivation showed that cell size on untreated PHBV was smaller than the cells growing on oxygen treated membrane. More flattened cells were observed on the nitrogen treated PHBV membranes. The qualitative and quantitative results indicate that cells spread better on nitrogen treated surface. Our results are similar to that found elsewhere in the literature concerning cell growth on biomembranes after plasma treatments. It showed that cells cultivated on the biomaterials exposed to intermediate levels of plasma pressure and potency [# (5) plasma], adhere and growth but are not so flattened as it was observed when cultivated on PHBV, exposed to higher levels of plasma pressure and potency [# (4) plasma]. At this PHBV treatment cells also presented a large amount of small microvilli on their surfaces. These studies also showed that the cells adhere, spread, and grow in an easier manner on substrates with moderate hydrophilicity.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP (process 03/02188-5) for support and Brazilian Synchrontron Light Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil.

References

- [1] E.I. Shishatskaya, T.G. Volova, J Mater Sci Mater Med, 15 (2004) 915.
- [2] D.R. Silva, P.P. Joazeiro, E.A.R. Duek, M.C. Alberto-Rincon, J Biomater Sci Polym Ed 17 (2006) 177.
- [3] A.R. Santos Jr, B.M.P.Ferreira, E.A.R. Duek, M.A.H. Dolder, M.L. Wada, Braz J Med Biol Res 38 (2005) 1623.
- [4] C.A. Rezende, C. Lucchesi, M.L. Peris-Barbo, E.A.R. Duek, Polímeros 15 (2005) 323.
- [5] S.H. Barbanti, A.R. Santos Jr, C.A. Zavaglia, E.A.R. Duek, J Mater Sci Mater Med 15 (2004) 315.
- [6] A.R. Santos Jr, B.M.P. Ferreira, E.A.R. Duek, M.A.H. Dolder, R.S. Wada, M.L. Wada, Artif Organs 28 (2004) 381.
- [7] R.M. Luciano, C.A. Zavaglia, E.A.R. Duek, M.C. Alberto-Rincon, J Mater Sci Mater Med 14 (2003) 87.
- [8] S.M. Scapin, D.R. Silva, P.P. Joazeiro, M.C. Alberto-Rincon, R.M. Luciano, E.A.R. Duek, J Mater Sci Mater Med 14 (2003) 635.

- [9] D.R. Silva, S.M. Scapin, P.P. Joazeiro, M.C. Alberto-Rincon, R.M. Luciano, E.A.R. Duek, *J Mater Sci Mater Med* 13 (2002) 327.
- [10] C.B. Lombello, A.R. Santos Jr, S.M. Malmonge, S.H. Barbanti, M.L. Wada, E.A.R. Duek, *J Mater Sci Mater Med* 13 (2002) 867.
- [11] A.R. Santos Jr, S.H. Barbanti, E.A.R. Duek, M.A.H. Dolder, R.S. Wada, M.L. Wada, *Artif Organs* 25 (2001) 7.
- [12] E. A. R. Duek, C. A. C. Zavaglia, W. D. Belangero, *Polymer* 40 (1999) 6465.
- [13] R. A. Zoppi, S. Contant, E. A. R. Duek, F. R. Marques, M. L. F. Wada, S. P. Nunes, *Polymer* 40 (1999) 3275.
- [14] A. Tezcaner, K. Bugra, V. Hasirci, *Biomaterials*, 24 (2003) 4573.
- [15] V. Hasirci, A. Tezcaner, N. Hasirci and S. Süzer, *J Appl Polym Sci* 87 (2003) 1285.
- [16] C.W. Pouton, S. Akhtar, *Adv Drug Del Ver* 18 (1996) 133.
- [17] R. Sodian, S.P. Hoerstrup, J.S. Sperling, D.P. Matin, S. Daebritz, J.E. Mayer J.E. Vacanti, *ASAIO J* 46 (2000) 107.
- [18] M.F. Yagmurlu, F. Korkusuz, I. Gürsel, P. Korkusuz, Ü. Örs, V. Hasirci, *J Biomed Mater Res* 46 (1999) 494.
- [19] A.L. Iordanskii, E.V. Dimitriev, P.P. Kamaev, G.E. Zaokov, *J Appl Ploym Sci* 47 (1999) 595.
- [20] T. Volova, E. Shishatskaya, V.Sabastianov, S. Efremov, O. Mogilnaya, *Biochemical Eng J* 16 (2003) 125.
- [21] G.T. Köse, H. Kenar, N. Hasirci, V. Hasirci, *Biomaterials* 24 (2003) 1949.
- [22] I. Keen, O. Broota, L. Rintoul, P. Fredericks, M. Trau, L. Grondahl, *Biomacromolecules* 7 (2006) 427.
- [23] T.G. van Kooten, H.T. Spijker, H.J. Busscher, *Biomaterials* 25 (2004) 1735.
- [24] M. Yamaguchi, T. Kanamori, M. Niwa, S. Nagaoka, M. Kamiya *J. Artif. Organs* 7 (2004) 187.
- [25] Seal, B.L.; Otero, T.C.; Panitch, A. *Mater Sci Eng R* 34 (2001) 147.
- [26] P.K. Chu, J.Y. Chen, L.P. Wang, N. Huang, *Mater Sci Eng R* 36 (2002) 143.
- [27] ASTM F813-83. Standard practice for direct contact cell culture of materials for medical devices.
- [28] ISO 10993-1 (1992) Biological evaluation of medical devices-Part.5 – Test for cytotoxicity: “in vitro” methods.
- [29] Kirkpatrick, C.J., *Reg. Affairs* 4 (1992) 13.
- [30] T.Mossmam, *J Immunol Methods* 65 (1983) 55.
- [31] Y. Wan, Y. Wang, Z. Liu, X. Qu, B. Han, J. Bei and S. Wang, *Biomaterials* 26 (2005) 4453.
- [32] C. Riccardi, R. Barni, E. Selli, G. Mazzone, M.R. Massafra, B. Marcandalli, G. Poletti, *Applied Surface Science* 211 (2003) 386.

- [33] J. Yang, J. Bei, S. Wang, *Biomaterials* 23 (2002) 2607.
- [34] A.P. Marques, H.R.Cruz1, O.P. Coutinho, R.L. Reis, *J Mater Sci Mater Med* 16 (2005)
- [35] T. G. Van Kooten, C. L. Klein, H. Koæ Hler, C. J. Kirkpatrick, D. F. Williams, R. Eloy, *J Mater Sci Mater Med* 8 (1997) 835.
- [36] I . Pashkuleva, A. P . Marques, F . Vaz, R. L. Reis, *J Mater Sci Mater Med* 16 (2004) 81.
- [37] Köse, G.T., Ber, S., Korkusuz, F., Hasirci, V. J., *Mater Sci Mater Med* 14 (2003) 121.
- [38] E. Eisenbarth, P. Linez, V. Biehl, D. Velten, J. Breme, H.F. Hildebrand, *Biomolecular Engineering* 19 (2002) 233.
- [39] T. Asakura, C. Tanaka, M. Yang, J. Yao, M. Kurokawa, *Biomaterials* 25 (2004) 617.
- [40] Y. Zhu, Y.Sun, *Colloids Surf* 36 (2004) 49.
- [41] M.J.Dalby, S.J. Yarwood, M.O. Riehle, H.J.H. Johnstone, S. Affrossman, A.S.G. Curtis. *Experimental Cell Research.*, 276 (2002) 1-9.

CONCLUSÃO

O tratamento das membranas de PHBV por plasma tem a capacidade de induzir alterações físico-químicas na superfície das membranas, alterando a rugosidade e hidrofiliabilidade.

O tratamento por plasma, independente do gás utilizado, não provocou nenhum efeito tóxico às células Vero.

As modificações físico-químicas resultantes do tratamento das membranas de PHBV com diferentes tratamentos de plasma permitiram uma adesão e proliferação celular mais significativa, independentemente do tratamento realizado.

Os dados obtidos nos permitiram oferecer subsídios no que se refere à estratégias para o aumento da adesão celular aos dispositivos biomédicos confeccionados com PHBV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKESON, W.H.; WOO S.L-Y.; COUTTS, R.D.; MATTHEWS, J.V.; GONSALVES, M.; AMIEL, D. Quantitative histological evaluation of early fracture healing of cortical bones immobilized by stainless steel and composites plates. *Calcif Tiss Res*, v.19, p.27-37, 1975.

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

ASAKURA, T.; TANAKA, C.; YANG, M.; YAO, J.; KUOKAWA, M. Production and characterization of silk-like hybrid protein, based on the polialanine region of Samia cynthia ricini silk fibroin and a cell adhesive region derived from fibronectin. *Biomaterials*, v.25, p.617-24, 2004.

ASTM F813-83. Standard practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices.

ATALA A, Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Research*, v. 7, p. 15-31, 2004.

BARBANTI, S. H., SANTOS JR., A. R., ZAVAGLIA, C. A. C., DUEK, E. A. R. Porous and dense poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: in vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.15, p.1315-1321, 2004.

BARTH E.; RONNINGEN, H.; SOLHEIN, L.F. Tissue reactions to ceramics and glass ceramics. *Acta Orthopaedica Scandinava*, v.59, p.219-220, 1988.

BIANCHI, N.O.; AYRES, J. Heterochromatin location on chromosomes of normal and transformed cells from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Exp Cell Res*, v.68, p.253-58, 1971.

BIGERELLE, M. & ANSELME, K. Bootstrap analysis of the relation between initial adhesive events and long-term cellular functions of human osteoblasts cultured on biocompatible metallic substrates. *Acta Biomater.*, v. 1, p.499-510, 2005.

BORETOS, J.W. Concise guide to biomedical polymers. Illinois: Springfield, 1973.

CHAN C.-M. Polymer surface modification and characterisation. Hanser: Munich, 1993

CHU, P.K.; CHEN, J.Y.; WANG, L.P.; HUANG, N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Mater Sci Eng Ver.* v.36, p.143-206, 2002.

DALBY, M.J.; YARWOOD, S.J.; RIEHLE, M.O.; JOHNSTONE, H.J.H.; AFFROSSMAN, S.; CURTIS, A.S.G. Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13 nm high polymer demixed island. *Experimental Cell Research.*, v.276, p.1-9, 2002.

DI SILVIO, L.; DALBY, M.J.; BONFIELD, W. Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes. *Biomaterials* v.23, p.101-107, 2002.

DUEK, E.A.R., ZAVAGLIA, C.A.C., BELANGERO, W.D. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. *Polymer*, v.40, pp.6465-6473, 1999.

EL-AMIN, S. F., LU, H. H., KHAN, Y., BUREMS, J., MITCHELL, J., TUAN, R. S., LAURENCIN, C. T. Extracellular matrix production by human osteoblasts cultured on biodegradable polymers applicable for tissue engineering. *Biomaterials*, v.24, p. 1213-1221, 2003.

EISENBARTH E.; VELTEN, D.; SCHENK-MEUSER, K.; LINEZ, P.; BIEHL, V.; DUSCHNER, H.; BREME, J. HILDEBRAND, H. Interactions between cells and titanium surfaces, *Biomol Eng*, 2002, Aug, 19(2-6) p. 243-9

FERREIRA, B.M.P., ZAVAGLIA, C.A.C., DUEK, E.A.R. Films of Poly(L-lactic acid) / Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) Blends: *In Vitro* Degradation. *Materials Research*, v. 4, n. 1, p. 34-42, 2001.

FREED, L. E., MARQUIS, J. C., NOHRIA, A., EMMANUAL, J., MIKOS, A. G., LANGER, R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultures on synthetic biodegradable polymers, *J Biomed Mat Res*, v.27, p.11-23, 1993.

GASSNER, F.; OWEN, A.J.; Some properties of poly(3-hydroxibutirate)-poly(3-hydroxivalerate) blends. *Polym Int* , v.39, p.215-219, 1996.

GEORGES, P.C.; JANMEY, P.A. Cell type-specific response to growth on soft materials. *J Applied Physiol*, v.98, p.1547-1553, 2005.

GENARI, S. C. & WADA, M. L. F. Alterations in the growth and adhesion pattern of Vero cells induced by nutritional stress conditions. *International Cell Biology*, v. 22, n. 4, p. 285-294, 1998.

GÖPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, v.17, p.103-114, 1996.

HASIRCI, V.; TEZCANER, A.; HASIRCI, N.; SÜZER, S. Oxygen plasma modification of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film surfaces for tissue engineering purposes. *Journal of Applied Polymer Science*, v.87, p.1285-1289, 2003.

HENCH L.L.; ETHRIGDE. Biomaterials: an interfacial approach, Academic Press, New York, 1982.

HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v.19, p.1419-1423, 1998.

- HYNES, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, v.48, p.549-554, 1987.
- HYNES, R.O. the impact of molecular biology on models for cell adhesion. *Bio Assays*, v.16, p.663-9, 1994.
- HYNES, R.O. Integrins: birectional, allosteric signaling machines. *Cell*, v.110, p.673-687, 2002.
- HOLLAND, S.J., TIGHE, B.J., GOULD, P.L. Polymers for biodegradable medical devices. The potencial of polyesters as controlled macromolecular release systems. *Controlled Release*, v.4, p.155-180, 1986.
- HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, v.21, p. 2529-2543, 2000.
- ISO 10993-5, 1992 (E) Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5 – Tests for cytotoxicity: *In vitro* Methods.
- JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KEEN, I.; BROOTA, O.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; TRAU, M.; GRONDAHL, L. Introducinh amine functionalities on a poly(3-hydroxybutirate-co-3-hydroxivalerate) surface: compring the use og ammonia plasma treatment and ethylenediamine aminolysis. *Biomacromolecules*, v.7, p.427, 2006.
- KESELOWSKY, B.G.; COLLARD, D.M.; GARCIA, A.J. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A.*, v.66, p.247-259, 2003.
- KIRKPATRICK, C.J. Biological testing of materials and medical devices – a critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. *Reg Affairs*, v.4, p.13-32, 1992.
- KÖSE, G.T.; KORKUSUZ, F.; KORKUSUZ, P.; PURALI, N.; ÖZKUL, A.; HASIRFI, V. Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study. *Biomaterials*, v.24, p.1949-1958, 2003.
- KÖSE, G.T.; BER, S.; KORKUSUZ, F.; HASIRCI, V. Poly(3-hydroxibutiric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) based tissue engineering matrices. *J Mater Sci Mater Med*, v.14, p. 121-6, 2003.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P., Tissue engineering. *Science*, v.260, p.920-26, 1993.
- LANGER, R., Tirrell, D. A. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, v.428, p. 487-492, 2004.
- LANGOWSKI, B.A.; UHRICH, K.E. Microscale plasma-initiated patterning (muPIP). *Langmuir*, v.21, p.10509-14, 2005.

LIM, H.S.; HAN, B.K.; KIM, J.H.; PESHWA, M.V. HU, W.S. Spatial distribution of mammalian cells grown on macroporous microcarriers with improved attachment kinetics. *Biotechnol Prog*, v.8, p.486-93, 1992.

LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F. Morphology of fibroblastic cells cultured on poly(HEMA-co-AA) substrates. *Cytobios*, v.101, p.115-122, 2000.

LOMBELLO C.B.; SANTOS JR A.R.; MALMONGE S.M.; BARBANTI S.H.; WADA M.L.; DUEK E.A. Adhesion and morphology of fibroblastic cells cultured on different polymeric biomaterials. *J Mater Sci Mater Med.*, v.13, p.867-74, 2002.

LUCIANO, R., ZAVAGLIA, C.A.C. AND DUEK, E. A. R, Synthesis And Characterization Of Porous Poly(Lactide Acid) Membranes: Study In Vitro And In Vivo-. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, v.14, p. 1-8, 2002.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic engineering of poly(3-hydroalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev*, v.63, p.21-53, 1999.

MANDL, S.; RAUSCHENBACH, B. Plasma immersion ion implantation . A new methods for homogeneous surfaces modification of complex forms of medical implants. *Biomed Tech*, v.45, p.193-8, 2000

MARRECO P.R.; da LUZ, M.P.; GENARI, S.C.; MORAES, A.M. Effects of diffrents sterilizations methods of the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used has wound dressings. *J Biomed Mater Res B Applied Biometerial*, v.15, p.868-77, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v.64, p.55-63, 1983.

ORÉFICE R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

OWEN, G.; MEREDITH, D.O.; GWYNN, I.; RICHARDS, R.G. Focal adhesion quantification – new assay of material biocompatibility?: review. *Eur Cell Mater*, v.9, p.85-96, 2005.

PAVANATTI, S.L. *Estudo sobre a biocompatibilidade da resina termoplástica UDEL P-1800 na musculatura de ratos*. Campinas: UNICAMP, Tese de Mestrado (Engenharia Mecânica) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica. 1994. 94p

PEREIRA L.F.R.; CAMARGO M.C.L.; DIAS C.J.JR, BALDUINO A, LORA S, LANGONE F, BOROJEVIC R, BLANCO M.AM. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp Neurol*, v.198, p. 457-68, 2006.

PEZZIN, A.P.T. *Obtenção e caracterização de blendas de poli(p-dioxanona)/poli(L-ácido láctico) (PPD/PLLA) para aplicação como prótese de menisco bioreabsorvível*. Campinas:

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Tese de Doutorado (Faculdade de Engenharia Mecânica), 2001.

POUTON, C.W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potencial in drug delivery. *Adv Drug Del Rev* v.18, p.133-162, 1996.

PU, F.R. *et al.* Effects of plasma treated PET and PTFE on expression of adhesion molecules by human endothelial cells *in vitro*. *Biomaterials*, v.23, p.2411-28, 2002.

RAI, B., TEOH, S. H., HUTMACHER, D. W., CAO, T., HO, K. H. Novel PCL-based honeycomb scaffolds as drug delivery systems for rhBMP-2. *Biomaterials*, v.26, p. 3739-3748, 2005.

RAMIRES, P.A. *et al.* Plasma treated PET surfaces improve the biocompatibility of human endothelial cells. *Biomaterials*, v.51, n.3, p.535-539, 2000.

REZENDE, C.A.; LUCCHESI, C.; PERIS-BARBO, M.L.; DUEK, E.A.R. Membranas de Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação *in vitro* e *in vivo*. *Polímeros*, v.15, n.3, 323-238, 2005.

ROSA, D.S. & PANTANO FILHO, R. Biodegradação: um ensaio com polímeros. Itatiba: Moara Editora, 2003.

SANTOS JR, A.R, BARBANTI, S.H., DUEK, E.A.R., DOLDER, M.A.H., WADA, R.S, WADA, M.L.F. Vero Cell Growth and Differentiation on Poly(L-Lactic Acid) Membranes of Different Pore Diameters. *Artificial Organs*, v. 25, p. 7-13, 2001.

SANTOS JR, A.R.; DOLDER, H; WADA, M.L.F. Dexamethasone and fetal calf serum effects in differentiation of Vero cells cultures on type I collagen gel. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* v. 35, p. 35-42, 2003.

SANTOS JR, A.R., FERREIRA, B.M.P.; DUEK, E.A.R., DOLDER, H., WADA, R.S., WADA, M.L.F. Differentiation pattern of Vero Cells cultured on poly (L-lactic Acid)/poly hydroxybutyrate) blends. *Artif. Organs*. v.28, p. 381-389, 2004.

SANTOS JR, A.R.; FERREIRA, B.M.P.; DUEK, E.A.R.; DOLDER M.A.H.; WADA, M.L.F. Use of blends of bioabsorbable poly(L-lactic acid)/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) as surface for Vero cells culture. *Braz J Med Biol Res*, v.38, p.1623-32, 2005.

SCAPIN, S.M.; SILVA, D.R.; JOAZEIRO, P.P.; ALBERTO-RINCON, M.C.; LUCIANO, R.M., DUEK, E.A.R., Use of triethylcitrate plasticizer in the production of poly(L-lactic acid) implants with different degradation times. *J Mater Sci Mater Med*, v.14, p.635-40, 2003.

SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mater. Sci. Eng. Res.*, v.34, p.147-230, 2001.

SILVA D.R.; JOAZEIRO, P.P.; DUEK, E.A.R.; ALBERTO-RINCON, M.C. *J Biomater Sci Polym Ed* , v.17 , p.177, 2006

SIOSHANSI, P. Surface modification of industrial components by ion implantation. *Mater. Sci. Eng.* v.90, p.373, 1987.

SOBALLE,K.,FRIEDMAN,R.J. Calcium hidroxyapatite in total joint arthroplasty. In: WISE,D.L.,ALTOBELLI,D.E.,TRANTOLO,D.J.,YASZEMSKI,M.J.,GRESSER,J.D. *Human Biomaterials Applications*. New Jersey: Humana Press, 1996. 462p. 13 7-167. ISBN 0896033376.

STEINBÜCHEL, A.; HEIN, S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms, *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v.71, p.81-123, 2001.

SYDISKIS, R.J.; GERHARDT, D.E. Cytotoxicity of impression materials. *J Prosthet Dent*, v.69, p.431-5, 1993.

SZYCHER,M.,SICILIANO,A.A.,REED,A.M. Polyurethane elastomers in medicine. In: DUMITRIUS,S. *Polymeric Biomaterials*. NewYork:MarcelDekker. 845p. 233- 275. ISBN 0824789695. 1994

TEZCANER, A.; BUGRA, K.; HASIRCI, V. Retinal pigment epithelium cell culture on surface modified poly (hydroxybutyrate – co – hydroxyvalerate) thin films. *Biomaterials*, 24, p.4573-4583, 2003.

TREPANIER, P., DUGRE, R. ALAIN, R. LAPIERRE, J. Growth of poliovirus using alginate entrapped- anchorage dependente Vero cells. *Cytotechnology*, v.4, p.261-9, 1990.

VAN KOOTEN *et al.* Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions. *Biomaterials*, v.25, p. 1735-1747, 2004.

VAN WACHEM, P.B.; *et al.* Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials*, v.6, p.403-8, 1985.

VOLOVA, T.; SHISHATSKAYA, E.; SABASTIANOV, V.; EFREMOV, S.; MOGILNAYA, O. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical Eng J* v.16, p.125, 2003.

VOGLER, E.A.; BUSSIAN, R.W. Short-term cell-attachment rates: a surface-sensitive test of cell-substrate compatibility. *J Biomater Res*, v.21, p.1197-1211, 1987.

ZOPPI, R. A., BARROS, P. P., CORAÇA, D. C., DUEK, E. A. R. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) and poly(ethylene oxide) blends. *Materials Research*. v.4 (2), pp.117-125, 2001

ZOPPI, R. A., CONTANT, S., DUEK, E. A. R., MARQUES, F. R., WADA, M. L., NUNES, S. P., Porous poly(l-lactide) membranes obtained by immersion precipitation process: morphology phase separation and culture of VERO cells. *Polymer*, v.40, pp. 3275-3289, 1999.

WAN, Y.; QU, X.; LU, J.; ZHU, C.; WAN, L.; YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Characterization of surface property of poly(lactide-co-glycolide) after oxygen plasma treatment. *Biomaterials*, v.25, pp.4777–4783, 2004.

WEBB, K. *et al.* Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading and cytoskeletal organization. *J Biomed Mater Res*, v.41, p.422-30, 1998.

WILLIAMS, D.F. (ed), Definitions in Biomaterials - Progress in Biomedical Engineering, *Elsevier*, v.4, Cap.1, 1987.

WILLIAMS, S.F.; MARTIN, D.P.; HOROWITZ, D.M.; PEOPLES, O.P. PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue Engineering. *Int J Biol Macromol*, v.25, p.111-121, 1999.

YAMAGUCHI, M.; SHINBO, T.; KANAMORI, T.; WANG, P.; NIWA, M.; KAWAKAMI, H.; NAGAOKA, S.; HIRAKAWA, K. KAMIYA, M. Surface modification of poly(L-lactic acid) affects initial cell attachment, cell morphology, and cell growth. *J. Artif. Organs*, v.7, p.187-193, 2004.

YANG, J.; BEI, J.; WANG, S. Enhanced cell affinity of poly(D,L-Lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. *Biomaterials* v.23, p.2607-2614, 2002.

Membranas de Poli (Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico) como Curativos para Pele: Degradação *In Vitro* e *In Vivo*

Camila A. Rezende
Instituto de Química, UNICAMP

Carolina Luchesi, Maria de Lourdes P. Barbo, Eliana A. R. Duek
Centro de Ciências Médicas e Biológicas, PUC-SP

Resumo: O poli (ácido lático-co-ácido glicólico) é um copolímero biodegradável e bioreabsorvível. Suas propriedades físico-químicas têm sido estudadas com o intuito de modular sua suscetibilidade à degradação e suas interações com células e fluidos biológicos para aplicações na área médica e odontológica. Neste trabalho, membranas de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) com e sem plastificante foram preparadas pela técnica de evaporação do solvente e caracterizadas *in vitro* e *in vivo*. Os resultados *in vitro* mostraram que a adição de plastificante diminui a temperatura de transição vítrea (T_g) das membranas e, conseqüentemente, aumenta a flexibilidade das mesmas. Com o avanço da degradação, verifica-se o aparecimento de regiões cristalinas e de poros. Os estudos *in vivo* mostraram que o polímero degradou rapidamente em contato com a pele sem causar inflamações sérias e protegeu a área ulcerada da ação de agentes externos. Além disso, a cicatrização das feridas foi mais rápida na presença das membranas mostrando que as mesmas podem ser potencialmente utilizadas como curativos para pele.

Palavras-chave: Poli (ácido lático-co-ácido glicólico), degradação *in vivo*, degradação *in vitro*, cicatrização, membrana.

Poly (lactide-co-glycolide) membranes as skin repair: *in vitro* and *in vivo* degradation

Abstract: Poly (lactide-co-glycolide) is a polymer with bioabsorption and biodegradation properties. The physical and chemical properties of this polymer have been studied in order to modulate its susceptibility to degradation and its interaction with cells and biological fluids, aiming at medical and dental applications. In this work, membranes of poly (lactide-co-glycolide) with and without plasticizer were prepared by solvent evaporation and characterized by *in vitro* and *in vivo* experiments. *In vitro* studies showed that the glass transition temperature decreased due to the addition of plasticizer and, consequently, their flexibility increased. During degradation, crystalline areas and porous appear. *In vivo* studies showed that the polymer degraded rapidly without causing inflammation and protected areas that were exposed to external agents. Furthermore, membranes improved wound healing time, indicating that they can be potentially used in skin repair.

Keywords: Poly (lactide-co-glycolide), *in vivo* degradation, *in vitro* degradation, cicatrization, membrane.

Introdução

Os primeiros usos de polímeros *in vivo* foram em aplicações onde o material mantinha-se inerte durante o tempo do implante e interações indesejadas deviam ser evitadas ou minimizadas. Apesar da prevenção de respostas indesejáveis ainda ser importante para muitas aplicações, novos polímeros capazes de interagir com células para promover crescimento e diferenciação têm sido desenvolvidos^[1].

Na classe dos poli (α -hidróxi ácidos) encontram-se muitos exemplos de polímeros bioreabsorvíveis que, após serem implantados no organismo para uma determinada finalidade, são absorvidos pelo mesmo. Exemplos de tais polímeros são o poli (L-ácido lático) (PLLA), o poli (ácido glicólico) (PGA), a poli (p-dioxanona) (PPD), o poli

(hidróxi butirato) (PHB), o poli (hidróxi valerato) (PHV) e seus copolímeros.

O poli (L-ácido lático) degrada lentamente gerando unidades cristalinas que podem causar uma resposta longa e prolongada por parte do tecido. Por outro lado, o poli (ácido glicólico) degrada tão rapidamente que se torna inconveniente para a maioria das aplicações. A grande vantagem da utilização do copolímero constituído pelas unidades monoméricas dos dois polímeros é poder variar a proporção entre elas e otimizar o tempo de degradação do material para determinadas aplicações^[2].

O processo de degradação do polímero que constitui o implante varia com sua massa molar, sua composição, história térmica, estrutura cristalina e quantidade de polímero aplicada. Assim, é importante estudar estas propriedades,

pois elas determinam o tipo e a intensidade da resposta inflamatória do tecido^[2-4].

Membranas densas e porosas de polímeros absorvíveis são obtidas com o intuito de servirem como um substrato para que células isoladas possam fixar-se e crescer até formar o tecido. Este suporte pode agir tanto como apoio físico, quanto como um substrato aderente para as células isoladas durante cultura *in vitro* ou subsequente implante para promover a regeneração natural de tecidos, especialmente ossos e cartilagens. Para este tipo de aplicação, é necessária uma matriz tridimensional, mecanicamente estável e com poros interconectados, para que as células possam crescer por toda a estrutura. À medida que as células crescem e se organizam, o polímero degrada e é absorvido pelo organismo, levando a uma substituição natural do tecido^[5-11]. O poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), PLGA, é bastante adequado para aplicações como suporte para células^[10]. Um estudo realizado por Peter e colaboradores mostrou que não ocorre desmineralização do osso durante a degradação do PLGA *in vivo*^[11]. Nakamura e colaboradores mostraram que não é observado o aparecimento de tumores após o implante e até o completo desaparecimento do copolímero implantado^[12].

Muitas técnicas têm sido empregadas na preparação de membranas porosas de polímeros bioreabsorvíveis: evaporação de solvente utilizando sal com granulometria controlada^[13], inversão de fase^[14] e borbulhamento de gás^[15]. Luciano e colaboradores mostraram que a adição de plastificante a uma matriz de poli (ácido láctico) produz membranas porosas e bioabsorvíveis com poros interconectados de tamanho controlado e com boas propriedades mecânicas para utilização como suporte para cultura de células^[16-18].

Além de suporte para células, o PLGA também tem sido estudado para aplicação em sistemas de liberação controlada de drogas no organismo. Neste caso, agentes terapêuticos são formulados dentro de microesferas ou discos do copolímero e a liberação da droga dependerá da degradação do polímero e da difusão da mesma^[19, 20].

Feridas na pele resultantes de queimaduras e doenças congênitas ou adquiridas são bastante perigosas para os pacientes, particularmente em casos em que a área atingida é extensa, uma vez que o ferimento está sujeito à invasão de bactérias e à perda de fluidos corpóreos. Sob estas condições, o recobrimento rápido e efetivo da ferida é essencial para o tratamento da enfermidade^[21]. Durante muitos anos, o tratamento convencional para este tipo de problema tem sido o transplante de pele. Contudo, este procedimento é difícil ou mesmo impossível em casos em que a área da ferida é muito grande, por exemplo, em queimaduras muito extensas, devido à inexistência de doadores, à rejeição do material implantado, ao tempo necessário para a total cicatrização e aos riscos envolvidos. Estas dificuldades tornam necessários estudos envolvendo materiais alternativos para proteção e cicatrização de ulcerações na pele, que sejam flexíveis, atóxicos e capazes de aderir adequadamente à área afetada, diminuindo a perda de fluidos e eletrólitos, protegendo contra a proliferação de micróbios e promovendo a cicatrização da ferida^[21].

Neste trabalho, membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) com e sem plastificante foram preparadas e suas propriedades foram estudadas com o objetivo de avaliar sua aplicação potencial como curativos para ulcerações na pele.

Experimental

Preparação das membranas

Foram preparadas membranas com e sem plastificante de dimensões 6 cm x 2 cm x 0,5 cm utilizando a técnica de evaporação do solvente. O polímero utilizado para preparação das membranas foi o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (50:50, MM 81700 g mol⁻¹) (PURAC- Groenigen - Holanda).

1) Membranas sem plastificante

Soluções poliméricas contendo polímero nas concentrações de 5 e 10% m/V foram preparadas, dissolvendo-se, respectivamente, 0,3 e 0,6 g de PLGA em 5,7 e 5,4 ml de clorofórmio (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha). Após completa dissolução do polímero sob agitação, as soluções foram depositadas em uma placa de vidro e colocadas dentro de uma cuba saturada com vapor de solvente. Após evaporação do solvente durante 24 horas, as membranas foram secas a vácuo por 8 horas e mantidas nesta condição até a caracterização.

2) Membranas com plastificante

Estas membranas foram preparadas exatamente como as anteriores, exceto pela adição do plastificante trietil citrato de sódio (ALDRICH, Milwaukee, USA) durante a dissolução por agitação.

No total, foram preparados cinco tipos de membranas: PLGA 5% (5% de polímero); PLGA 5%1p (5% de polímero e 1% de plastificante); PLGA 10% (10% de polímero); PLGA 10%3p (10% de polímero e 3% de plastificante) e PLGA 10%5p (10% de polímero e 5% de plastificante).

Degradação e caracterização *in vitro*

As membranas foram imersas em tampão fosfato (pH = 7), dentro de tubos de ensaio fechados à temperatura de 37 °C e retiradas após 15, 30, 60 e 120 dias. Ao final de cada período, as membranas foram removidas da solução tampão, lavadas e mantidas em água destilada por 1 hora para remover a maior quantidade possível de solução tampão. Antes e após a degradação, as membranas foram caracterizadas pelas técnicas descritas a seguir.

Calorimetria diferencial de varredura (DSC): aquecimento entre 25 e 200 °C seguida de isoterma por 5 minutos. Após isto, as amostras foram resfriadas a -20 °C, mantidas novamente em isoterma por 5 minutos e reaquecidas até 200 °C. Tanto o aquecimento quanto o resfriamento foram realizados em uma taxa de 10 °C min⁻¹ e o equipamento utilizado foi um DSC 2920 – Modulated DSC (TA Instruments).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV): amostras de superfícies de membranas e fraturas (obtidas em nitrogênio líquido) foram metalizadas com ouro (Sputter Coater BAL-

TEC SCD 050) e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA 860) operado a 10 kV.

Difratometria de raios-x: as análises foram realizadas em ângulos entre 0 e 50° em um difratômetro de raios-x Shimadzu XD3A com fonte de radiação CuK α . A voltagem utilizada foi de 30 kV e a corrente de 20 mA.

Degradação e caracterização *in vivo*

Dois tipos de membranas (10%3p e 10%5p) foram implantados. O estudo envolveu 24 ratos Wistar de ambos os sexos com aproximadamente 3 meses de idade e 0,4 kg de peso. Os ratos foram divididos em 3 grupos de 8 ratos cada. A membrana 10%5p foi implantada no primeiro grupo e a 10%3p no segundo. No terceiro grupo, a ferida não foi recoberta. A pele normal retirada durante a intervenção cirúrgica foi armazenada em formaldeído e serviu como controle. Durante o período do estudo os ratos receberam ração comercial, água *ad libitum* e anestésicos antes da cirurgia. A pele e o subcutâneo foram dissecados, removidos até o nível da fascia e as feridas resultantes foram recobertas com pedaços de membranas poliméricas (2 cm x 2 cm x 0,5 cm). Os implantes foram removidos após 1, 3, 5, 7, 10, 21 e 30 dias, desidratados e processados para inclusão em parafina. As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e examinadas em um microscópio ótico NIKON Eclipse E800.

Resultados e Discussão

Degradação *in vitro*

Os valores de temperatura de transição vítrea (T_g) foram obtidos antes e após a degradação para as membranas de PLGA por calorimetria diferencial de varredura (DSC) (curvas de segundo aquecimento). Observando os valores de T_g na Tabela 1, é possível verificar que as membranas com plastificante apresentam valores de T_g sempre menores que as membranas de mesma concentração às quais o plastificante não foi adicionado. No entanto, este efeito é predominantemente observado antes do início do processo de degradação ou no início do processo (15 dias). Com 30 e 60 dias de degradação, os valores de T_g tanto para as membranas com plastificante quanto para as que não o contém tornam-se muito semelhantes. Um outro comportamento que também pode ser observado é a diminuição nos valores de T_g das membranas sem plastificante à medida que avança o tempo de degradação, o que pode ser explicado pela diminuição de massa molar que ocorre durante a degradação pela quebra das cadeias poliméricas. Para as membranas com plastificante, praticamente não se nota variação nos valores de T_g à medida que a degradação ocorre. Isso acontece, provavelmente, devido à ação de dois efeitos de ação contrária: a saída de plastificante que difunde para a solução provocando aumento na T_g e a perda de massa molar do polímero em consequência do processo de degradação, que diminui a T_g .

Antes da degradação e nos estágios iniciais (até 30 dias) apenas as temperaturas de transição vítrea aparecem nos termogramas em temperaturas aproximadamente entre 20 e 40 °C, indicando que o polímero é amorfo (Figura 1a-e). Com

Tabela 1. Temperatura de transição vítrea (T_g) (°C) para as membranas de PLGA em função do tempo de degradação, obtidos por DSC (2ª aquecimento).

Membranas de PLGA	Tempo de degradação			
	zero	15 dias	30 dias	60 dias
5%	44	40	26	21
5%1p	18	26	26	23
10%	46	40	16	***
10%3p	11	23	14	15
10%5p	12	18	21	15

*** Não aparece na curva

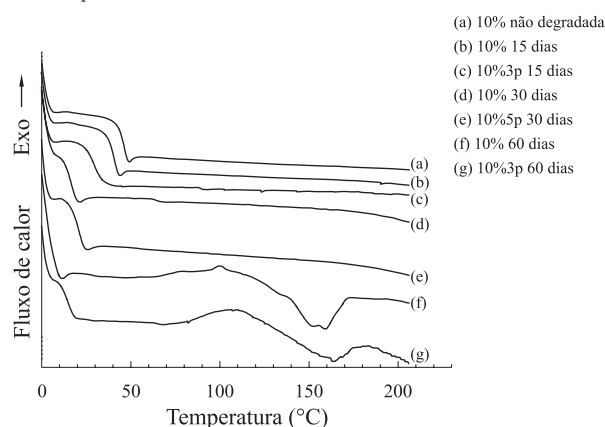


Figura 1. Termogramas de DSC obtidos para as membranas de PLGA: (a) 10%5p – não degradada; (b) 10% – 15 dias; (c) 10%3p – 15 dias; (d) 10% – 30 dias; (e) 10%5p – 30 dias; (f) 10% – 60 dias; (g) 10%3p – 60 dias.

60 dias de degradação, nas amostras com concentração de polímero em 10%, há o aparecimento de um discreto pico endotérmico em torno de 150 °C, o que é um indicativo de que está ocorrendo cristalização do polímero durante o processo de degradação. Li e colaboradores observaram um comportamento similar estudando a degradação *in vitro* de poli (D,L-ácido lático) em pH 3,4 e 7,4 e temperaturas de 37 e 60 °C. Inicialmente, o polímero apresenta um comportamento

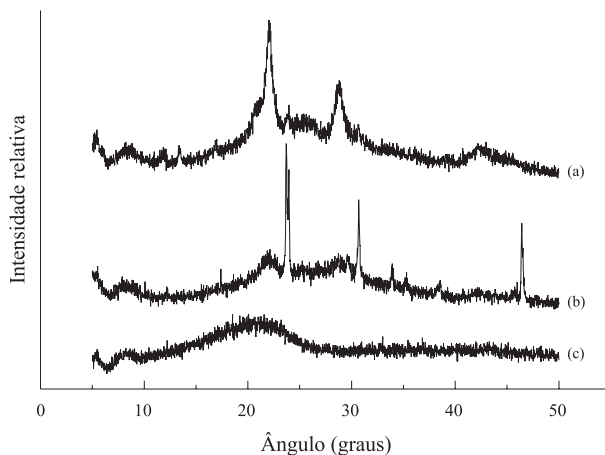


Figura 2. Difratogramas de raios-x obtidos para as membranas de PLGA: (a) 10%5p – 120 dias; (b) 10%5p 60 dias; (c) 10%5p antes da degradação.

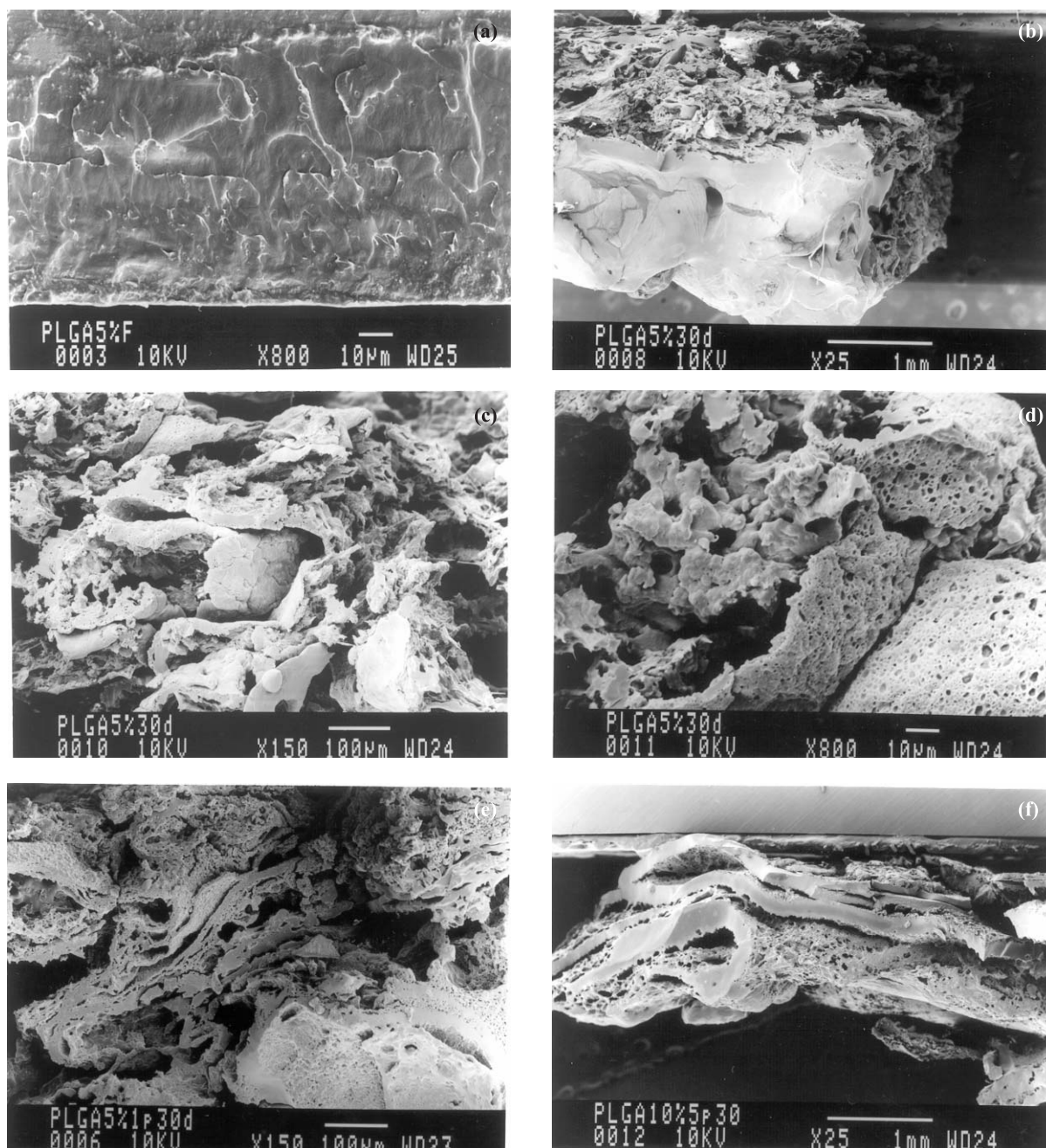


Figura 3. Micrografias de fraturas de membranas de PLGA antes e após a degradação: (a) PLGA 5% antes da degradação; (b, c, d) PLGA 5% - 30 dias; (e) PLGA 5%1p - 30 dias; (f) PLGA 10%5p - 30 dias.

tipicamente amorfo e, à medida que o processo de degradação avança, aparecem picos endotérmicos nas curvas de DSC e picos no difratograma referentes à formação de regiões cristalinas^[22]. A cristalinidade contribui para aumentar o tempo de degradação das membranas fazendo com que elas permaneçam no implante por mais tempo.

Na Figura 2, encontram-se os difratogramas de raios-x para a membrana PLGA 10%5p antes e após 60 e 120 dias de degradação. Pode-se observar uma banda larga com intensidade máxima em torno de 20 graus para a membrana (curva c) antes da degradação. Este mesmo comportamento foi observado em todas as membranas não-degradadas, independente da concentração de polímero ou da presença de

plastificante e indica que o copolímero é amorfo.

Após 60 dias de degradação, ocorre a formação de áreas cristalinas e o aparecimento de alguns picos definidos na membrana 10%5p (curva b), que se tornam mais pronunciados após 120 dias de degradação (curva a). Observou-se também o aparecimento de picos no difratograma das membranas 10% e 10%3p após 60 e 120 dias de degradação. Esses resultados indicam o mesmo comportamento já observado a partir da análise térmica: a formação de áreas cristalinas com o avanço do processo de degradação.

Na Figura 3 encontram-se micrografias de fraturas de membranas em função do tempo de degradação. A membrana 5% (que se encontra na Figura 3a) apresenta uma

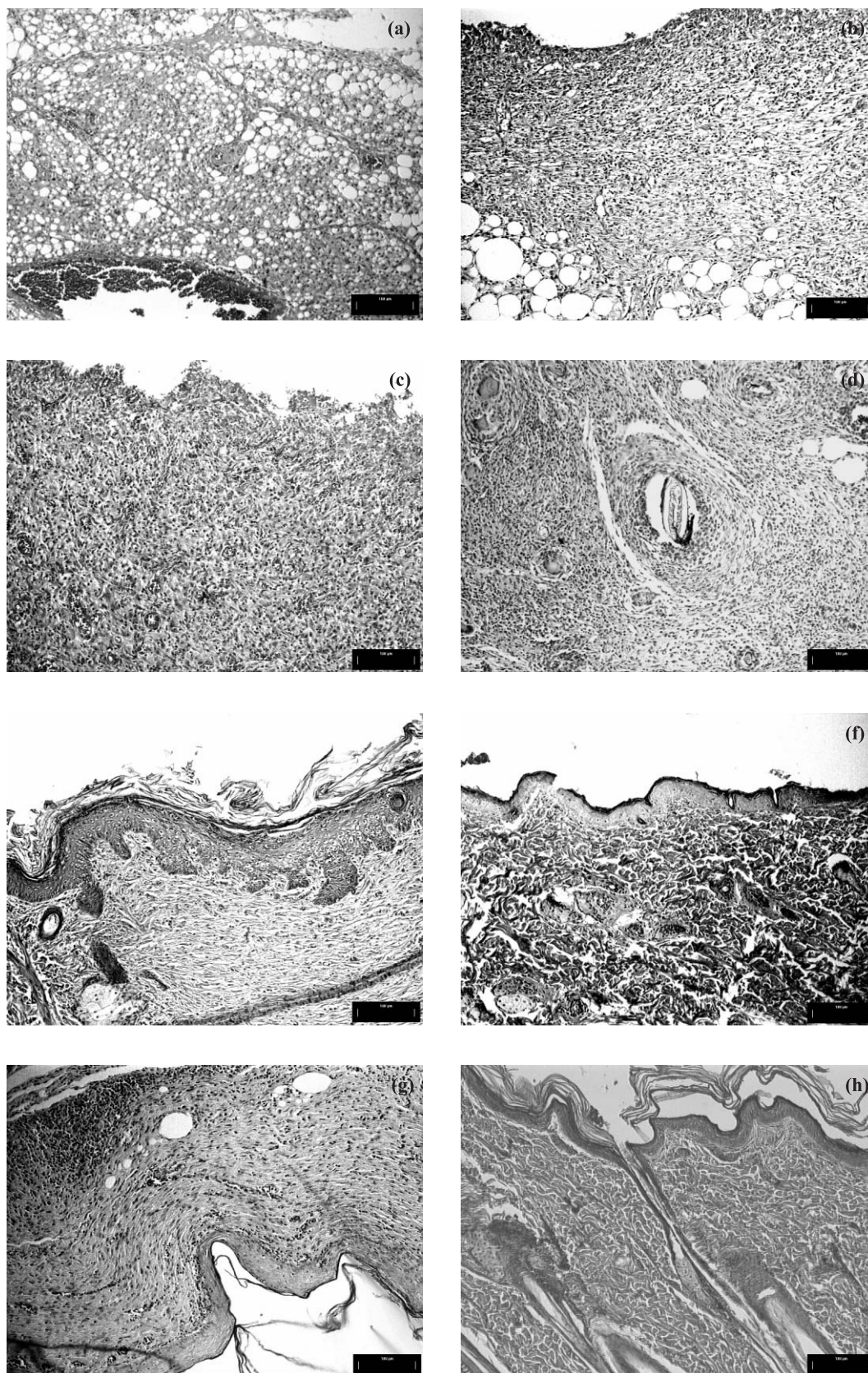


Figura 4. (a) Pele de rato sem membrana implantada (grupo 3) após 3 dias; (b) Pele de rato com implante de membrana 10%5p (grupo 1) após 5 dias; (c) Pele de rato sem membrana implantada após 5 dias; (d) Pele de rato sem membrana implantada após 10 dias; (e) Pele de rato com implante de membrana 10%3p após 21 dias; (f) Pele de rato com implante de membrana 10%5p após 30 dias; (g) Pele de rato sem membrana implantada após 30 dias; (h) Pele de rato normal mostrando os apêndices cutâneos. Barra = 100 µm.

morfologia densa antes da degradação. Membranas em todas as concentrações de polímero e plastificante apresentaram o mesmo aspecto denso antes da degradação, sendo que algumas delas eram mais lisas. Após 30 dias de degradação, a membrana 5% encontra-se em um estado de degradação bastante avançado (Figura 3b) e sua superfície tem um aspecto bem diferente do de sua superfície de fratura, assim como todas as outras membranas. Após a degradação, as membranas apresentam fraturas bastante características com sulcos, poros e uma aparência fragmentada (Figura 3c-f).

Em um trabalho anterior realizado por este grupo de pesquisa, mostrou-se que a adição do plastificante trietil citrato de sódio a membranas de poli (ácido láctico) (PLA) dava origem a uma morfologia com poros interconectados. Os estudos *in vivo* realizados com este material mostraram que ocorreu uma interação íntima do tecido em crescimento com estas membranas em consequência de sua porosidade^[16]. Assim, neste trabalho com membranas de PLGA, também foi adicionado plastificante ao polímero com o intuito de obter uma morfologia porosa.

No entanto, as membranas de PLGA apresentam um comportamento diferente das de PLA. Independente da presença de plastificante, estas membranas apresentam uma morfologia porosa após a degradação (Figura 3c-f). Este resultado é bastante positivo, já que o crescimento de células depende da presença de poros na matriz-suporte. A formação natural de poros nas membranas de PLGA durante a degradação dispensa procedimentos mais elaborados para a obtenção destes.

Por fim, durante o estudo *in vitro* foi possível observar que membranas sem plastificante são pouco flexíveis, o que é reflexo dos seus valores de Tg mais altos em relação às membranas com plastificante. Isso dificulta a sutura das mesmas durante o implante do material e seu contato efetivo com a ferida, tornando sua função protetora menos eficiente. Por outro lado, as membranas com 5% de polímero são mais finas e rasgam durante a sutura por conterem menor quantidade de material. Dessa forma, foram selecionadas para serem implantadas as membranas 10%3p e 10%5p, que são relativamente mais flexíveis e mais espessas. Além disso, como ocorre formação de áreas cristalinas nas membranas com concentração 10% durante o processo de degradação, estas membranas possuem um tempo de degradação ligeiramente maior do que as membranas de concentração 5%.

Degradação *in vivo*

No primeiro dia após a cirurgia, as feridas sem membrana (grupo 3) apresentavam uma crosta superficial espessa, com infiltrado inflamatório agudo e abundantes neutrófilos polimorfonucleares. Por outro lado, nas feridas em que a membrana foi implantada, não ocorreu a formação da crosta superficial. No terceiro dia, ainda não se observava a formação da crosta nas feridas recobertas, mas apareciam células mononucleares e fibroblastos com escassos abscessos nas bordas da ferida. No grupo 3, onde não foram implantadas membranas, ainda havia infiltrado inflamatório agudo com piócitos, fibrina, restos necróticos e necrose extensa alcan-

çando a profundidade da lesão (Figura 4a).

No 5º dia, a pele com implante mostrava um tecido com aspecto reparativo, com organização das fibras de colágeno e escassos granulomas de corpo estranho (Figura 4b). No grupo de controle, a crosta permanecia e o processo inflamatório tinha características mistas com piócitos e início de formação de tecido de granulação (Figura 4c). Nos períodos subsequentes, evidenciou-se uma reparação mais precoce e organizada nas áreas recobertas pela membrana, enquanto que, no grupo 3, a reparação foi mais irregular com abundantes granulomas de corpo estranho contendo restos de materiais degradados (Figura 4d).

Após 21 e 30 dias, a repitelização foi praticamente total nos três grupos, com maior retração nas áreas recobertas pelas membranas que nos controles. Nos animais com membranas, a remodelação iniciou-se precocemente em comparação com o controle (Figura 4e) e também ocorreu menor reação inflamatória residual (Figuras 4f e 4g). Comparando os grupos 1 e 2 quanto a alterações inflamatórias e reparativas, não são notadas diferenças significativas entre o comportamento de cada grupo. Em ambos os casos, as cicatrizes apresentam diminuição significativa do número de anexos quando comparadas com as peles controle.

Embora este estudo *in vivo* seja um projeto piloto e envolva um número pequeno de casos (24 casos), foi possível notar diferenças que indicam que o uso destas membranas é promissor na proteção de lesões cutâneas. É importante considerar que as cirurgias foram propositalmente profundas alcançando a fascia, o que dificulta a cicatrização e impede a regeneração de anexos cutâneos. O retardamento na formação da crosta está relacionado à manutenção da hidratação local pela ação das membranas. O processo inflamatório que se desenvolve após a pele ter sido lesada mostrou ter uma evolução mais rápida e efetiva nas áreas protegidas do que nas sem proteção. Embora o implante de polímeros, por si só, desenvolva uma resposta inflamatória local^[13], não foram detectadas alterações que sugerissem reação inflamatória secundária. Além disso, as membranas propiciaram proteção contra agentes estranhos e traumatismos.

Conclusões

Os resultados do estudo *in vitro* mostraram que a Tg das membranas de PLGA diminui como consequência da adição de plastificante e do tempo de degradação. Análises de DSC e de difratometria de raios-X mostraram que, com o avanço da degradação, há o aparecimento de regiões cristalinas nas membranas de PLGA que, inicialmente, eram amorfas. A cristalinidade contribui para uma maior permanência da membrana implantada. Além disso, observou-se a formação de poros durante a degradação, o que proporciona maior interação tecido-matriz.

O estudo *in vivo* mostrou que as membranas contribuíram para manutenção da hidratação local e levaram a um processo inflamatório mais rápido comparado ao controle. De modo geral, as membranas oferecem boas perspectivas na proteção

de traumatismos de pequena e média intensidade em queimaduras superficiais e úlceras cutâneas crônicas de difícil tratamento como as que ocorrem em membros inferiores como consequência de diabetes, hipertensão e insuficiência vascular. Além disso, o uso destas membranas no recobrimento de grandes superfícies pode melhorar o prognóstico de pacientes, proporcionando proteção nas fases agudas e propiciando melhores condições clínicas para posteriores transplantes de pele.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapesp pelo apoio financeiro (processo 99/01381-9).

Referências Bibliográficas

- Hench, L. L. - "Bioactive Materials: the Potential for Tissue Regeneration", in: Founders Award, Society for Biomaterials 24th Annual Meeting, San Diego - CA, abril (1998).
- Van der Elst, M.; Klein, C. P. A. T.; Blicek-Hogervorst, J. M.; Patka, P.; Haarman, H. J. Th. M. - Biomaterials, 20, p. 121 (1999).
- Ishaugh-Riley, S. L.; Crane, G. M.; Gurlek, A.; Miller, M. J.; Yasko, A. M.; Yaszemski, M. J.; Mikos, A. G. - Journ. of Biomed. Mater. Res., 36, p. 1 (1997).
- Wake, M. C.; Gerecht, P. D.; Lu, L.; Mikos, A. G. - Biomaterials, 19, p. 1255 (1998).
- Zoppi, R. A.; Contant, S.; Duek, E. A. R.; Marques, F. R.; Wada, M. L. F.; Nunes, S. P. - Polymer, 40, p. 3275 (1999).
- Park, J. B. - "Biomaterials: an Introduction", Plenum Press, New York (1979).
- Hench, L. L. & Ethridge, E. C. - "Biomaterials: an Interfacial Approach", Academic Press, New York, (1982).
- Holder, W. D.; Gruber, H. E.; Moore, A. L.; Culberson, C. R.; Anderson, W.; Burg, K. J. L.; Mooney, D. J. - Journ. of Biomed. Mater. Res., 41, p. 412 (1998).
- Harris, L. D.; Kim, B. S.; Mooney, D. J. - Journ. of Biomed. Mater. Res., 42, p. 396 (1998).
- Barbanti, S. H.; Santos Jr, A. R.; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E. A. R. Journ. Mater. Sci: Mater in Med. No prelo.
- Peter, S. J.; Miller, M. J.; Yasko, A. W.; Yaszemski M. J.; Mikos, A. G. - Journ. Biomed. Mater. Res., 43, p. 422 (1998).
- Nakamura, T.; Shimizu, Y.; Takimoto, Y.; Tsuda, T.; Li, Y. H.; Kiyotani, T.; Teramachi, M.; Hyon, S. H.; Ikada, Y.; Nishiya, K. - Journ. Biomed. Mater. Res., 42, p. 475 (1998).
- Lam, K. H.; Schakenraad, J. M.; Groen, H.; Esselbrugge, H.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J.; Nieuwenhuis, P. - Journ. Biomed. Mater. Res., 29, p. 929 (1995).
- Van de Witte, P.; Esselbrugge, H.; Dijkstra, P. J.; Van den Berg, J. W. A.; Feijen, J. - Journ. of Membrane Sci., 113, p. 223, (1996).
- Mooney, D. J.; Baldwin, D. F.; Suh, N. P.; Vacanti, J. P.; Langer, R. - Biomaterials, 17, p. 1417, (1996).
- Luciano, R. M.; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E. A. R.; Alberto-Rincon, M. C. Journ. Mater. Sci: Mater in Med., 14, p. 87, (2003).
- Silva, D. R. M.; Scapin, S. M. N.; Joazeiro, P. P.; Alberto-Rincon, M. C.; Luciano, R. M.; Duek, E. A. R. Journ. Mater. Sci: Mater in Med., 13, p. 327, (2002).
- Scapin, S. M. N.; Silva, D. R. M.; Luciano, R. M.; Joazeiro, P. P.; Duek, E. A. R.; Alberto-Rincon, M. C. Journ. Mater. Sci: Mater in Med., 14, p. 625, (2003).
- Choi, S.; Baudys, M.; Kim, S. W. - Pharmaceutical Res., 21, p. 827, (2004).
- Koushik, K.; Kompella, U. B. - Pharmaceutical Res., 21, p. 524, (2004).
- Wise, D. L. - "Human Biomaterials Applications", Humana Press Inc, Totowa (1996).
- Li, S.; McCarthy, S. - Biomaterials, 20, p. 35, (1999).

Enviado: 02/12/04

Reenviado: 29/03/05

Aprovado: 04/04/05