

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR André Dutra
Messias E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 30/06/11



ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

André Dutra Messias

**Arcabouços de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-
trimetileno carbonato) para o crescimento de
células osteoblásticas (SaOS-2)**

Campinas, 2011.

91/2011

André Dutra Messias

Arcabouços de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) para o crescimento de células osteoblásticas (SaOS-2)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Aparecida de Rezende Duek

Campinas
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

M563a Messias, André Dutra
 Arcabouços de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-
 trimetileno carbonato) para o crescimento de células
 osteoblásticas (SaOS-2) / André Dutra Messias. --
 Campinas, SP: [s.n.], 2011.

 Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek.
 Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

 1. Biomateriais. 2. Polímeros. 3. Engenharia
 Tecidual. 4. Osteoblastos. I. Duek, Eliana Aparecida de
 Rezende. II. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Título em Inglês: Poly(L-co-D,L lactic acid-co-trimethylene carbonate) scaffolds for
 growth of osteoblastic cells (SaOS-2)

Palavras-chave em Inglês: Biomaterials, Polymers, Tissue Engineering, Osteoblasts

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Cecília Amelia de Carvalho Zavaglia, Maria Lourdes Peris Barbo

Data da defesa: 30/06/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

Arcabouços de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) para o crescimento de células osteoblásticas (SaOS-2)

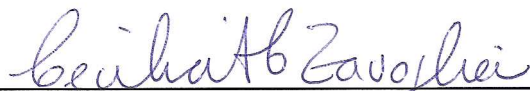
Autor: André Dutra Messias

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Aparecida de Rezende Duek

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Prof^a Dr^a Eliana Aparecida de Rezende Duek, Orientador
Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, SP



Prof^a Dr^a Cecilia Amelia de Carvalho Zavaglia
Faculdade de Engenharia Mecânica, UNICAMP, SP



Prof^a Dr^a Maria Lourdes Peris Barbo
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde, PUC-SP, SP

Campinas, 30 de junho de 2011.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Regina e Ademir; e aos meus irmãos, Patrícia e Hamilton.

Agradecimentos

Agradeço à professora Eliana Aparecida de Rezende Duek cuja orientação não começou neste trabalho, mas desde minha iniciação científica. Obrigado também pelos conselhos que se estendem além da esfera profissional, pela confiança na minha capacidade e principalmente pela generosidade imensurável;

À Dr^a Adriana Cristina Motta e à Kelly Fernanda Martins pela contribuição essencial a este trabalho e por tranquilizarem-me nas horas de preocupação;

Às minhas companheiras de pós-graduação Andrea Rodrigues Esposito, Bruna Antunes Mas e Cíntia Cristina Santos;

Aos meus companheiros de disciplinas e de estudos Vitor de Miranda Fedrizzi e Giselle Cherutti, obrigado pelos momentos de descontração. Nunca me esquecerei do ensinamento que aprendemos juntos: *“e as montanhas escoaram diante do Senhor”*;

Pela ajuda, parceria e amizade em trabalhos anteriores, importantes para que eu chegasse nesta etapa, agradeço à Larissa Pereira Coppini, Débora Cristina Coraça, Marcelo Roberto Pinto, Kátia Fernanda Silva, Ricardo Zamprogno Lorenzon, Lucas Alves Moura, Francisco de Assis Alves, Denis Antonio Batiston, William Martins Arantes (espero não ter deixado ninguém de fora!). Em especial, registro meu muito obrigado à Dr^a Carolina Lucchesi. Não pude agradecê-los formalmente antes devido a falta de espaço, que tenho agora nestas páginas;

Ao João Duek por me hospedar nos momentos que foram necessários;

A todos que estiveram e estão junto a mim na minha trajetória dentro do Laboratório de Biomateriais, PUC-SP;

À Claudenete Vieira Leal pela contribuição nas análises termogravimétricas e de microscopia eletrônica de varredura;

À Angela Maria Carrocci, Edson Soares da Silva e em especial à Amantina Aparecida Costa do Laboratório de Microbiologia da PUC-SP, pela contribuição com os testes de esterilidade da cultura de células;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biofabricação – INCT-BIOFABRIS.

“É melhor que fale por nós a nossa vida, que as nossas palavras.”

Mahatma Gandhi

Resumo

Polímeros a base de ácido láctico são largamente investigados como materiais para a engenharia tecidual. A capacidade de sofrer degradação hidrolítica, de ser reabsorvido pelo organismo e sua biocompatibilidade inerente, tornam-nos uma excelente escolha para tal aplicação. Entretanto, características como baixa flexibilidade e pequena capacidade de alongamento antes da fratura, tendem a limitar esses dispositivos em determinadas aplicações, o que pode ser melhorado com a adição de compostos que agem como plastificantes, como é o caso do trimetileno carbonato (TMC), quando presente na cadeia polimérica do copolímero de ácido láctico (PLDLA). O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar o terpolímero de L-ácido láctico, D,L-ácido láctico e TMC, e obtenção de arcabouços para avaliação da viabilidade celular e atividade de células osteoblásticas (SaOS-2), em 1, 3, 7, 14 e 21 dias de cultivo, visando aplicação na engenharia tecidual óssea. Dessa forma, sintetizou-se o terpolímero a partir de 20 e 30% de TMC, através da polimerização em massa dos monômeros, como confirmado por RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando como catalisador o $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. A análise de GPC mostrou que os terpolímeros sintetizados apresentaram massa molar média (M_w) na ordem de 10^5 g/mol, característica importante que permite a obtenção de propriedades mecânicas mínimas para uma aplicação estrutural. A investigação térmica do PLDLA-TMC demonstrou uma discreta diminuição da T_g em relação ao PLDLA. Além disso, a degradação do terpolímero em etapa única iniciou-se em torno dos 290 °C, como visto pelo TGA. O ensaio de MTT mostrou que o arcabouço de PLDLA-TMC permitiu um aumento na viabilidade celular, atingindo valores máximos em 7 dias, e mantendo-se estável até 14 dias de cultivo. Similarmente, a atividade de fosfatase alcalina foi crescente até 7 dias de cultivo, importante indicador da atividade osteoblástica. Esses resultados mostram que é possível produzir com sucesso o terpolímero PLDLA-TMC. Além disso, os arcabouços produzidos apresentaram características importantes considerando a aplicação para engenharia tecidual óssea.

Palavras-chave: Poli (ácido láctico), trimetileno carbonato, engenharia tecidual, arcabouços biorreabsorvíveis, células osteoblásticas.

Abstract

Lactic acid based polymers are widely investigated as materials for tissue engineering. The ability to allow hydrolytic degradation, to be reabsorbed by the body and its inherent biocompatibility, make them an excellent choice for this application. However, characteristics such as low flexibility and low elongation ability before the fracture tend to limit these devices in particular applications, which can be enhanced with the addition of compounds that act as plasticizers, as the trimethylene carbonate (TMC) when present in the polymer chain of the copolymer of lactic acid (PLDLA). The objective of this work was to synthesize and characterize the terpolymer of L-lactic acid, D,L-lactic acid and TMC, obtain evaluation of scaffolds for cell viability and alkaline phosphatase activity of osteoblastic cells (SaOS-2) in 1, 3, 7, 14 and 21 days of culture, aiming its application in bone tissue engineering. Thus, the terpolymer is synthesized from 20 and 30% of TMC, by bulk polymerization of monomers, confirmed by ^1H and ^{13}C RMN. The GPC analysis showed that the copolymers synthesized showed average molar mass (M_w) in the order of 10^5 g/mol, an important feature that allows the attainment of minimum mechanical properties necessary for structural applications. The thermal investigation of thermal PLDLA-TMC showed a slight decrease of T_g comparing to PLDLA. Furthermore, the one step terpolymer degradation was initiated around 290 °C, as shown by TGA. The MTT assay showed that the PLDLA-TMC scaffolds enabled an increase in cell viability, reaching a peak in 7 days, and remained stable until 14 days of cultivation. Similarly, the alkaline phosphatase activity was increased up to 7 days of culture, an important indicator of osteoblastic activity. These results show that it was possible to successfully produce a terpolymer from L-lactic acid, D,L-lactic acid and trimethylene carbonate. In addition, the scaffolds exhibited important characteristics considering the application for bone tissue engineering.

Key-words: Poly (lactic acid), trimethylene carbonate, tissue engineering, scaffolds, osteoblastic cells.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Mecanismo através do qual os poli (α -hidroxi ácidos) são metabolizados pelo organismo (BARBANTI <i>et al.</i> , 2005).....	7
Figura 2. Dímeros cíclicos do ácido láctico: L e D-lactídeo. Adaptado de Chaver, Cameron, (2010).	8
Figura 3. Síntese de PLDLA a partir de L-ácido láctico e D,L ácido láctico. Adaptado de Chaver, Cameron, (2010).	10
Figura 4. Estrutura química do poli (trimetileno carbonato).	11
Figura 5. Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho.	18
Figura 6. Imagens das células SaOS-2 em frascos T25. A) Aumento de 100X e B) Aumento de 200X....	23
Figura 7. Representação da reação de polimerização do terpolímero poli (L-co-DL ácido láctico-co TMC), PLDLA-TMC.	26
Figura 8. Comparação entre o espectro de RMN de ^1H referente ao copolímero PLDLA (A) e do terpolímero PLDLA-TMC (B), observe os prótons Hc e Hd característicos do TMC.	29
Figura 9. Representação do mero do polímero PLDLA-TMC. As letras a, b, c e d correspondem aos prótons evidenciados no espectro de RMN.	29
Figura 10. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de PLDLA-TMC contendo 20% (A) e 30% (B) de TMC.	30
Figura 11. Regiões ampliadas do espectro de RMN de ^1H referente ao terpolímero PLDLA-TMC, 30% de TMC.....	30
Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C para o terpolímero PLDLA-TMC.	32
Figura 13. Espectro na região do infravermelho do terpolímero PLDLA-TMC.	33
Figura 14. Termograma mostrando a transição vítrea de PLDLA-TMC nas duas composições.....	36
Figura 15. Análise termogravimétrica do terpolímero PLDLA-TMC.	36
Figura 16. Eletromicrografias de varredura dos arcabouços de PLDLA-TMC. A e B, superfície do suporte. C e D, região interior do arcabouço após criofratura. A e C, aumento de 100x; B, 50x; e E, 1000x.	38

Figura 17. Viabilidade de células osteoblásticas ao longo do tempo sobre arcabouços de PLDLA-TMC (terpolímero), PLDLA (copolímero) e controle de poliestireno. Os dados ($n = 6$) são apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão.....	39
Figura 18. Fosfatase alcalina produzida pelas células osteoblásticas sobre os arcabouços de PLDLA-TMC (terpolímero), PLDLA (copolímero) e controle (poliestireno). Os valores representam média $\pm$ desvio padrão, $n = 6$	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Sinais de δ , ppm, no RMN de ^{13}C	31
Tabela 2. Valores de M_w , M_n e IP obtidos através do GPC.....	33
Tabela 3. Temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros de PLDLA-TMC determinadas por DSC.	34
Tabela 4. Propriedades térmicas dos terpolímeros: temperatura de início de perda de massa (T_i) e temperatura onde a perda de massa é máxima ($T_{\max}$).....	37

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abreviaturas

ANOVA – análise de variância

cm⁻¹ – número de onda

DLA – D,L lactídeo ou D,L ácido láctico

DMSO – dimetilsulfóxido

DSC – calorimetria exploratória diferencial

FDA – *Food and Drug Administration*

FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GA – ácido glicólico

GPC – cromatografia de permeação em gel

LA – ácido láctico

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MG63 – linhagem celular oriunda de osteossarcoma humano

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio

PBS – solução salina tamponada com sais de fosfato

PCL – poli (ε-caprolactona)

PDLLA – poli (D,L ácido láctico)

PGA – poli (ácido glicólico)

PHB – poli (hidroxibutirato)

PHV – poli (hidroxivalerato)

PLA – poli (ácido láctico)

PLDLA – poli (L-co-D,L ácido láctico)

PLDLA-TMC – poli (L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato)

PLGA – poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

PLLA – poli (L-ácido láctico)

PMMA – poli (metacrilato de metila)

PTMC – poli (trimetileno carbonato)

PVC – poli (cloreto de vinila)

RMN – ressonância magnética nuclear

RMN de ^{13}C – RMN de carbono 13

RMN de ^1H – RMN de prótons

SaOS-2 – linhagem celular oriunda de osteossarcoma humano

TGA – análise termogravimétrica

THF – tetraidrofurano

TMC – trimetileno carbonato

TMS – tetrametilsilano

Símbolos

IP – índice de polidispersão

M_n – massa molar média numérica

M_w – massa molar média em massa

T_g – temperatura de transição vítrea

T_i – temperatura de início de perda de massa

T_m – temperatura de fusão

$T_{\max}$ – temperatura onde a perda de massa é máxima

δ – deslocamento químico

Unidade

grandeza adimensional

g/mol

g/mol

°C

°C

°C

°C

ppm

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1	Biomateriais	3
2.2	Polímeros Biorreabsorvíveis	6
2.3	Engenharia Tecidual	12
2.4	Engenharia Tecidual Óssea	13
3	OBJETIVOS	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	Síntese e Caracterização Físico-química	19
4.1.1	Síntese de Poli(L-co-D,L Ácido Láctico-co-Trimetileno Carbonato)	19
4.1.2	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e Carbono 13 (RMN de ^1H e ^{13}C)	19
4.1.3	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	20
4.1.4	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	20
4.1.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	20
4.1.6	Análise Termogravimétrica (TGA)	21
4.1.7	Obtenção dos Arcabouços de PLDLA-TMC	21
4.1.8	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	21
4.2	Ensaios <i>in vitro</i> com Células Osteoblásticas	22
4.2.1	Linhagem Celular	22
4.2.2	Cultivo Celular sobre os Arcabouços	23
4.2.3	Viabilidade Celular	23
4.2.4	Fosfatase Alcalina	24

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	Caracterização de PLDLA-TMC	26
5.1.1	Síntese de PLDLA-TMC	26
5.1.2	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e Carbono 13 (RMN de ^1H e ^{13}C)	28
5.1.3	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	31
5.1.4	Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)	32
5.1.5	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	34
5.1.6	Análise Termogravimétrica (TGA)	35
5.1.7	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
5.2	Ensaio <i>in vitro</i> com Células Osteoblásticas	39
5.2.1	Viabilidade Celular	39
5.2.2	Fosfatase Alcalina	41
6	CONCLUSÃO	44
7	SUGESTÃO PARA PRÓXIMOS TRABALHOS	44
	Referências	45

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida bem como o grande número de doenças que atingem a população mundial demandam cada vez mais avanços no desenvolvimento de novos materiais e novas estratégias de intervenção cirúrgica, que aprimorem as antigas técnicas ou criem soluções para problemas ainda não solucionados. Lesões no tecido ósseo e no sistema osteoarticular podem ser provocados por uma variada gama de doenças, incluindo aquelas relacionadas ao envelhecimento ou traumas em consequência de acidentes.

Em geral, o tecido ósseo apresenta uma grande capacidade de regeneração. No entanto, fraturas muito extensas ou em vários pontos de um osso, normalmente representam situações que requerem intervenção cirúrgica com o emprego de um dispositivo temporário que substitua a função estrutural do tecido ósseo, até que este se regenere. Em casos de lesões extensas, a utilização de um substituto permanente é imprescindível, já que o osso pode ser incapaz de se regenerar. As próteses e dispositivos de fixação metálicos são os mais empregados nesses casos, apresentando como principal vantagem excelentes propriedades mecânicas. Embora ainda não se conheçam alternativas melhores para dispositivos que sustentem ou substituam a função estrutural de ossos longos, atualmente já existem materiais poliméricos que podem oferecer benefícios importantes ausentes nos metais. A corrosão e necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para remoção ou substituição da prótese são os problemas mais graves dos biomateriais metálicos. Os polímeros aparecem como alternativa para fraturas pequenas, enquanto que os metais continuam sendo a única possibilidade em grandes fraturas.

A versatilidade de propriedades oferecidas pelos polímeros é imensa. Além da grande variedade química, podem ser obtidos através da copolimerização dos monômeros, misturados fisicamente para produção de blendas e modificados através da aditivação, resultando em características ajustáveis conforme a necessidade. Fatores como tempo de degradação, hidrofiliabilidade, valores de módulo, resistência à fratura, entre outros, podem ser alterados pela combinação de diferentes composições químicas. Somado a isso, através dos diversos processos de manufatura e fabricação obtém-se dispositivos com os mais diversos formatos e tamanhos,

sendo que as técnicas mais avançadas permitem o controle dessas variáveis em escala de nanômetros.

Os poli (α -hidroxi ácidos) compõem uma classe de polímeros com biocompatibilidade reconhecida e amplamente aceitável. Além da capacidade de sofrer degradação hidrolítica, gerando subprodutos atóxicos e metabolizados pelo organismo, os tornam excelente alternativa como dispositivos temporários em aplicações médicas, sendo dispensável a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica. Por serem degradáveis e por terem seus subprodutos metabolizados, esses polímeros são conhecidos como biorreabsorvíveis.

Esses polímeros são utilizados como suturas, material para fixação óssea, revestimento de feridas e material de implantação oftálmica, além de diversos usos emergentes como arcabouços para engenharia tecidual e microesferas para liberação controlada de fármacos. Quanto ao tecido ósseo, junto com as vantagens já citadas, os polímeros biorreabsorvíveis apresentam a interessante possibilidade de perder gradativamente as propriedades mecânicas (devido à degradação) ao passo que se regenera o tecido ósseo. Dessa forma, a transferência de carga que ocorre do dispositivo para o tecido neoformado é extremamente benéfica para a qualidade do osso regenerado, já que o estímulo mecânico é um fator que interfere de maneira diretamente proporcional na resistência do osso.

A engenharia tecidual busca a união dos conhecimentos advindos das áreas de engenharia e ciências biológicas para o desenvolvimento de estratégias que permitam substituir, total ou parcialmente, a função de um órgão ou tecido lesado. Nessa linha, um arcabouço de biomaterial deve servir como substrato para a adesão, proliferação e diferenciação de células *in vitro* e, após implantado no organismo, esse dispositivo deve dirigir e favorecer a regeneração de um órgão ou tecido, ao mesmo tempo em que o biomaterial é absorvido sem causar respostas adversas, até que se estabeleçam novamente as funções saudáveis.

Os polímeros a base de ácido láctico são os mais amplamente estudados para aplicações biomédicas, entre os polímeros biorreabsorvíveis. Possui duas formas estereoisoméricas, L-ácido láctico e D-ácido láctico. O poli (L-ácido láctico) é conhecido por ser mais resistente e possuir maiores valores de módulo. Entretanto, a alta cristalinidade e o longo tempo de degradação podem provocar respostas indesejáveis no organismo. Uma estratégia para a diminuição dessa cristalinidade e do tempo de degradação do material é a copolimerização do L-ácido láctico, com outras formas estereoisoméricas, o que foi realizado pelo grupo do Laboratório de Biomateriais

por meio da síntese do copolímero poli (L-co-D,L ácido láctico), permitindo a obtenção de um material com boas características, compatíveis com os dispositivos importados existentes no mercado.

Apesar disso, o copolímero, poli (L-co-D,L ácido láctico), apresenta alto módulo de elasticidade e baixo alongamento na ruptura, apresentando, dessa forma, características de um material frágil. Seu leque de aplicações é limitado à fixação de pequenas fraturas, não abrangendo de forma satisfatória outros campos que poderiam ser explorados como o da engenharia tecidual na obtenção de suporte para cultura de células, visando o crescimento ósseo, ou mesmo microesferas para a liberação controlada de fármacos.

No presente estudo buscou-se ampliar o espectro de aplicação do copolímero poli (L-co-D,L ácido láctico) pela inserção de trimetileno carbonato (TMC) na macromolécula do copolímero, formando o terpolímero poli (L-co-D,L ácido láctico-co-TMC). A presença do TMC pode conferir maior maleabilidade ao material, permitindo um maior número de aplicações na área ortopédica. Nesse caso, o leque de aplicações poderia abranger além de placas e pinos biorreabsorvíveis (fraturas ósseas) também o campo da engenharia tecidual, cujo desenvolvimento está associado ao surgimento de novos biomateriais. Neste sentido, avaliar a interação entre arcabouços do terpolímero e células osteoblásticas representa uma contribuição importante na pesquisa de novos biomateriais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomateriais

A definição para o termo ‘biomaterial’ foi formalmente estabelecida em 1986 na Conferência para Consenso sobre Biomateriais (1st Biomaterials Consensus Conference, Chester, UK) como: *um material não viável (não vivo) usado em um dispositivo médico, visando interação com sistemas biológicos* (WILLIAMS, 1987). No entanto, essa definição não incluía materiais de origem natural como colágeno, quitosana, celulose, etc. Além disso, nas duas

últimas décadas, desenvolveu-se a engenharia tecidual, a qual preconiza a utilização de células sobre um arcabouço a ser implantado. Dessa maneira, a definição sofreu adequações visando acompanhar os avanços científicos e tecnológicos que resultaram das novas estratégias de intervenções biomédicas, sendo considerada como biomaterial: *um material destinado a fazer interface com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo*. De acordo com a definição, o escopo do termo está exclusivamente dentro do domínio dos cuidados médicos, por isso, a expressão ‘material biomédico’ representa um sinônimo adequado (WILLIAMS, 2009).

A Ciência dos Biomateriais é o estudo físico e biológico dos biomateriais e a interação com o ambiente biológico propriamente dito. Tradicionalmente, as principais preocupações estão envolvidas com a síntese, otimização, caracterização, avaliação e a biologia da interação entre receptor e material (RATNER *et al.*, 2004). No início desta recente ciência, os biomateriais eram elaborados com a intenção de não provocarem nenhuma reação do organismo, isto é, que eles fossem inertes. O principal interesse era nos materiais que provocassem o mínimo de respostas inflamatórias ou imunológicas. Atualmente, apesar da importância das respostas inflamatória e imunológica, deseja-se que o biomaterial estimule algum fenômeno favorável, ou seja, buscam-se estratégias que resultem na proliferação e diferenciação de células específicas do tecido lesado (SANTOS Jr., WADA, 2007).

O pré-requisito essencial para qualificar um biomaterial é a ‘biocompatibilidade’, isto é, *a habilidade de um biomaterial desempenhar uma resposta apropriada no receptor, considerando uma aplicação específica* (WILLIAMS, 1987). A resposta do tecido receptor a um implante depende de inúmeros fatores, variando desde propriedades químicas, físicas e biológicas do material até o formato e estrutura do implante (NAIR, LAURENCIN, 2007).

A mensuração da biocompatibilidade, ou do grau de compatibilidade entre um biomaterial e o ambiente biológico ao qual é destinado, constitui um dos grandes desafios da ciência dos biomateriais. Para tanto, princípios e normas para avaliação biológica de materiais e dispositivos são necessários antes de sua aplicação clínica e comercialização. A Organização Internacional para Padronização de Experimentos (ISO 10993, 1992) inclui testes desde a seleção dos materiais (propriedades mecânicas, químicas, etc.), suas considerações em relação às avaliações biológicas (aditivos, contaminantes, entre outros) e análises baseadas nas aplicações de uso final que incluem testes *in vitro* e *in vivo* (ESPOSITO, 2010).

Apesar dos avanços significativos que foram obtidos nas áreas de biologia celular e molecular juntamente com ciência dos materiais, bioengenharia e química dos polímeros, a maioria dos dispositivos médicos continua sendo fabricado de poli (etileno tereftalato), polietileno de alta densidade, poli (metil metacrilato), aço inoxidável, poliuretano, titânio e elastômeros de silicone (REICHERT *et al.*, 2011).

A utilização de polímeros naturais, como algodão, a seda e a celulose em aplicações biomédicas data do início da civilização humana. Já polímeros sintéticos começaram a ser usados como biomateriais somente a partir da década de 1940, quando se encontram informações sobre a utilização de suturas a base de poliamidas sintéticas (Nylon[®]). Um pouco mais tarde, em 1945, foram documentadas as primeiras aplicações de poli (metacrilato de metila) (PMMA), poli (etileno tereftalato) (Dacron[®]) e poli (cloreto de vinila) (PVC). Já em 1950, polímeros como polietileno, poliuretano, poli (tetraflúor etileno) (Teflon[®]) começaram também a ser aplicados em medicina. Atualmente, mais de 20 tipos diferentes de polímeros sintéticos são usados neste tipo de aplicação (ORÉFICE, 2006).

Uma grande variedade de polímeros é atualmente usada como biomaterial em aplicações biomédicas, devido a características físico-químicas bem como a versatilidade estrutural, que permite adequá-los em termos de propriedades a cada aplicação específica. A possibilidade de alterar grupamentos químicos pertencentes à arquitetura macromolecular das cadeias pode viabilizar, por exemplo, o estabelecimento de alguma interação específica entre o biomaterial e o tecido receptor (ORÉFICE, 2006).

Entre as propriedades inerentes dos biomateriais poliméricos que podem interferir na biocompatibilidade incluem: a química do material, massa molar, solubilidade, forma e estrutura do implante, hidrofiliicidade/hidrofobicidade, energia de superfície, absorção de água, mecanismos de degradação e erosão (NAIR, LAURENCIN, 2007). Tanto os polímeros sintéticos quanto os naturais têm sido extensivamente estudados como biomateriais biodegradáveis. A biodegradação dos biomateriais poliméricos envolve clivagem de ligações sensíveis à hidrólise ou a ação enzimática, resultando na erosão do dispositivo (KATTI *et al.*, 2002).

2.2 Polímeros Biorreabsorvíveis

Em um meio fisiológico, os polímeros biodegradáveis sofrem degradação por lise das macromoléculas, resultando em fragmentos cada vez mais reduzidos, e por fim, em subprodutos estáveis simples (ZHAO *et al.*, 2010). Essa degradação pode ocorrer através de diferentes mecanismos, tais como catálise de micro-organismos aeróbicos e anaeróbicos no meio ambiente, ou por processos biologicamente ativos, por exemplo, reações enzimáticas. O mecanismo mais comum, no entanto, é a clivagem hidrolítica (SATYANARAYANA, CHATTERJI, 1993). Os polímeros hidroliticamente degradáveis possuem grupos susceptíveis a clivagem pela água que incluem ésteres, ortoésteres, anidridos, carbonatos, amidas, uretanos, ureias, etc. (LI, 1999).

Quando os subprodutos da degradação são metabolizados por rotas naturais do organismo, os polímeros são chamados biorreabsorvíveis (Figura 1), entre eles estão o poli (ácido láctico), PLA, o poli (ácido glicólico), PGA, a poli (ϵ -caprolactona), PCL, o poli (hidroxivalerato), PHV e o poli (hidroxibutirato), PHB (BARBANTI *et al.*, 2005).

Na primeira metade do século 20, acreditava-se que os polímeros sintetizados a partir dos α -hidroxi ácidos não teriam importância como produto tecnológico pois o desenvolvimento desses materiais não traria resultados rentáveis, devido à instabilidade para aplicações industriais de longo prazo. Entretanto, a instabilidade provocada pela degradação hidrolítica mostrou-se extremamente importante em aplicações médicas, fato reconhecido a partir do final da década de 60. Entre as inúmeras vantagens, a principal, se deve ao fato de não ser necessária uma segunda intervenção cirúrgica frente a um implante (MIDDLETON, TIPTON, 2000).

Os poli (α -hidroxi ácidos) são poliésteres termoplásticos detentores de grande versatilidade química, que podem ser facilmente processados em formatos desejados através de moldagem, extrusão ou processamento por solventes. Os polímeros produzidos a partir dos monômeros de ácido glicólico e ácido láctico são amplamente estudados desde o final dos anos 60 graças ao sucesso no desenvolvimento do primeiro material sintético baseado em glicolato aprovado pelo órgão de regulamentação estadunidense FDA (*Food and Drug Administration*) (TSURUGA *et al.*, 1997; SOKOLSKY-PAPKOV *et al.*, 2007). A estrutura química desses polímeros permite a degradação hidrolítica através da esterificação, formando grupos terminais carboxila e hidroxila (DUARTE, 2009).

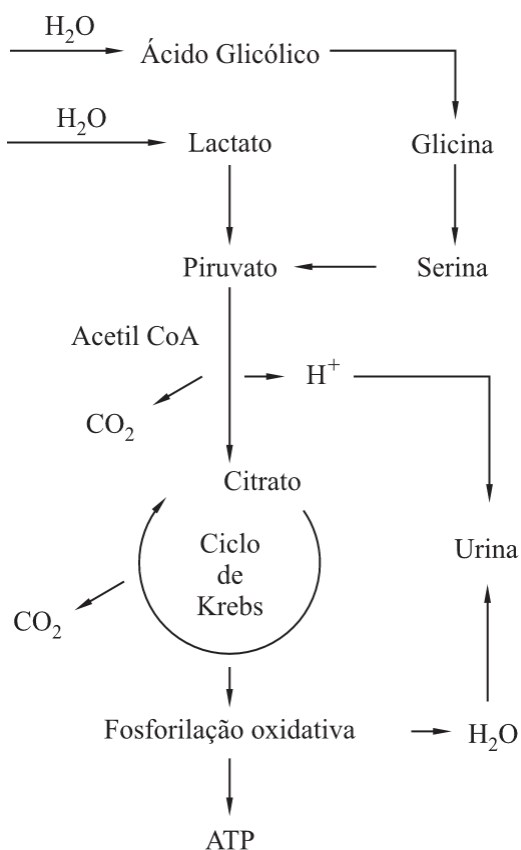


Figura 1. Mecanismo através do qual os poli (α -hidroxi ácidos) são metabolizados pelo organismo (BARBANTI *et al.*, 2005).

O poli (ácido láctico), PLA, é um polímero termoplástico rígido, faz parte do grupo dos poliésteres alifáticos lineares, e suas fontes são a uma alternativa aos petroquímicos (KRICHELDORF, 2001; AURAS *et al.*, 2004), uma vez que o ácido láctico pode ser produzido através de fermentação dos açúcares provenientes do milho e da beterraba, por exemplo, é considerado o plástico mais importante derivado de fontes renováveis (TORRES *et al.*, 1996). O PLA pode ser sintetizado através de dois processos, a policondensação direta do ácido láctico ou por meio de poliadição por abertura do anel de dímero cíclico. O PLA possui duas formas enantioméricas de ácido láctico (destrógero, D-ácido láctico e levógero, L-ácido láctico) (Figura 2). Enquanto o poli (L-ácido láctico) é um polímero semicristalino, o poli (D,L-ácido láctico), o qual apresenta o ácido láctico tanto em sua forma D quanto L, é um polímero amorfo (DRUMRIGHT *et al.*, 2000; VERT *et al.*, 1995). Devido a características de biorreabsorção, os polímeros de ácido láctico formam uma importante classe de polímeros sintéticos. Ao mesmo

tempo, a sua biocompatibilidade torna o PLA interessante para aplicações na área biomédica, como suturas cirúrgicas, cápsulas de injeção, material para fixação óssea, revestimento de feridas, material de implantação oftálmica, arcabouços para engenharia tecidual e microesferas para liberação controlada de fármacos (KRICHELDORF, 2001; ZHAO *et al.*, 2005; GOTTSCHALK *et al.*, 2007). Possui propriedades mecânicas que se assemelham aquelas do poliestireno e do poli(etileno tereftalato), e também por essa razão tem sido amplamente estudado nestes últimos 20 anos (DRUMRIGHT *et al.*, 2000).

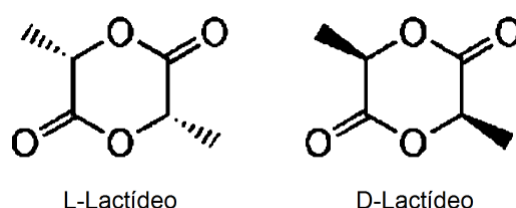


Figura 2. Dímeros cíclicos do ácido láctico: L e D-lactídeo. Adaptado de Chaver, Cameron, (2010).

O PLA não é um polímero recém-descoberto. Carothers (1932) investigou a produção de PLA a partir do dímero cíclico do ácido láctico (lactídeo). Mesmo antes disso, dímeros e oligômeros de baixa massa molar foram detectados em soluções de ácido láctico após a remoção de água (PELOUZE, 1845 *apud* DRUMRIGHT *et al.*, 2000). Entretanto somente em 1997, com a formação da empresa Cargill Dow LLC, houve uma iniciativa com o objetivo de produção e comercialização de PLA em larga escala (DRUMRIGHT *et al.*, 2000). Atualmente, o PLA é o polímero biorreabsorvível e biocompatível mais estudado entre os poliésteres alifáticos explorados nas aplicações biomédicas, farmacêuticas e ambientais (DIJKSTRA *et al.*, 2011).

A degradação do PLA é influenciada por um amplo conjunto de fatores: massa molar, cristalinidade, pureza, temperatura, pH, presença de grupos terminais carboxila ou hidroxila, permeabilidade à água, além de agentes catalisadores como enzimas (PARK, XANTHOS, 2009).

Entre as desvantagens do poli (L-ácido láctico) estão a fragilidade inerente e baixa tenacidade (JIA *et al.*, 2009), apesar dos valores altos de módulo elástico e dureza (LI, SHIMIZU, 2007). Embora, essas propriedades possam ser interessantes para aplicações em determinadas situações, como, por exemplo, alguns tipos de dispositivos de fixação ortopédica (LEINONEN *et al.*, 2002). Sua alta cristalinidade, no entanto, pode ser prejudicial. Geralmente a

região amorfa do polímero tende a sofrer hidrólise mais facilmente, aumentando assim a proporção de cadeias cristalinas (MOTTA, DUEK, 2007). Essas porções cristalinas podem permanecer por longos períodos no corpo, 3-4 anos (WALTON, COTTON, 2007), tempo muito superior ao necessário para a regeneração de qualquer tecido.

A copolimerização é uma das estratégias mais simples e largamente usadas para modificar as propriedades de um polímero, através da qual se podem controlar, por exemplo, a cristalinidade e propriedades mecânicas, alterando-se a composição e configuração do monômero, bem como a sequência estrutural (copolímeros randômicos ou em blocos) (BAGHERI *et al.*, 2007). De fato, a flexibilidade, tenacidade e estabilidade térmica do PLLA podem ser melhoradas através de algumas estratégias, como copolimerização (OUCHI, OHYA, 2004; NOUVEL *et al.*, 2004; MOTTA, DUEK, 2007), obtenção de blendas (GU *et al.*, 2008), e adição de plastificantes (BAIARDO *et al.*, 2003; LJUNGBERG, WESSLEN, 2002; DUARTE, 2009).

O poli (L-ácido láctico) detém menor grau de cristalinidade e degradação mais lenta em relação ao poli (ácido glicólico), por exemplo. Visando ajustar o tempo de degradação do PLLA para outras aplicações, foram desenvolvidas estratégias de copolimerização de L-ácido láctico com D,L-ácido láctico ou L-ácido láctico com ácido glicólico (MOTTA, DUEK, 2007).

Os monômeros de ácido láctico e ácido glicólico podem ser copolimerizados para formar o poli (ácido láctico-co-ácido glicólico), sendo o exemplo mais clássico de copolimerização que visa o ajuste de características físico-químicas para aplicações, nas quais esses homopolímeros são pouco adequados. O PLGA constitui um polímero amorfo, no qual a razão entre os monômeros é fator principal que determina sua taxa de degradação. Uma proporção 50/50 de LA/GA acarreta em um copolímero que degrada em 1-2 meses, 75/25 em 4-5 meses e 85/15 em 5-6 meses (MIDDLETON, TIPTON, 2000). Devido à fácil produção, taxas de degradação controláveis e sucesso, já há algum tempo, na aplicação como material de suturas é que o PLGA vem sendo considerado para uso na engenharia tecidual e liberação controlada de fármacos (NAIR, LAURENCIN, 2007).

Já o polímero sintetizado a partir de D,L-ácido láctico, PDLLA, possui maiores taxas de degradação mas menor resistência à tração quando comparada ao PLLA. Tais características do PDLLA tornam-no um biomaterial atrativo para a liberação controlada de fármacos ou para

arcabouços para a engenharia tecidual que requeiram menores resistências (NAIR, LAURENCIN, 2007).

A combinação dos monômeros L-ácido láctico e D,L-ácido láctico permite a síntese do copolímero poli (L-co-D,L ácido láctico) (Figura 3), que não apresenta tempo excessivo de degradação por ser amorfo, mantendo propriedades mecânicas intermediárias entre o PLLA e o PDLA. Apesar disso, o copolímero, poli (L-co-D,L ácido láctico), apresenta alto módulo e baixo alongamento, apresentando, dessa forma, características de fratura frágil (MOTTA, DUEK, 2007).

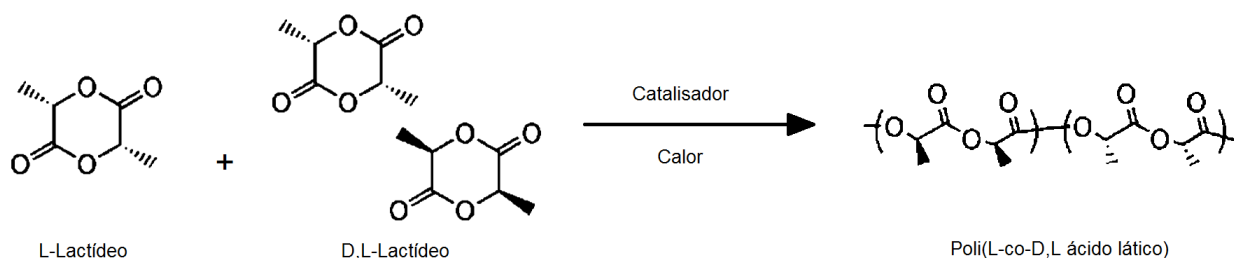


Figura 3. Síntese de PLDLA a partir de L-ácido láctico e D,L ácido láctico. Adaptado de Chaver, Cameron, (2010).

Para aplicações onde é preciso uma maior capacidade de alongamento sem que haja fratura do material pode-se empregar substâncias que originam polímeros elastoméricos, como por exemplo, o trimetileno carbonato.

Nos últimos anos, os policarbonatos alifáticos ganharam maior atenção no seu uso potencial nas aplicações médicas e ambientais (AL-AZEMI *et al.*, 2000). Diversos policarbonatos alifáticos, bem como seus copolímeros, têm sido estudados (WANG *et al.*, 1998; KRICHELDORF, WEENEN-SCHULZ, 1995; MASTSUO *et al.*, 1998; HORI, YAMAGUCHI, 1995). Entre esses, o poli (trimetileno carbonato), PTMC, tem atraído muita atenção para aplicações biomédicas devido a sua biodegradabilidade. Entretanto, embora o uso de PTMC como material para a obtenção de implantes biomédicos já seja conhecido (ENGELBERG, KOJN, 1991), a aplicação prática desse polímero elastomérico nunca foi bem aceita, devido às propriedades mecânicas serem deficientes, verificados por valores muito baixos de módulo de elasticidade e resistência à tração (PÊGO, 2002).

O PTMC é um polímero elastomérico amorfo ou de baixa cristalinidade com temperatura de transição vítrea em torno de -20 °C (LOFGREN *et al.*, 1995), possuindo taxa lenta de degradação *in vitro*, mas rápida *in vivo* devido à presença de enzimas (Figura 4). Pinos de PTMC apresentaram perda de massa molar *in vitro* de no máximo 2% após 8 semanas, em soluções nas quais o pH variavam de 1,0 a 13,0. Os mesmos pinos implantados nas tíbias de coelhos perderam até 60% de massa após o mesmo período de 8 semanas (ZHANG *et al.*, 2006). Além disso, filmes de PTMC implantados em tecido subcutâneo em ratos mostraram perda de massa de 21% e decréscimo na massa molar de 50% durante 30 semanas (ZHU *et al.*, 1991).

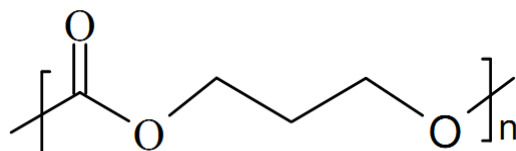


Figura 4. Estrutura química do poli (trimetileno carbonato).

Diversas publicações descrevem a copolimerização de TMC e lactatos para produzir copolímeros com diferentes arquiteturas (KIM, LI, 2002; ZHANG *et al.*, 2004a; ZHANG *et al.*, 2004b; KRICHELDORF *et al.*, 2004; KRICHELDORF, 2004; POSPIECH *et al.*, 2005; JIA *et al.*, 2004; JOZIASSE *et al.*, 2000; MATSUMURA *et al.*, 1999). Parte desses trabalhos considera a síntese de elastômeros termoplásticos de trimetileno carbonato e L-ácido láctico usando octanoato de estanho como catalisador (KIM, LI, 2002; ZHANG *et al.*, 2004a; ZHANG *et al.*, 2004b). Nesses copolímeros, o PTMC formou blocos intermediários amorfos, enquanto que o PLLA formou blocos terminais semicristalinos. No presente trabalho, mostrou-se a síntese de um terpolímero aleatório, com unidades de LA, DLA e TMC, algo ainda não realizado.

Copolímeros de ácido glicólico (GA) com trimetileno carbonato (TMC) são usados como material de sutura (MAXON[®]) (LEWIS, FABISIAL, 1997), grampos e parafusos (Smith and Nephew Endoscopy) (BARBER, 1998). Normalmente são polimerizados em blocos A-B-A na proporção 2:1 de GA:TMC com blocos centrais GA-TMC (B) e blocos de GA puros (A). Esses materiais têm maior flexibilidade que o PGA e apresentando taxa de absorção de aproximadamente sete meses (SHALABY, JOHNSON, 1994). Além disso, terpolímeros de ácido

glicólico, TMC e *p*-dioxianona são usados como fios de sutura (BIOSYN®) com rigidez e absorção (3-4 meses) reduzida em relação à sutura de PGA (BARBER, 1998).

2.3 Engenharia Tecidual

Devido ao aumento da expectativa de vida da população, técnicas para substituir, restaurar ou regenerar tecido ósseo tem se tornado um dos maiores desafios clínicos no campo das cirurgias ortopédica, espinal, dental, cranial e maxilofacial (BRYDONE *et al.*, 2010).

Langer e Vacanti (1993) definem o termo engenharia tecidual como *um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e ciências biológicas para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido*.

A engenharia tecidual utiliza arcabouços biorreabsorvíveis capazes de fornecer suporte a células para regenerar matriz extracelular em tecidos danificados por doença, trauma, ou problemas congênitos sem provocar respostas imunes indesejadas (AGARWAL *et al.*, 2008). E, embora esses arcabouços possuam diversas características favoráveis, existem ainda deficiências que devem ser sanadas para conseguir uma melhor mimetização de certas propriedades mecânicas dos tecidos vivos.

O escopo clínico da engenharia tecidual é enorme, com potencial terapêutico em várias doenças relacionadas ao envelhecimento e ao estilo de vida prevalente na população ocidental, tais como doenças do coração, diabetes, cirrose e osteoartrite, bem como uma série de outros males graves, incluindo lesões da medula espinhal e desfigurações na pele. Normalmente, a engenharia tecidual implica no implante de células em algum tipo de dispositivo que ofereça suporte estrutural – denominado arcabouço – e permitindo que as células modifiquem parcialmente o arcabouço, tornando-o algo semelhante ao tecido natural, antes de implantá-lo no corpo do paciente. Em alguns casos essa etapa intermediária pode ser omitida e o arcabouço pode ser colocado diretamente no receptor, utilizando o próprio organismo como biorreator. Isso levanta a possibilidade de coleta das células, semeadura no arcabouço e implantação em um único evento cirúrgico. Levando tal abordagem adiante, o arcabouço é inserido algumas vezes

sem células. A regeneração depende, dessa forma, do recrutamento de células do tecido adjacente ao local do implante e a subsequente deposição de matriz extracelular. Independentemente da estratégia, o arcabouço representa um elemento crucial para o sucesso do implante, e em muitos casos, direciona ativamente o comportamento das células com as quais interage (PLACE *et al.*, 2009).

Apesar do intenso investimento na pesquisa na área de engenharia tecidual, apenas há poucos anos passou a ser rentável à indústria (LYSAGHT *et al.*, 2008). O potencial de impacto da engenharia tecidual é enorme na saúde. Entretanto, existem muitas barreiras que dificultam o desenvolvimento de produtos baseados na engenharia tecidual devido ao amplo número de variáveis importantes que influenciam no sucesso da estratégia, desde variações nas propriedades dos materiais até as respostas celulares a serem medidas e avaliadas antes de ser considerado para aplicação final (SIMON, LIN-GIBSON, 2011).

2.4 Engenharia Tecidual Óssea

O osso é um tecido mineralizado complexo e altamente organizado. É um compósito de hidroxiapatita e colágeno tipo I produzido por osteoblastos (células diferenciadas das células-tronco mesenquimais presentes na medula óssea). Essas células têm morfologia tipicamente cuboide ou achatada possuindo cerca de 20 µm de diâmetro. Os osteoblastos produzem uma matriz de colágeno tipo I desorganizada, posteriormente mineralizada com cristais de hidroxiapatita para formar o osteóide. Os osteoclastos (células derivadas dos monócitos do sangue) reabsorvem áreas do osteóide, permitindo que ocorra uma remodelação em uma estrutura de fibras organizadas paralelamente, as quais seguem direções alternadas dependendo das forças aplicadas ao osso (BRYDONE *et al.*, 2010).

O organismo é capaz de reparar de modo eficiente, pequenas fraturas ósseas, entretanto, grandes defeitos causam maiores problemas e o organismo não é capaz de repará-los. Defeitos ósseos podem ocorrer como resultado de anormalidades congênitas, trauma ou doença infecciosa (SEAL *et al.*, 2001). Apesar dos tratamentos de fraturas ósseas serem práticas clínicas frequentes, cerca de 50% necessita de intervenções cirúrgicas (PRAEMER *et al.*, 1992).

A rápida cicatrização de fraturas ou danos ósseos é de grande interesse, devido à restituição da qualidade de tecido, do bem estar do paciente e também por razões econômicas. Problemas como a restauração da integridade mecânica e o estabelecimento da continuidade do esqueleto necessitam intervenções rápidas (MA *et al.*, 2001). A regeneração do tecido ósseo envolve não somente a síntese de um esqueleto colágeno rico em hidroxiapatita, mas também a regeneração de uma estrutura complexa com estabilidade mecânica (SEAL *et al.*, 2001).

Com o aumento da expectativa de vida da população é esperado um gradativo aumento no número de cirurgias ósseas, principalmente devido a doenças como artrite, tumores e trauma. Nesses casos podem ser utilizados enxertos autógenos, alógenos ou substitutos equivalentes a enxertos ósseos para restaurar áreas de perda óssea. Implantes cirúrgicos são utilizados também como suplementação ou isolamento em caso de doenças ósseas (BRYDONE *et al.*, 2010).

Defeitos críticos ósseos representam lesões maiores do que as suportadas pelos mecanismos naturais de regeneração do organismo. São provocados principalmente por trauma, excisão de tumores, degeneração patológica ou revisão de implante prostético (HUI *et al.*, 2005; LAURENCIN *et al.*, 1999). A perda de tecido ósseo e mole resultante pode impedir o reparo ortopédico normal. Nestas circunstâncias, é necessária a intervenção através de um transplante tecidual ou estratégias de engenharia tecidual a fim de facilitar o reparo e regeneração óssea (CELIL *et al.*, 2006). As práticas cirúrgicas ortopédicas aplicáveis mais tradicionais são o uso de osso autógeno, osso alógeno, ou enxertos de materiais sintéticos (SALGADO *et al.*, 2004).

Tratamentos autógenos para defeitos ósseos críticos de melhores resultados são aqueles isolados a partir da crista ilíaca do paciente. Enxertos autógenos possuem alta capacidade de formação óssea, oferecendo um arcabouço intrínseco para restauração do tecido, baixo potencial de resposta imune e propriedades mecânicas adequadas (SALGADO *et al.*, 2004; RUSSEL, BLOCK, 2000; YOSHIKAWA, MYOUI, 2005). Entretanto, enxertos autógenos têm diversas limitações, incluindo suprimento finito, morbidade do local doador, dor, possibilidade de danos neurais, infecções e fraturas (DE LONG JR. *et al.*, 2007; YOSHIKAWA, MYOUI, 2005). Embora muitos problemas relacionados ao local doador possam ser solucionados pelo uso de material alógeno de um doador vivo ou de um cadáver, outras dificuldades são encontradas como resposta osteogênica reduzida, potencial de rejeição ou transmissão de doença a partir do indivíduo doador (FINKEMEIER, 2002; DE LONG JR. *et al.*, 2007).

Por isso, os enxertos de materiais sintéticos constituem um campo emergente como uma alternativa viável aos enxertos ósseos autógenos e alógenos para o tratamento de defeitos ósseos críticos. Esses materiais podem ser osteocondutivos, porém, raramente são intrinsecamente osteogênicos (YU *et al.*, 2010). A combinação de PLA com osso desmineralizado parece favorecer a proliferação e diferenciação osteoblástica de células mesenquimais, sendo o PLA capaz de estimular mais a diferenciação em comparação ao dispositivo híbrido (THOMAS *et al.*, 2011).

A obtenção de um biomaterial que atraia interesse para ser usado como substituto ósseo deve ter características tais como, gerar uma resposta inflamatória adequada (biocompatibilidade) e ser degradado pelo organismo (biodegradabilidade) (KUMARASURIYAR *et al.*, 2005). Além disso, deve apresentar propriedades mecânicas similares ao tecido ósseo, ser osteoindutivo e osteocondutivo a fim de sustentar e induzir a formação de um neotecido ósseo e osteointegrativo para que haja uma boa fixação biológica do suporte com o osso (LEONG *et al.*, 2006).

Além disso, a morfogênese, a manutenção e o reparo do tecido ósseo dependem de fatores cruciais como a habilidade de adesão, e migração coordenada de maneira temporal e espacial das células osteoprogenitoras. Por outro lado, é indesejável a proliferação de fibroblastos nos arredores do implante durante a fase de cicatrização, uma vez que isso pode levar a fibrose, fenômeno que pode comprometer, entre outros fatores, a transferência de carga que deve ocorrer para o implante (ZAMBUZZI *et al.*, 2011).

Em se tratando de dispositivos implantáveis, os polímeros biorreabsorvíveis também possuem a interessante vantagem de transferir gradativamente a carga para o tecido ósseo conforme acontece a regeneração. Isso diminui a chance de fraturas que ocorrem devido à retirada do implante, quando um material não biodegradável sustenta todos os estímulos mecânicos durante todo o processo de regeneração, resultando num tecido ósseo neoformado enfraquecido (ATHANASIOU *et al.*, 1998).

Considerações na arquitetura do arcabouço como porosidade, tamanho, interconexão e microestrutura dos poros são fatores críticos para a formação de osso novo. Os tamanhos dos poros e a porosidade desempenham papel importante na adesão, crescimento e diferenciação de células, bem como interfere na formação tridimensional do novo tecido (LIU, MA, 2004). Geralmente, poros que variam entre 100 e 500 μm são considerados ótimos para favorecer a interação do material com células e tecidos (MOONEY *et al.*, 1995). Já a interconexão entre os

poros serve como canal que permite a migração de células e crescimento do tecido, sendo muito importante para regeneração óssea e vascular (HOLLISTER, 2005; MIKOS *et al.*, 1994; MOONEY *et al.*, 1995). Além disso, essa interconexão facilita a adesão e distribuição celular mais uniforme, permitindo também, a difusão de nutrientes e metabólitos no complexo célula-arcaibouço. Por tais motivos, para engenharia tecidual é desejável alta porosidade do dispositivo desde que a estabilidade mecânica do arcaibouço mantenha-se suficiente para suportar a neoformação óssea (SAITO *et al.*, 2001).

Segundo estudo de Bertoldi *et al.* (2008), o PLGA (Fisiograft®) foi menos favorável a regeneração óssea em fraturas em seres humanos quando comparado aos implantes autólogos. No entanto, o PLGA atingiu resultados adequados, promovendo a regeneração de defeitos ósseos graves, sem a necessidade da coleta de material de um segundo sítio doador. Esse mesmo material (Fisiograft®) foi responsável pelo crescimento de osso trabecular, altamente mineralizado e estruturado em pacientes com perda de tecido ósseo periodontal (SERINO *et al.*, 2008).

Diversos trabalhos mostram a boa citocompatibilidade entre células osteoblásticas isoladas de ratos ou coelhos e arcaibouços e membranas de PLDLA (DUARTE, 2009; MESSIAS *et al.*, 2007; MESSIAS *et al.*, 2008; MÁZ *et al.*, 2008). Além disso, o implante de membranas porosas (MALVEZZI *et al.*, 2008) e arcaibouços (FREIRE *et al.*, 2010) pré-cultivadas com osteoblastos de rato demonstraram adequada biocompatibilidade, com respostas inflamatórias de pequeno grau.

Bukharova *et al.* (2010) obtiveram arcaibouços de PDLLA através da técnica de sinterização seletiva a laser para servir de suporte para o crescimento *in vitro* de células-tronco mesenquimais. De acordo com os resultados, essa estratégia acarretou, após o implante, num alto grau de vascularização e considerável quantidade de células ósseas precursoras, sem gerar respostas inflamatórias ou alterações patológicas em ratos.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo a síntese e caracterização do terpolímero poli (L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato), PLDLA-TMC, assim como a obtenção de arcabouços para avaliação da viabilidade celular e mensuração da fosfatase alcalina de células osteoblásticas (SaOS-2), visando aplicação na engenharia tecidual óssea.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Resumidamente, este trabalho foi realizado começando pela síntese e caracterização do terpolímero. Arcabouços preparados de PLDLA-TMC e PLDLA foram analisados morfologicamente e usados como substratos para o cultivo de células osteoblásticas. A Figura 5 apresenta um fluxograma com as etapas do trabalho, explicadas detalhadamente a seguir.

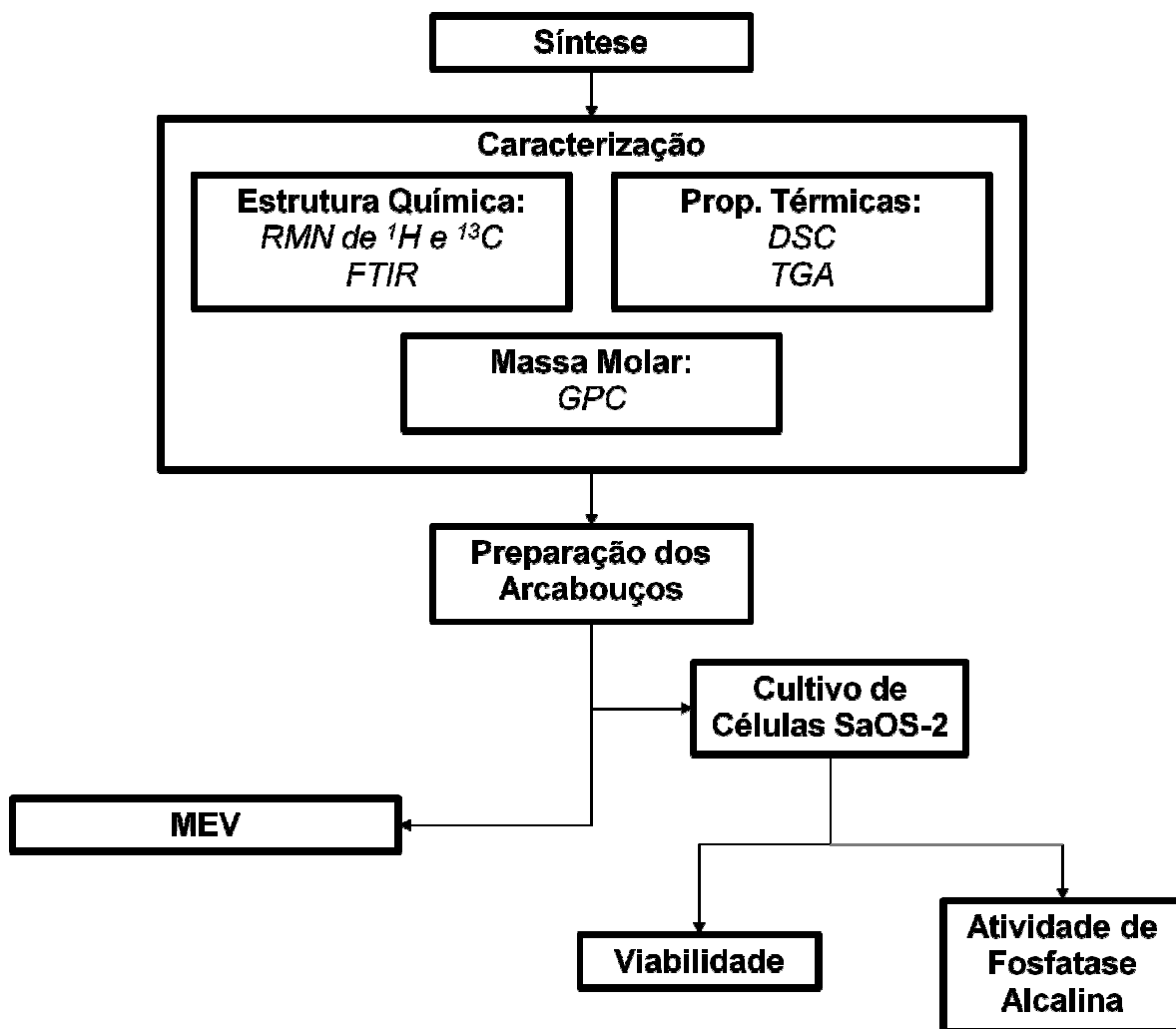


Figura 5. Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho.

4.1 Síntese e Caracterização Físico-química

4.1.1 Síntese de Poli(L-co-D,L Ácido Láctico-co-Trimetileno Carbonato)

Terpolímeros de L-ácido láctico, D,L-ácido láctico e trimetileno carbonato, (PLDLA-TMC), foram preparados através da reação de polimerização em massa, por abertura de anéis dos monômeros. As proporções entre os monômeros L-lactato/D,L-lactato/TMC utilizadas foram duas: 56:24:20 e 50:20:30 (PÊGO *et al.*, 2003). O catalisador utilizado foi o octanoato de estanho, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, e a relação monômero/catalisador (M/C) de 5000. Em estudo anterior, avaliando a influência do catalisador na copolimerização de L-lactato e D,L-lactato, verificou-se que M/C entre 5000 e 6350 produziram polímero de alta massa molar, da ordem de 10^5 g/mol (MOTTA, DUEK, 2007). As massas dos monômeros e do catalisador foram adicionadas numa ampola de vidro, a qual foi selada a vácuo e imersa em um banho de óleo a 130 °C por 48 horas.

Decorrido esse tempo, o terpolímero foi dissolvido em clorofórmio (CHCl_3) e precipitado em metanol (CH_3OH). Esse processo de dissolução e precipitação funciona como uma purificação do material sintetizado. Em seguida, o terpolímero obtido foi seco em estufa a vácuo, mantida a 60 °C durante 72h. Por fim, o terpolímero foi triturado, adquirindo o aspecto granuloso, para a caracterização e obtenção dos arcabouços.

4.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e Carbono 13 (RMN de ^1H e ^{13}C)

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrofotômetro BRUNKER 250 operando a 75 MHz para RMN de ^{13}C e 300 MHz para RMN de ^1H . Foram utilizados tubos de vidro de 5 mm de diâmetro e clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. A análise foi realizada a temperatura ambiente, numa concentração de 10% em massa.

4.1.3 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram solubilizadas em clorofórmio e aplicadas sobre a cela de cloreto de sódio, o espectro de infravermelho foi obtido na região de 4000 a 400 cm^{-1} após a evaporação do solvente, em instrumento FT-IR Spectrum One (Perkin Elmer).

4.1.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As massas molares numérica média (M_n) e ponderal média em massa (M_w) e o índice de polidispersão (IP) foram determinados através da cromatografia de permeação em gel. O tetraidrofurano (THF), filtrado em membrana de 0,45 μm de porosidade, foi utilizado como fase móvel em um sistema constituído de bomba (Waters 1525), um par de colunas 7,8 x 300 mm com partículas de 5 μm (Styragel HR) aquecidas a 40 °C e detector de índice de refração (Waters 2414) a temperatura de 30 °C. Amostras do terpolímero de 3,00 mg/mL foram injetadas manualmente e percorreram o sistema a um fluxo de 1,00 mL/min. Padrões de poliestireno monodisperso, aplicados sob mesma concentração e fluxo das amostras, foram utilizados para calibração.

4.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Amostras com massa entre 7 a 12 mg foram hermeticamente fechadas em celas de alumínio e foram inicialmente aquecidas até 200 °C e mantidas a temperatura constante por 3 min, para apagar a história térmica do material. Em seguida, foram resfriadas até -50 °C e mantidas nessa temperatura por 3 min, e posteriormente aquecidas até 200 °C. As temperaturas de transição apresentadas foram obtidas a partir do segundo aquecimento. A taxa de aquecimento e

resfriamento para todas as etapas foi de 10 °C/min. O experimento foi realizado em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min) em um equipamento TA Instruments modelo 2920.

4.1.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica do terpolímero foi avaliada através das curvas termogravimétricas, obtidas com equipamento STA 409C, NETZSCH. Amostras pesando aproximadamente 20 mg foram submetidas ao aquecimento de 10 °C/min na faixa de 25 a 500 °C, sob atmosfera de argônio.

4.1.7 Obtenção dos Arcabouços de PLDLA-TMC

A técnica para a confecção dos arcabouços usada foi a de evaporação de solvente e, para a produção de poros, o método de lixiviação de porógenos. A partir do terpolímero na forma de pó, foram preparadas soluções de poli (L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) PLDLA-TMC nas proporções 56:24:20 (m/m) pela diluição em clorofórmio (10% m/v). Após completa dissolução do terpolímero, foi adicionada sacarose (70% m/v) com granulometria abaixo de 250 µm. Tal solução foi vertida em moldes cilíndricos de silicone medindo cerca de 0,7 cm de diâmetro e 1 cm de altura. Após evaporação do solvente em temperatura ambiente, removeu-se a sacarose usando solução de álcool polivinílico (1%) durante 24 h sob agitação, seguida de lavagem em água destilada também por 24 h sob agitação.

4.1.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a observação da morfologia interna dos arcabouços, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido por cerca de 5 min para criofratura. As superfícies dos arcabouços não fraturados foram também avaliadas. Antes de serem observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA-840A), as amostras foram recobertas por ouro (Balzers SCD 050).

4.2 Ensaios *in vitro* com Células Osteoblásticas

4.2.1 Linhagem Celular

A fim de avaliar a resposta celular gerada pelo polímero foi utilizada uma linhagem celular de osteosarcoma humano (Figura 6), SaOS-2 (Banco de Célula do Rio de Janeiro). A linhagem SaOS-2 apresenta um fenótipo osteoblástico (McQUILLAN *et al.*, 1995) maduro, foi cultivada em meio McCoy 5A (Nutricell) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB – Nutricell), além disso foram adicionados 50 mg/L de Gentamicina para prevenir a contaminação de bactérias e micoplasmas e 2,5 mg/L de Anfotericina B contra contaminações fúngicas. A partir do frasco confluyente fornecido, uma alíquota de 1×10^5 células foi inoculada em frascos de cultura de poliestireno T75 (Techno Plastic Products – TPP, Switzerland) e foram mantidos em estufa de atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C. Os subcultivos foram realizados sempre que as células atingiam cerca de 80% de confluência usando solução de 0,25% de Tripsina/EDTA (Cultilab, Campinas). As trocas do meio de cultura foram realizadas 3 vezes por semana.

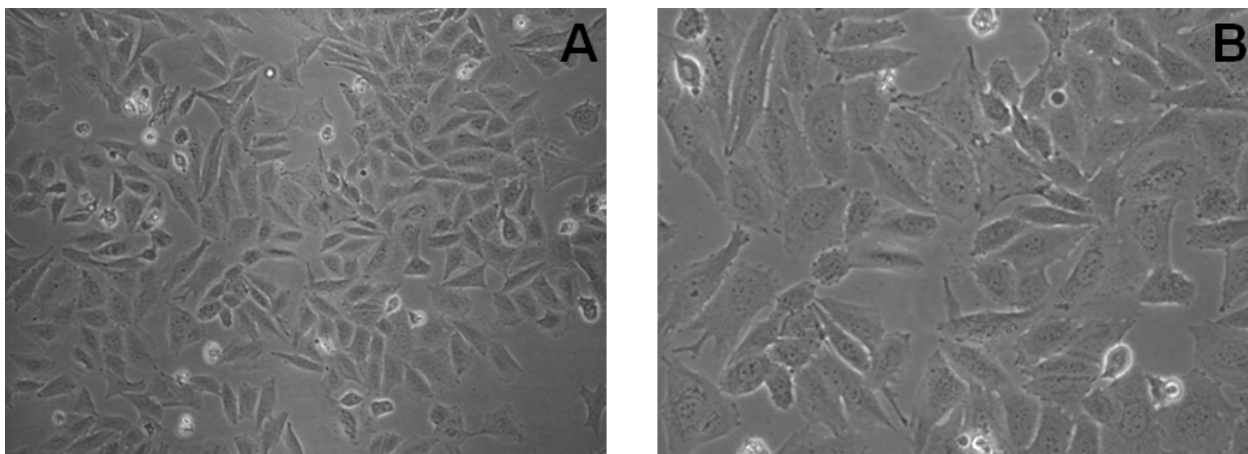


Figura 6. Imagens das células SaOS-2 em frascos T25. A) Aumento de 100X e B) Aumento de 200X.

4.2.2 Cultivo Celular sobre os Arcabouços

Para realização do cultivo celular, os arcabouços cilíndricos foram cortados em pequenos discos com cerca de 0,5 mm de altura, os quais foram imersos em solução de etanol 70% por 1 h e lavados em água ultra-pura. Em seguida, as amostras foram colocadas em placas de 96 cavidades, imersas em McCoy 5A durante 24 h. Posteriormente, as células osteoblásticas foram coletadas dos frascos usando solução tripsina/EDTA e 20.000 células foram semeadas por amostra, sendo mantidas em McCoy 5A com 15% de SFB. O meio McCoy 5A utilizado para os ensaios das células com os arcabouços era desprovido de vermelho de fenol, devido à interferência que esse componente pode provocar nos ensaios colorimétricos realizados.

4.2.3 Viabilidade Celular

Para o ensaio de viabilidade celular foi utilizado o método de oxidação metabólica do MTT (MOSMANN, 1983). Os poços da própria placa de poliestireno foram usados como controle. Após os tempos de cultivo de 1, 3, 7, 14 e 21 dias o meio foi retirado e os poços lavados

rapidamente de 3 a 4 vezes com tampão PBS a 0,1M. Após a lavagem, foi adicionado a cada poço 200 μ L de uma solução de McCoy 5A contendo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT) a 0,5 mg/mL, seguindo-se um período de incubação de 4 horas a 37 °C. Após esse tempo, a solução contendo MTT foi substituída por uma solução de 200 μ L de dimetil sulfoxido (DMSO). Em seguida, 150 μ L das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa e a absorbância mensurada em leitor de microplacas Elx-800-UV (Bio-Tek Instruments, EUA), com emprego de filtro com comprimento de onda de 570 nm. As mitocôndrias de células vivas, por meio da enzima succinato dehidrogenase, são capazes de reduzir a substância amarelada solúvel em água MTT convertendo-a em um composto insolúvel em água, o formazan, o qual é solubilizado pelo DMSO (IGNATIUS, CLAES, 1996). A quantidade de formazan produzida, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional à atividade metabólica e ao número de células vivas.

As médias das absorbâncias foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) e os pares foram comparados com o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. O software utilizado foi o BioEstat versão 5.0.

4.2.4 Fosfatase Alcalina

Transcorridos os tempos de cultivo de 1, 3, 7, 14 e 21 dias, as células dos arcabouços e controle foram lavadas rapidamente com McCoy 5A e tratadas com solução de tripsina/EDTA durante 10 min a 37 °C. As células foram coletadas, colocadas em microtubos, sendo congeladas em nitrogênio líquido por 10 min e aquecidas em banho-maria a 37 °C por 15 min, a fim de lisar as células para a liberação de fosfatase alcalina intracelular. Para quantificação enzimática foi utilizado o kit Fosfatase Alcalina Liquiform (Labtest, ref. 79) de acordo com o protocolo fornecido. O kit é baseado na capacidade da fosfatase alcalina, em pH alcalino, catalisar a hidrólise do substrato p-nitrofenilfosfato, produzindo p-nitrofenol, o qual pode ser medido em espectrofotômetro e é diretamente proporcional à atividade enzimática da fosfatase alcalina da amostra. O reagente de trabalho foi preparado a partir de mistura de 4 partes do reagente A: tampão pH 10,4, 2,0 mmol/L de HEDTA, 1,2 mmol/L de sulfato de zinco, 2,5 mmol/L de acetato

de magnésio e 8,0 mmol/L de azida sódica; e 1 parte do reagente B: 60 mmol/L de p-nitrofenilfosfato e 50 mmol/L de fenol. Uma alíquota de 10 μ L de cada amostra de células lisadas foi pipetada sobre os poços de uma placa de 96 cavidades. Em seguida, 100 μ L de reagente de trabalho foram colocados sobre cada poço e placa foi mantida por 2 min a 37 °C. Após a reação, a absorbância foi mensurada com filtro de 415 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização de PLDLA-TMC

5.1.1 Síntese de PLDLA-TMC

As condições de síntese do terpolímero PLDLA-TMC (Figura 7) do trabalho foram mantidas as mesmas para ambas as sínteses realizadas, sendo a reação conduzida por polimerização em massa a 130 °C, por um período de 48 horas. A relação entre monômero e catalisador (M/C) estipulada para as sínteses do terpolímero, fator fundamental para o sucesso da polimerização, foi baseada no trabalho de doutorado de Motta (2007), onde foi realizado um estudo de variação da relação M/C, nas diversas sínteses do PLDLA.

Foi verificado que os maiores valores de massa molar eram obtidos quando a relação M/C se mantinha próxima a 5000, valor no qual foi baseado este trabalho. Com o objetivo de efetuar uma caracterização química mais precisa, variou-se a proporção dos monômeros L-lactato/D,L-lactato/TMC em 56:24:20 e 50:20:30. A influência provocada pela concentração dos monômeros nos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H foi importante para a confirmação do sucesso das sínteses e são discutidos abaixo no texto.

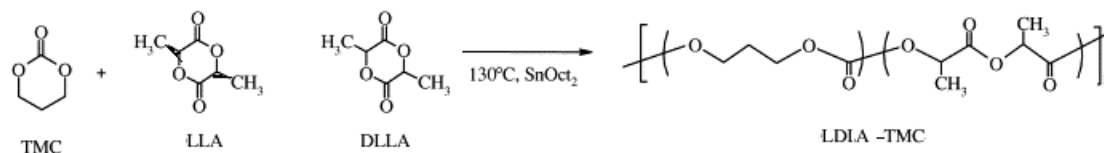


Figura 7. Representação da reação de polimerização do terpolímero poli (L-co-DL ácido láctico-co TMC), PLDLA-TMC.

A variedade de estruturas primárias para formação de poli (ácido láctico) é vasta, uma vez que o ácido láctico possui dois arranjos ópticos, L-ácido láctico e D-ácido láctico, e o dímero cíclico lactídeo, três diferentes conformações ópticas, L-lactídeo (ou *S,S*-lactídeo), D-lactídeo (ou

R,R-lactídeo) e meso-lactídeo (ou *R,S*-lactídeo). Além disso, muitos outros monômeros podem ser copolimerizados com o ácido láctico, aumentando ainda mais a versatilidade de propriedades (DRUMRIGHT *et al.*, 2000).

O poli (L-ácido láctico) já foi combinado com poli (ϵ -caprolactona) na forma de blenda para a preparação de membranas para o cultivo de células de Schwann com resultados positivos na estimulação de produção de moléculas da matriz extracelular (PIERUCCI *et al.*, 2009), fato que explica o favorecimento da regeneração nervosa periférica provocado por implantes tubulares (PIERUCCI *et al.*, 2008). Além disso, blendas 50/50 de poli (L-ácido láctico)/poli(óxido de etileno) foram usadas na regeneração óssea usando ratos como modelo. De fato, as blendas mostraram maior volume de osso formado ao redor do implante em comparação ao PLLA, após 8 e 16 semanas (CORAÇA *et al.*, 2008). Em outro estudo, Santos Jr. *et al.* (2004) avaliou blendas de diferentes proporções de poli(L-acido láctico)/poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), PLLA/PHBV, demonstrando o crescimento celular, bem como a síntese de colágeno tipo IV e fibronectina. Hastes de PLLA/PHBV (40/60) foram também usadas na reparação de fraturas experimentais de fêmur de coelho, mostrando-se como dispositivo efetivo para tal aplicação comparado com o padrão ouro de aço inoxidável (FERREIRA *et al.*, 2008).

O trietilcitrate de sódio já foi utilizado como plastificante para modificar o tempo de degradação e as respostas de corpo estranho em membranas de poli(L-ácido láctico) (MALUF-MEIKEN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006) e de poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PIETRO *et al.*, 2006).

O poli (L-co-D,L ácido láctico), PLDLA (70/30), aplicado na tíbia de coelhos na forma de placas e parafusos, permitiu a formação de tecido ósseo pré-maturo em contato com o copolímero, provocando respostas inflamatórias mínimas (MOTTA, DUEK, 2009). Já o PLDLA, nas proporções 96/4, foi empregado com sucesso na regeneração guiada de tecido fibroso em ratos (LÄNSMAN *et al.*, 2006).

O trimetileno carbonato, foi copolimerizado com D,L ácido láctico, apresentando características favoráveis necessárias em aplicações na engenharia tecidual óssea (DECLERCQ *et al.*, 2006). Além disso, copolímeros (50/50) de PLLA-TMC e PDLA-TMC demonstraram hemo e citocompatibilidade e aplicação em implantes vasculares (YANG *et al.*, 2010).

Por tanto, dado a complexidade e variedade de aplicações em que os biomateriais são usados atualmente, não existe apenas um sistema polimérico disponível que pode ser considerado como um biomaterial ideal (NAIR, LAURENCIN, 2007).

5.1.2 Ressonância Magnética Nuclear de Prótons e Carbono 13 (RMN de ^1H e ^{13}C)

Uma das principais análises na caracterização do terpolímero é fornecida pela ressonância magnética nuclear, tanto de ^1H (Figura 8) como de ^{13}C (Figura 12), pois é essa análise que irá assegurar as unidades formadoras da cadeia do material, confirmando o êxito da síntese quanto à obtenção do terpolímero de interesse.

Os sinais encontrados no RMN de ^1H para o terpolímero sintetizado são praticamente os mesmos encontrados para o copolímero poli (L-co-D,L ácido láctico) (Figura 8A), diferindo apenas em dois deslocamentos que são característicos da presença do TMC, os quais de acordo com a literatura (POSPIECH *et al.*, 2005) devem ser verificados em δ 2,05 ppm ($\text{CH}_2\text{-TMC}$) e δ 4,24 ppm ($\text{OCH}_2\text{-TMC}$). Para efeito de comparação foram mostrados na Figura 8, tanto o espectro do copolímero PLDLA como o do terpolímero PLDLA-TMC. No espectro do copolímero, o multipeto em 5,12-5,24 ppm é atribuído aos prótons CH (H_b), enquanto o quarteto em 1,55-1,59 ppm é atribuído aos prótons CH_3 (H_a).

No caso do terpolímero PLDLA-TMC, o tripleto em 2,05 ppm é atribuído aos prótons CH_2 (H_c), enquanto o tripleto em 4,24 é atribuído ao OCH_2 (H_d), ambos na unidade TMC. Os prótons em questão estão representados na Figura 9.

Pôde-se verificar que os espectros do copolímero PLDLA (Figura 8A) e do terpolímero PLDLA-TMC (Figura 8B) diferem apenas nas regiões que evidenciam a presença dos prótons referentes às unidades do TMC, sendo, dessa maneira, uma ferramenta na constatação de que as condições de síntese empregadas possibilitaram a obtenção do terpolímero desejado.

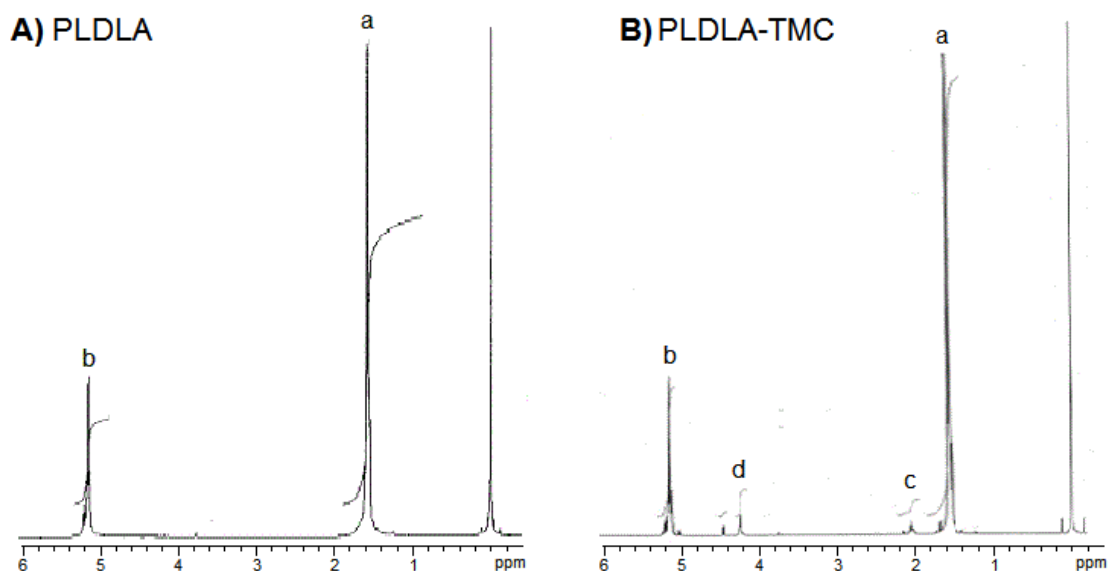


Figura 8. Comparação entre o espectro de RMN de ^1H referente ao copolímero PLDLA (A) e do terpolímero PLDLA-TMC (B), observe os prótons Hc e Hd característicos do TMC.

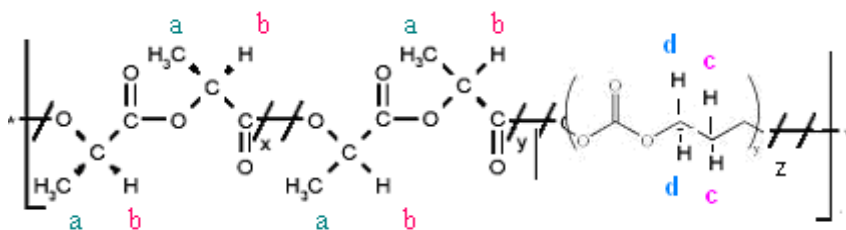


Figura 9. Representação do mero do polímero PLDLA-TMC. As letras a, b, c e d correspondem aos prótons evidenciados no espectro de RMN.

A Figura 10 traz uma comparação entre o espectro de RMN de ^1H da síntese de PLDLA-TMC, na qual a proporção de TMC era 20% (Figura 10A), e a síntese cuja relação em massa de TMC era de 30% (Figura 10B). Essa variação na quantidade de TMC no terpolímero teve o objetivo de permitir uma melhor visualização dos picos atribuídos aos prótons pertencentes às unidades de TMC, o que pode ser verificado pelo ligeiro aumento dos picos referentes aos prótons pertencentes à unidade TMC na cadeia do terpolímero.

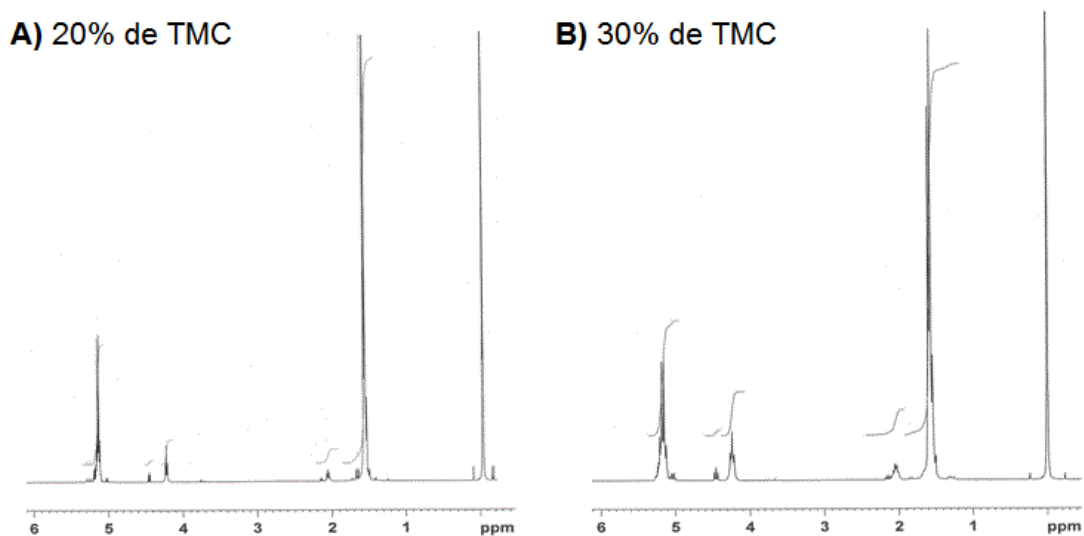


Figura 10. Comparação entre os espectros de RMN de ^1H de PLDLA-TMC contendo 20% (A) e 30% (B) de TMC.

A Figura 11 é referente ao espectro de RMN de ^1H do PLDLA-TMC com 30% de TMC, sendo ampliadas as regiões referentes aos prótons do TMC.

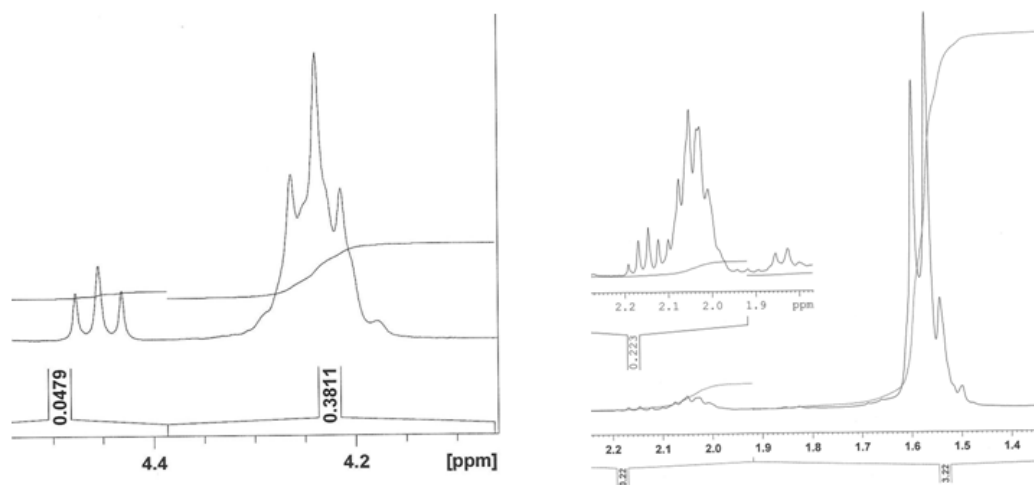


Figura 11. Regiões ampliadas do espectro de RMN de ^1H referente ao terpolímero PLDLA-TMC, 30% de TMC.

Okada (2009) verificou, ao trabalhar com síntese envolvendo TMC, que os pequenos picos dispostos na região de 4,48 ppm se referem a resquícios de monômero residual.

Os sinais encontrados no RMN de ^{13}C para o terpolímero PLDLA-TMC, apresentam-se de acordo com os sinais esperados para as sequências que constituem as unidades do terpolímero. A Tabela 1 mostra os sinais encontrados no espectro com os respectivos valores da literatura, para as sequências presentes nas cadeias. A Figura 12 é referente ao espectro de RMN de ^{13}C do terpolímero.

Tabela 1. Sinais de δ , ppm, no RMN de ^{13}C .

	Unidades L-co-DLA			Unidades TMC		
	CH ₃	CH	C=O	CH ₂ -CH ₂ -CH	CH ₂ O	C=O
Encontrado	16,6	69,0	169,6	27,8	61,8; 64,7	154,8
Literatura*	16,7	69,0	169,6	27,9	61,8; 64,0	154,4

* Matura (1999)

A análise da Tabela 1 confirma a presença dos sinais característicos referentes ao PLDLA e TMC, demonstrando assim, junto com os resultados anteriores, que houve sucesso na síntese do terpolímero, PLDLA-TMC.

5.1.3 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho são muito importantes na caracterização dos grupos químicos funcionais que constituem o material. O espectro de infravermelho obtido para o terpolímero, PLDLA-TMC (Figura 13), difere dos espectros obtidos para o copolímero de PLDLA, estudados anteriormente pelo grupo (DUARTE, 2009; MONTEIRO, 2007), apenas pela presença do sinal em 753 cm^{-1} , característico do grupo $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ do trimetileno carbonato. A transmitância alta em 1181 cm^{-1} é referente às ligações C-C. O sinal em 1265 cm^{-1} ocorre em resposta à deformação axial da ligação C-O na ligação COO. Já os picos em 1380 e 1453 cm^{-1} referem-se à deformação angular da ligação C-H saturada, incluindo grupos CH₃, CH₂ e CH. Segundo Ruckenstein (1998) as bandas atribuídas à presença do TMC são as seguintes: em 1746 cm^{-1} é referente à deformação axial da carbonila (C=O) e 1247 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico O-C-O. No entanto, o sinal em 1746 cm^{-1} é característico também de outros

poliésteres, assim como os sinais em 2945 e 2995 cm^{-1} referentes às deformações axiais simétrica e assimétrica na ligação C–H, respectivamente (DUARTE, 2009). A Figura 13 mostra o espectro de infravermelho para o terpolímero sintetizado, podendo ser notado às principais bandas.

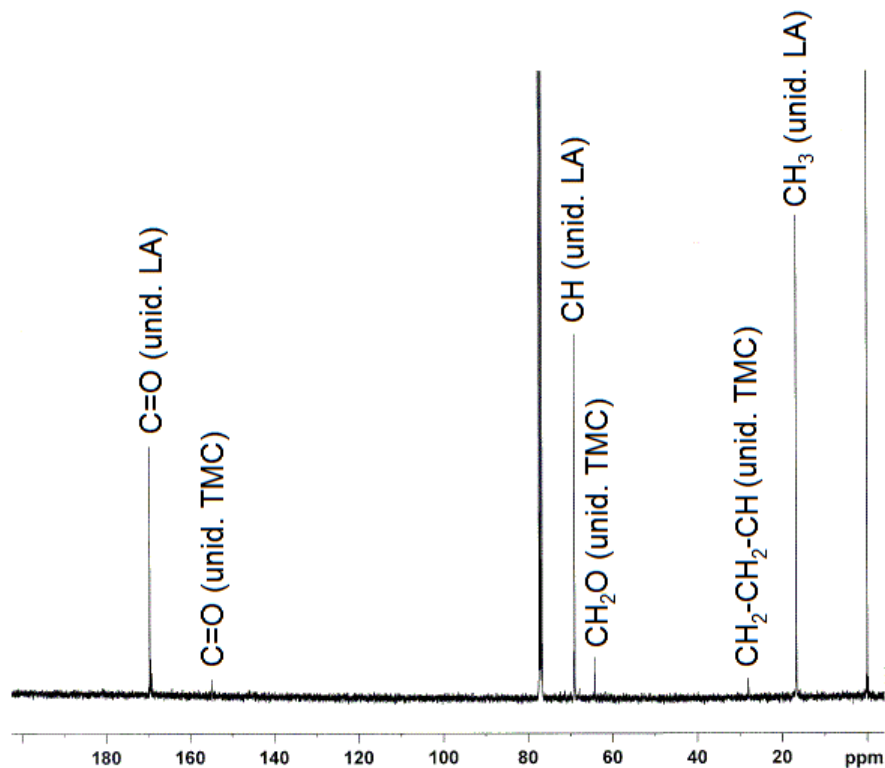


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C para o terpolímero PLDLA-TMC.

5.1.4 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A massa molar, como já comentado anteriormente, apresenta-se como um parâmetro fundamental na avaliação dos processos de degradação do material e também quanto às suas propriedades mecânicas. As massas molares numérica média (M_n) e ponderal média em massa (M_w) e o índice de polidispersão (IP) para as sínteses com 20 e 30% de TMC são apresentadas na Tabela 2.

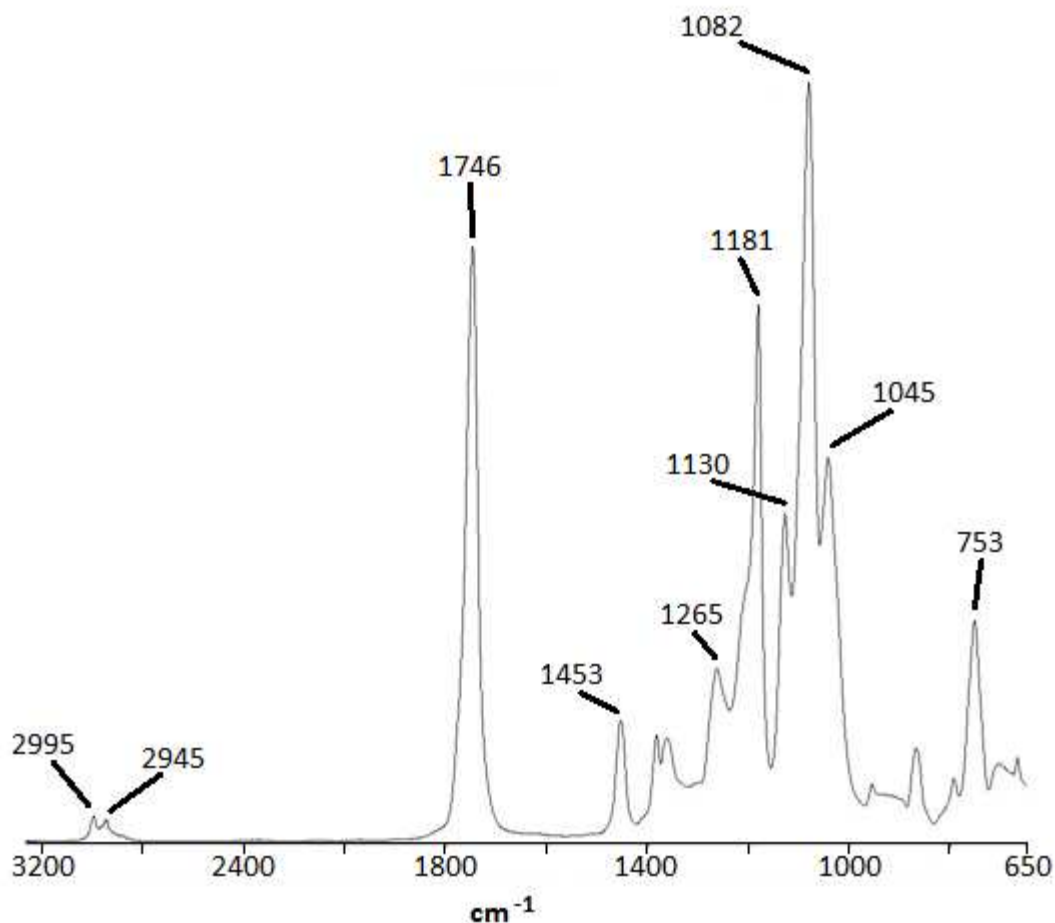


Figura 13. Espectro na região do infravermelho do terpolímero PLDLA-TMC.

Tabela 2. Valores de M_w , M_n e IP obtidos através do GPC.

Síntese	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	IP (M_w/M_n)
20% de TMC	127.630	69.694	1,7
30% de TMC	126.577	60.451	2,0

Como pôde ser verificado pelos resultados acima, os valores de massa molar, para as sínteses de PLDLA-TMC realizadas, foram da ordem de 10^5 g/mol, o que caracteriza polímeros de alta massa molar, como é o requerido para um grande número de aplicações que envolvem desde fixadores de fraturas ate arcabouços poliméricos, situações que requerem materiais com boas propriedades mecânicas (GOGOIEWSKI, 2000).

Luo *et al.* (2011), investigando a influência de diferentes catalisadores na polimerização de D,L-ácido láctico e trietanolamina, obtiveram maiores valores de massa molar utilizando catalisadores de estanho. Os catalisadores desempenham um papel muito importante na polimerização do ácido láctico, principalmente os catalisadores a base de estanho, devido a seu efeito na dispersão do monômero no sistema de reação (MOON *et al.*, 2000; MOON *et al.*, 2001; MOON *et al.*, 2003).

A polimerização mediada pelo octanoato de estanho, utilizado no presente estudo, está bem documentada por sofrer reações de trans-esterificação inter e intra-moleculares durante a polimerização, diminuindo o nível de controle e resultando em polidispersões relativamente amplas (~ 2) (BECKER *et al.*, 2010).

5.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Tabela 3 refere-se à análise de DSC das amostras dos polímeros sintetizados. O valor de T_g foi obtido da curva do 2º aquecimento, que fornece um valor de temperatura de transição vítrea mais preciso e passível de comparação, já que não possui interferência da história térmica.

Tabela 3. Temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros de PLDLA-TMC determinadas por DSC.

Síntese	T_g (°C)
20% de TMC	48
30% de TMC	51

Não foi possível observar nos termogramas picos de fusão e cristalização (dados não mostrados), indício de que as sínteses geraram polímeros completamente amorfos, ou seja, que só apresentam temperatura de transição vítrea (T_g). É justamente o fato de o copolímero ser amorfo que torna seu tempo de degradação menor, além de mais flexível, o que vem a ser uma vantagem se comparado ao homopolímero PLLA, que apresenta cristalinidade elevada, em especial quando

o tempo requerido pela aplicação a que se destina é relativamente curto. A comparação deste terpolímero, PLDLA-TMC, com o copolímero PLDLA (MOTTA, DUEK, 2007), mostra que no terpolímero houve uma ligeira queda no valor da T_g passando de 58 °C (PLDLA) para 48-51 °C (PLDLA-TMC), o que é função da flexibilidade inerente ao TMC na cadeia do terpolímero, o que contribui para a queda no valor da T_g .

As temperaturas de transição do PLA de alta massa molar influenciam diversas características físicas como densidade, capacidade de calor, propriedades físicas e reológicas. O PLA no estado sólido pode ser amorfo ou semicristalino, dependendo da estereoquímica e história térmica. Para os polímeros amorfos de ácido láctico, a temperatura de transição vítrea (T_g) determina a temperatura máxima para as aplicações comerciais mais comuns. Já para os semicristalinos, tanto a T_g (~ 58 °C) quanto a T_m , 130-230 °C (dependendo da estrutura) são importantes para determinação da temperatura de uso através de várias aplicações. Ambas as temperaturas de transição são afetadas amplamente pela composição óptica geral, estrutura primária, história térmica e massa molar (DRUMRIGHT *et al.*, 2000).

O gráfico a seguir, Figura 14, reporta a curva referente ao segundo aquecimento das sínteses PLDLA-TMC realizadas.

5.1.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica do terpolímero foi analisada por análise termogravimétrica. A curva termogravimétrica (Figura 15) é referente à síntese do terpolímero PLDLA-TMC que foi obtido em atmosfera de argônio numa taxa de aquecimento de 10 °C/min, e a Tabela 4 expressa a temperatura de início de perda de massa, bem como a temperatura na qual a perda de massa é máxima para cada síntese do terpolímero.

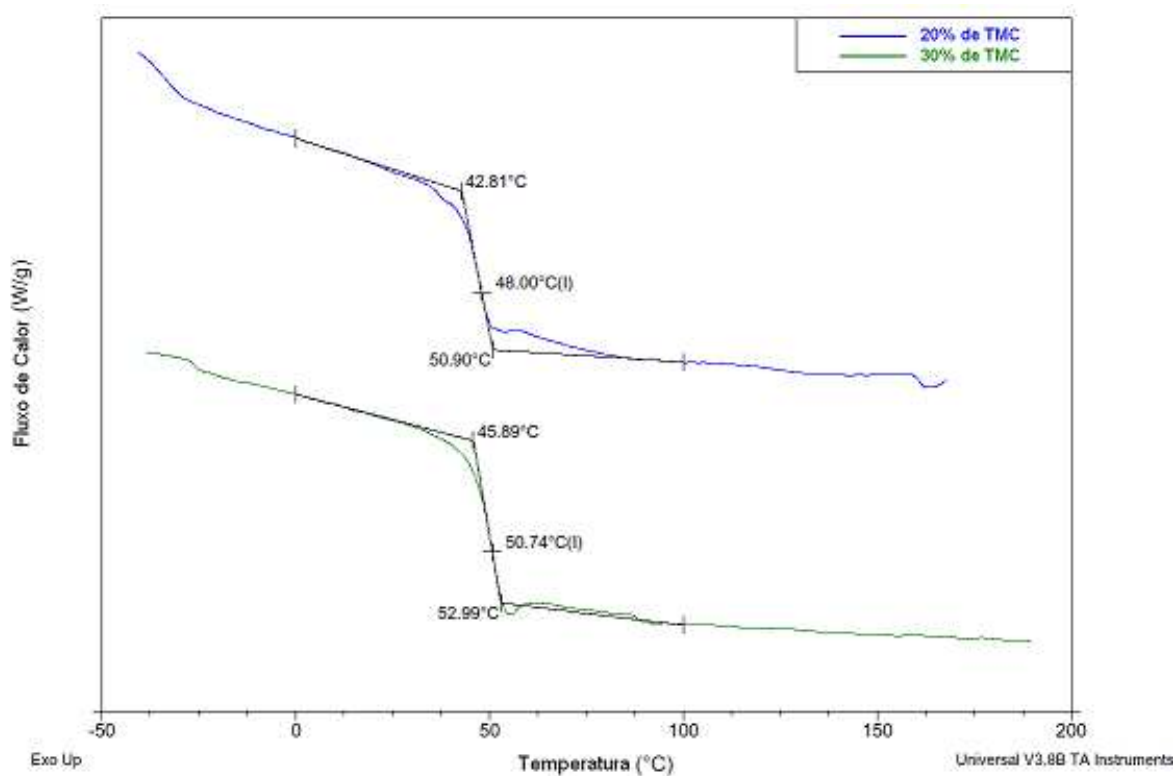


Figura 14. Termograma mostrando a transição vítrea de PLDLA-TMC nas duas composições.

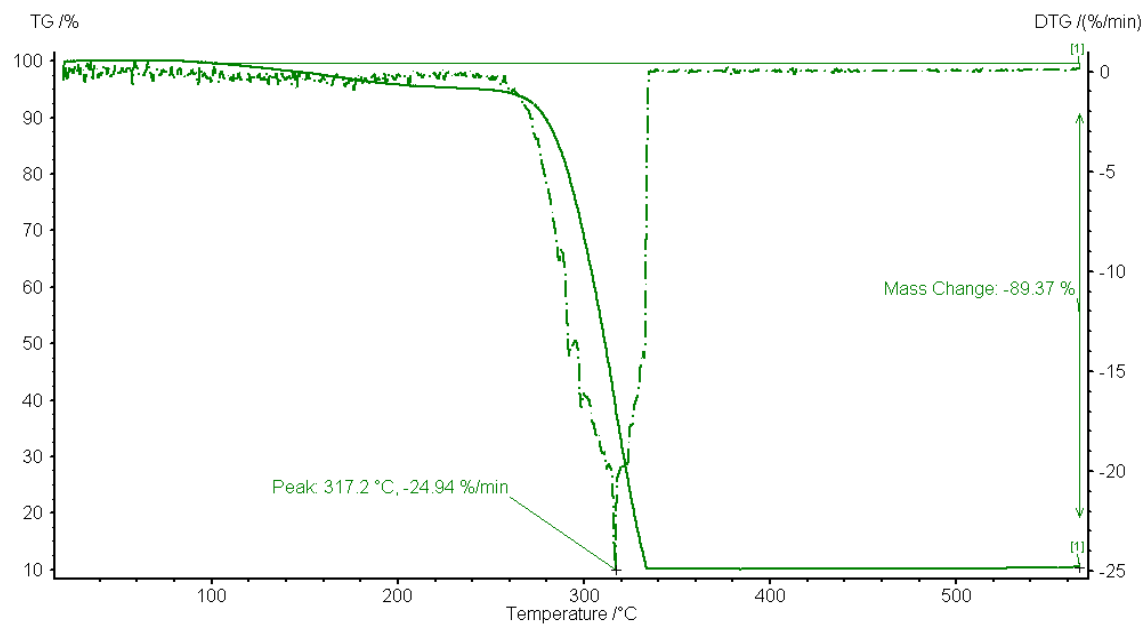


Figura 15. Análise termogravimétrica do terpolímero PLDLA-TMC.

Tabela 4. Propriedades térmicas dos terpolímeros: temperatura de início de perda de massa (T_i) e temperatura onde a perda de massa é máxima (T_{max}).

Síntese	T_i (°C)	T_{max} (°C)
20% de TMC	290	320
30% de TMC	290	317

5.1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 16) mostraram uma morfologia porosa, tanto na superfície dos arcabouços (Figura 16A e B), mas principalmente no interior, como observado nas fraturas (Figura 16C e D). Os poros apresentaram-se com morfologia irregular e dimensões variadas, possuindo os maiores em torno de 250 a 500 μm , enquanto os menores, abaixo de 100 μm . É possível notar que existe interconexão entre os poros a medida em que se aumenta a magnitude, de maneira que os poros mostram-se conectados por outros cada vez menores.

Para a regeneração tecidual óssea é necessário arcabouços porosos tridimensionais e biocompatíveis, a fim de permitir fenômenos como migração celular, vascularização e difusão de nutrientes (DOBLARÉ *et al.*, 2003). Como pode-se observar na Figura 16, os poros acima de cerca de 200 μm , grandes o suficiente para suportarem invasão celular, possuem microporos que facilitariam a difusão de nutrientes e subprodutos. Além disso, tal arcabouço tridimensional deve apresentar propriedades físicas, biológicas e mecânicas adequadas, incluindo a topografia da superfície, tamanho, estrutura e interconexão dos poros, com o objetivo de permitir osteogênese e formação de tecido ósseo novo através da totalidade do arcabouço e ao redor do tecido (KARAGEORGIOU, KAPLAN, 2005). As altas taxas de relação entre superfície e volume é outro importante fator buscado por favorecer a adesão celular sobre um dispositivo (KE *et al.*, 2010).

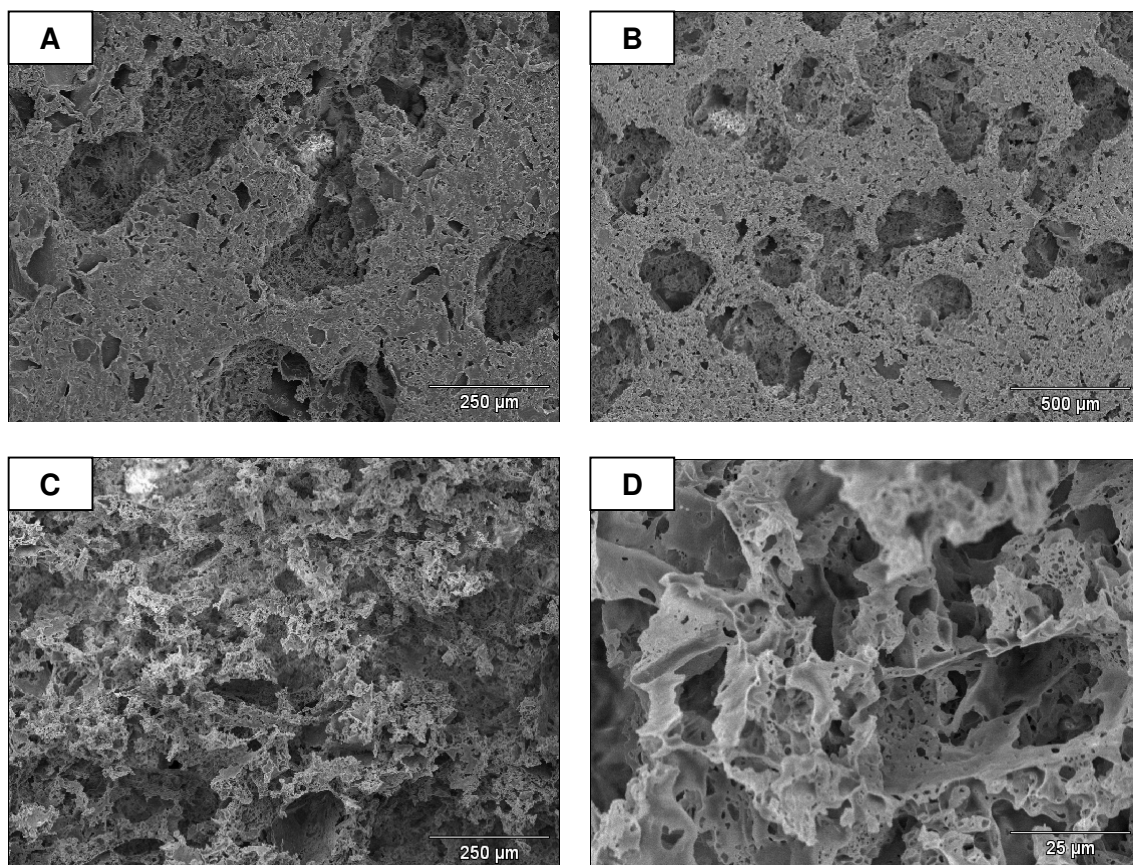


Figura 16. Eletromicrografias de varredura dos arcabouços de PLDLA-TMC. A e B, superfície do suporte. C e D, região interior do arcabouço após criofratura.

Supõem-se que os poros maiores que 250 μm formaram-se em função dos grânulos adjacentes de sacarose, visto que a granulometria do porógeno não passava dessas dimensões.

O método para a obtenção de arcabouços porosos através da evaporação de solventes com posterior lixiviação de partículas tem sido largamente empregado (IDRIS *et al.*, 2010; ODELIUS *et al.*, 2008; MOISENOVICH *et al.*, 2011; SONG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011; LIM *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2010, MESSIAS *et al.*, 2009), devido, principalmete, a facilidade no controle da morfologia, estrutura e tamanho dos poros (ZHANG *et al.*, 2005).

5.2 Ensaios *in vitro* com Células Osteoblásticas

5.2.1 Viabilidade Celular

De acordo com os resultados encontrados com o ensaio do MTT (Figura 17), pôde-se observar que os arcabouços tanto de PLDLA-TMC quanto de PLDLA sustentaram a viabilidade da linhagem de células osteoblásticas, SaOS-2, ao longo dos tempos de cultivo.

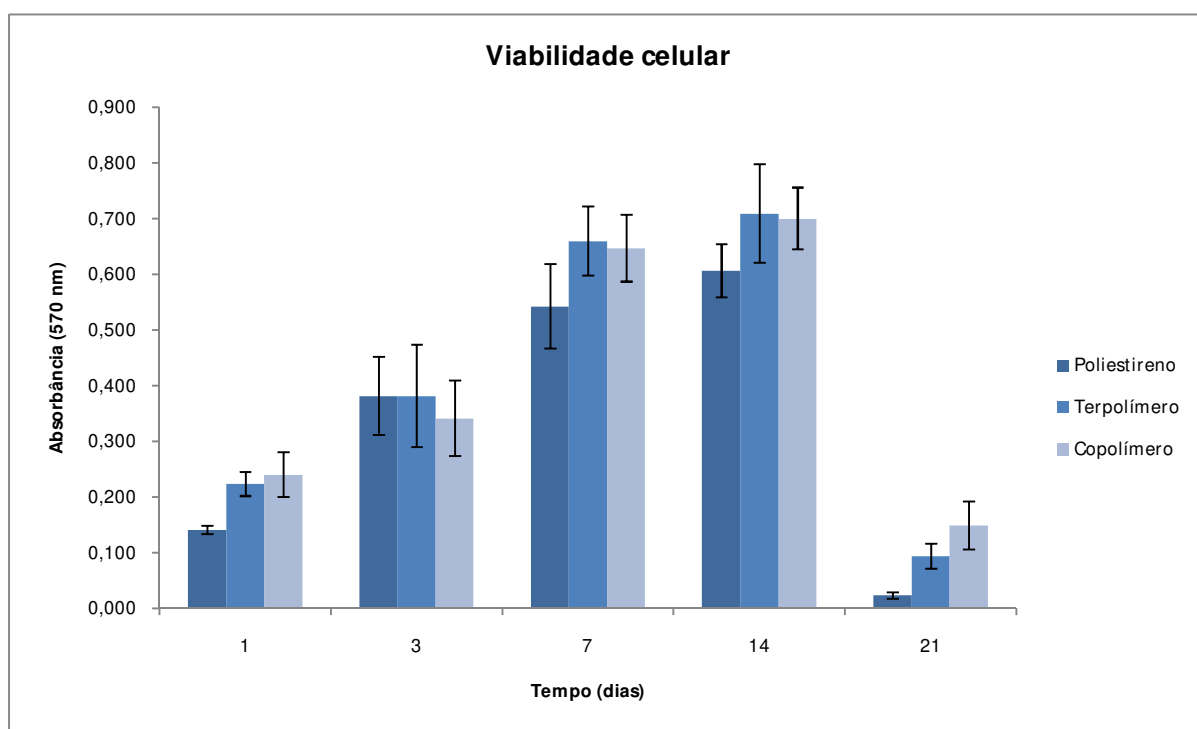


Figura 17. Viabilidade de células osteoblásticas ao longo do tempo sobre arcabouços de PLDLA-TMC (terpolímero), PLDLA (copolímero) e controle de poliestireno. Os dados ($n = 6$) são apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão.

Após 1 dia de cultivo, os arcabouços do terpolímero e do copolímero permitiram viabilidade similar entre si, porém, maiores em relação ao controle de poliestireno ($p < 0,01$). Da mesma maneira, em 7 dias de cultivo, um maior número de células viáveis foi encontrado em

ambos os arcabouços comparados ao controle ($p < 0,05$). Em 14 dias, entretanto, apenas os arcabouços de PLDLA-TMC mostrou resultados melhores que o controle ($p < 0,05$).

Ao longo de 3 dias de cultivo, as amostras e o controle apresentaram viabilidade similar entre si ($p > 0,05$).

Outro resultado importante foi que a viabilidade ao longo dos 7 primeiros dias aumentou, mostrando o crescimento das células osteoblásticas sobre os arcabouços poliméricos, estabilizando-se em 14 dias, uma vez que as médias das absorbâncias das amostras deixaram de se elevar. Porém, a viabilidade celular caiu bastante no tempo de 21 dias.

Depois de entrar em confluência, isto é, após formarem um tapete que recobre toda a superfície de um substrato de crescimento, as células tendem a entrar em apoptose e morrer, uma vez que o crescimento em multicamadas é dificultado pelos problemas de difusão de nutrientes e gases comuns nas condições de cultivo *in vitro* (PERES, CURI, 2005). Essa é a hipótese que se levanta para explicar o decréscimo na viabilidade encontrado nas condições deste estudo. O fato de os tempos de 7 e 14 dias apresentarem resultados similares entre si, ajuda a corroborar a ideia de que o substrato para o crescimento das células já estava se esgotando.

Embora uma substância tóxica não afete apenas uma estrutura molecular, mas sim várias funções celulares; considera-se que a imediata medição da atividade mitocondrial pode ser o suficiente para validar a viabilidade das células (LUCCHESI *et al.*, 2008).

Chen *et al.* (2008) demonstrou em seu estudo, no qual foram cultivadas células SaOS-2 sobre filmes de PLLA, que após 6 dias de cultivo uma camada 100% confluenta já havia se formado sobre as superfícies. Similarmente ao presente estudo, os autores demonstraram uma proliferação acentuada de células SaOS-2.

O poli (L-co-D,L ácido láctico), 70:30, permitiu adesão e viabilidade de células osteoblásticas isoladas da calota craniana de ratos (MESSIAS *et al.*, 2007) e calota craniana de coelhos (MÁS *et al.*, 2008), apresentando também resultados favoráveis ao crescimento dessas células. Somado a isso, esse copolímero demonstrou citocompatibilidade similar ao PLGA quando testado com células osteoblásticas de camundongo (INGNATIUS, CLAES, 1996).

Da mesma forma, Carletti *et al.* (2010) utilizou polímero de D,L-ácido láctico para a fabricação de arcabouços, os quais sustentaram alta viabilidade, atividade metabólica e distribuição homogênea de células osteoblásticas humanas (MG63). O PDLLA foi capaz de servir como substrato para a formação de tecido mineralizado, tanto *in vitro* quanto *in vivo*,

utilizando células diferenciadas em osteoblastos a partir de células-tronco embrionárias humanas (BIELBY *et al.*, 2004).

Copolímeros de D,L ácido láctico e trimetileno carbonato possuem boa biocompatibilidade de acordo com o teste *in vitro* de fibroblastos e permitem a adesão e proliferação de células isoladas da medula óssea, como estudo realizado por Declercq *et al.* (2006). Diferente do presente estudo, esses arcabouços de PDLLA-TMC sustentaram a viabilidade e função de células osteoblásticas, mesmo após 21 dias de cultivo. No entanto, os autores utilizaram estratégias dinâmicas de cultura *in vitro*, com agitação do meio de cultura e consequente melhora na difusão de nutrientes e metabólitos, o que possivelmente permitiu a manutenção das células depois de tantos dias.

As informações levantadas na literatura corroboram os resultados obtidos no presente trabalho, demonstrando que o PLDLA-TMC é adequado para o crescimento *in vitro* de células osteoblásticas. Esses resultados são importantes para estudos futuros, nos quais poder-se-a utilizá-los como arcabouços para engenharia tecidual para regeneração óssea.

5.2.2 Fosfatase Alcalina

O ensaio de fosfatase alcalina (Figura 18), um marcador de diferenciação osteoblástica inicial, mostrou a atividade das células osteoblásticas da linhagem SaOS-2. A síntese de fosfatase alcalina foi estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) quando compararam-se o controle e as amostras de PLDLA-TMC e PLDLA, quase em todos os tempos de cultivo medidos, com exceção de que em 7 dias os arcabouços produziram menos fosfatase alcalina que o controle de poliestireno ($p < 0,05$).

Com o passar dos dias de cultivo observou-se o aumento dessa enzima. O teste de Tukey não mostrou diferenças significantes entre 1 e 3 dias, nem diferenças entre 7 e 14 dias. No entanto, a quantidade de fosfatase alcalina medida em 7 e 14 dias foi estatisticamente maior quando comparados aos tempos de 1 e 3 dias, indicando que os arcabouços do terpolímero e do copolímero sustentaram células osteoblásticas enzimaticamente ativas.

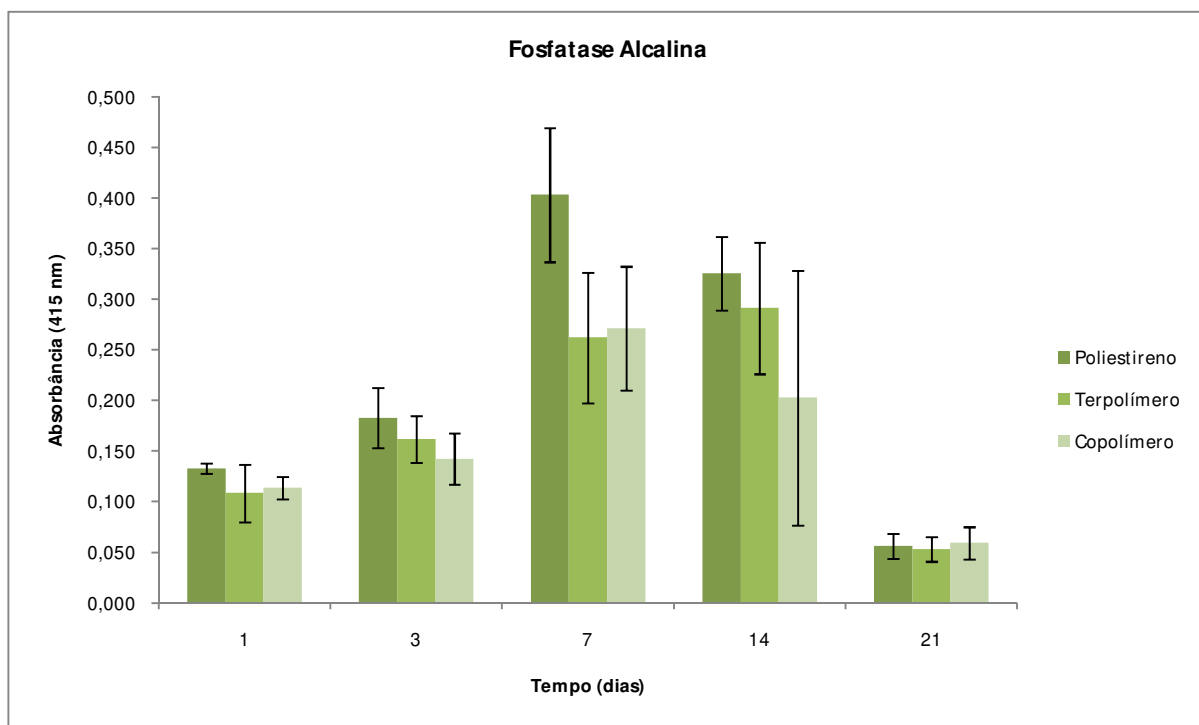


Figura 18. Fosfatase alcalina produzida pelas células osteoblásticas sobre os arcabouços de PLDLA-TMC (terpolímero), PLDLA (copolímero) e controle (poliestireno). Os valores representam média $\pm$ desvio padrão, $n = 6$.

De maneira similar aos resultados do ensaio de MTT, após 21 dias de cultivo, a fosfatase alcalina reduziu-se a índices muito baixos, provavelmente porque as células se soltaram do substrato depois de formarem uma camada confluenta sobre as superfícies. Uma vez, a quantidade de células viáveis encontradas neste estudo após 21 dias de cultivo foi mínima, era esperado que as medidas de fosfatase alcalina também decrescessem.

A fosfatase alcalina é uma enzima ligada à membrana celular pelo lado externo ancorada via ligante glicosil fosfatidilinositol. Acredita-se que esteja envolvida na sinalização transmembrana, promovendo a formação de cristais de fosfato de cálcio nas vesículas formadas na matriz extracelular (TURKSEN, AUBIN, 1991). Além disso, a fosfatase alcalina é apontada por desempenhar um papel importante na adesão, migração, diferenciação de osteoblastos e participa da mineralização da matriz extracelular (HUI *et al.*, 1993; HARRIS, 1990).

Diversos autores descreveram a diferenciação em células osteoblásticas pela medição da atividade da fosfatase alcalina. Xue *et al.* (2010), Ma *et al.* (2011) e Seyedjafari *et al.* (2010) encontraram altos índices de fosfatase alcalina em células-tronco mesenquimais cultivadas sobre

PLLA e outros poli (α -hidroxi ácidos). Além disso, arcabouços do copolímero poli (D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) permitiram a diferenciação osteoblástica de células isoladas da medula óssea de ratos, as quais apresentaram alta atividade de fosfatase alcalina (DELCLERCQ *et al.*, 2006).

6 CONCLUSÃO

De acordo com o estudo, pode-se concluir que foi possível sintetizar o poli (L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) através da reação de polimerização por abertura dos anéis dos monômeros, utilizando o octanoato de estanho como catalisador. Além disso, o método permitiu a obtenção de polímero com altas massas molares e a análise térmica mostrou um decréscimo da temperatura de transição vítrea provocada pela presença de TMC, sem influência, porém, na degradação térmica.

Os arcabouços de PLDLA-TMC apresentaram morfologia porosa favorável ao cultivo de células e mostraram-se aptos a sustentar a viabilidade e proliferação de células osteoblásticas (SaOS-2), além disso, a atividade de fosfatase alcalina demonstrou a manutenção do fenótipo osteoblásticos das células que cresceram sobre o polímero. Dessa forma, demonstrou-se uma potencial estratégia que pode ser aplicável na engenharia tecidual óssea.

7 SUGESTÃO PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Influência do trimetileno carbonato nas propriedades mecânicas do poli(L-co-D,L ácido láctico);

Caracterização mais aprofundada das células em contato com o material: medição da atividade de outras enzimas, mineralização e expressão gênica;

Interação do terpolímero com o tecido ósseo *in vivo*;

Aplicação da estratégia de engenharia tecidual pelo pré-cultivo de células osteoblásticas *in vitro*, para crescimento de pré-tecido, visando melhorar a regeneração tecidual óssea.

Referências

AGARWAL, S.; WENDORFF, J.; GREINER, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications. **Polymer**, v. 49, n. 26, p. 5603-5621, 2008.

AL-AZEMI, T.F.; HARMON, J.P.; BISHT, K.S. Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Copolymerization of 5-Methyl-5-benzoyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-one (MBC) with Trimethylene Carbonate (TMC): Synthesis and Characterization. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 3, p. 493-500, 2000.

ATHANASIOU, K.A.; AGRAWAL, C.E.; BARBER, F.A.; BURKHART, S.S. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Relative Surgery**, v. 14, n. 7, p. 726-737, 1998.

AURAS, R.; HARTE, B.; SELKE, S. An overview of polylactides as packaging materials. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 9, p. 835-864, 2004.

BAGHERI, S.; MOHAMMADI-ROVSHANDEH, J.; HASSAN, A. Synthesis and characterization of biodegradable random copolymers of L-lactide, glycolide and trimethylene carbonate. **Iranian Polymer Journal**, v. 16, n. 7, p. 489-494, 2007.

BAIARDO, M.; FRISONI, G.; SCANDOLA, M.; RIMELEN, M.; LIPS, D.; RUFFIEUX, K.; WINTERMANTEL, E. Thermal and mechanical properties of plasticized poly(L-lactic acid). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 90, n. 7, p. 1731-1738, 2003.

BARAUNA, Grazielle dos Santos. Regeneração Nervosa Periférica. 2007. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BARBER, F.A. Resorbable fixation devices: a product guide (Orthopedic Special Edition), v. 4, p. 1111-1117, 1998.

BERTOLDI, C.; ZAFFE, D.; CONSOLO, U. Polylactide/polyglycolide copolymer in bone defect healing in humans. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1817-1823, 2008.

BIELBY, R.C.; BOCCACCINI, A.R.; POLAK, J.M.; BUTTERY, L.D. *In vitro* differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 9-10, p. 1518-1525, 2004.

BRYDONE, A.S., MEEK, D., MACLAINE, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine**, vol. 224, n. 12, p. 1329-1343, 2010.

BUKHAROVA, T.B.; ANTONOV, E.N.; POPOV, V.K.; FATKHUDINOV, T.KH.; POPOVA, A.V.; VOLKOV, A.V.; BOCHKOVA, S.A.; BAGRATASHVILI, V.N.; GOL'DSHTEIN, D.V. Biocompatibility of tissue engineering constructions from porous polylactide carriers obtained by the method of selective laser sintering and bone marrow-derived multipotent stromal cells. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 149, n. 1, p. 148-153, 2010.

CARLETTI, E.; ENDOGAN, T.; HASIRCI, N.; HASIRCI, V.; MANIGLIO, D.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C. Microfabrication of PDLLA scaffolds. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, *in print*, 2010.

CAROTHERS, H.; DOROUGH, G.L.; VAN NATTA, F.J. Studies of polymerization and ring formation. X. The reversible polymerization of six-membered cyclic esters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 54, n. 2, p. 761-772, 1932.

CELIL, A.B.; GUELCHER, S.; HOLLINGER, J.O.; MILLER, M. Tissue engineering applications: Bone. In: Bronzino, J.D. (ed) **Tissue Engineering and Artificial Organs**. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group, LLC; 2006.

CERONI FILHO, Alberto S. Obtenção, caracterização e estudo *in vitro* de microesferas de PLLA e da blenda PLLA/PEO para liberação controlada de cloridrato de vancomicina. 2004. 116p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CHEN, Y.; MAK, A.F.T.; WANG, M.; LI, J.S.; WONG, M.S. In vitro behavior of osteoblast-like cells on PLLA films with a biomimetic apatite or apatite/collagen composite coating. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 6, p. 2261-2268, 2008.

CORAÇA, D.C.; DUEK, E.A.; PADOVANI, C.A.; CAMILLI, J.A. Osteointegration of poly(L: -lactic acid)PLLA and poly(L: -lactic acid)PLLA/poly(ethylene oxide)PEO implants in rat tibiae. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 7, p. 2699-2704, 2008.

DE LONG JR., W.G.; EINHORN, T.A.; KOVAL, K.; MCKEE, M.; SMITH, W.; SANDERS, R.; WATSON, T. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery: A critical analysis. **Journal of Bone and Joint Surgery – Series A**, v. 89, n. 3, p. 649-658, 2007.

DECLERCQ, H.A.; CORNELISSEN, M.J.; GORSKIY, T.L.; SCHACHT, E.H. Osteoblast behaviour on in situ photopolymerizable three-dimensional scaffolds based on D, L-lactide, ϵ -caprolactone and trimethylene carbonate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 2, p. 113-122, 2006.

DIJKSTRA, P.J.; DU, H.; FEIJEN, J. Single site catalysts for stereoselective ring-opening polymerization of lactides. **Polymer Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 520-527, 2011.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J.M.; GÓMEZ, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: A review. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 71, n. 13-14, p. 1809-1840, 2004.

DRUMRIGHT, R.E.; GRUBER, P.R.; HENTON, D.E. Polylactic acid technology. **Advanced Materials**, v. 12, n. 23, p. 1841-1846, 2000.

DUARTE, Márcia A. Tomaz. **Influência da concentração de PCL-T em membranas de PLDLA**: estudo *in vitro* e *in vivo*. 2009. 135p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

ENGELBERG, I.; KOHN, J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study. **Biomaterials**, v. 12, n. 3, p. 292-304, 1991.

ESPOSITO, Andrea Rodrigues. Crescimento de fibrocondrócitos sobre arcabouço de PLDLA/PCL-T para aplicação como prótese de menisco. 2010. 95p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FERREIRA, B.M.P; STEFFEN, A.M.; CARDOSO, T.P.; ALBERTO-RINCON, M.C.; DUEK, E.A.R. Haste intramedular polimérica bioreabsorvível (PLLA/PHBV) para uso na recuperação de fraturas ósseas. **Polímeros**, v. 18, n. 4, p. 312-319, 2008.

FINKEMEIER, C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **Journal of Bone and Joint Surgery – Series A**, v. 84, n. 3, p. 454-464, 2002.

FREIRE, D.C.L.; MAS, B.A.; MESSIAS, A.D.; ARAGONES, A.; BARBO, M.L.P.; DUEK, E. A.R.D. Implante de arcabouços de poli(L-co-D,L-ácido láctico), PLDLA, previamente cultivados com osteoblastos em calota craniana de ratos. In: 6º CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS (COLAOB), 2010, Gramado, Rio Grande do Sul.

GOGOLEWSKI, S. Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury*, v. 31, Supply. 4, p. D28-D32, 2000.

GOTTSCHALK, C.; WOLF, F.; FREY, H. Multi-arm star poly(L-lactide) with hyperbranched polyglycerol core. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 208, n. 15, p. 1657-1665, 2007.

GU, S.-Y.; ZHANG, K.; REN, J.; ZHAN, H. Melt rheology of polylactide/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 1, p. 79-85, 2008.

HARRIS, H. The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. **Clinica Chimica Acta**, v. 186, n. 2, p. 133-150, 1990.

HORI, Y.; YAMAGUCHI, A. Ring-Opening Copolymerization of (R)-.beta.-Butyrolactone with (R)-3-Methyl-4-oxa-6-hexanolide: A New Biodegradable Poly(ester-ether). **Macromolecules**, v. 28, n. 1, p. 406-408, 1995.

HUI, J.H.P.; OUYANG, H.W.; HUTMACHER, D.W.; GOH, J.C.H.; LEE, E.H. Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering: A review of recent advances in National University of Singapore. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v. 34, n. 2, p. 206-212, 2005.

HUI, M.; HU, M.; TENENBAUM, H.C. Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. **Cell and Tissue Research**, v. 274, n. 3, p. 429-437, 1993.

IDRIS, S.B.; ARVIDSON, K.; PLIKK, P.; IBRAHIM, S.; FINNE-WISTRAND, A.; ALBERTSSON, A.C.; BOLSTAD, A.I.; MUSTAFA, K. Polyester copolymer scaffolds enhance

expression of bone markers in osteoblast-like cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94A, n. 2, p. 631-639, 2010.

IGNATIUS, A.A.; CLAES, L.E. *In vitro* biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 17, n. 8, p. 831-839, 1996.

ISO 10993-5, “(E) Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5 – Tests for cytotoxicity: In vitro Methods”, 1992.

JIA, Y.T.; KIM, H.Y.; GONG, J.; LEE, D.R.; DING, B.; BHATTARAI, N. Synthesis and characterization of ABA-type block copolymers of trimethylene carbonate and ϵ -caprolactone. **Polymer International**, v. 53, n. 3, p. 312-319, 2004.

JIA, Z.; TAN, J.; HAN, C.; YANG, Y.; DONG, L. Poly(ethylene glycol-co-propylene glycol) as a macromolecular plasticizing agent for polylactide: Thermomechanical properties and aging. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 114, n. 2, p. 1105-1117, 2009.

JOZIASSE, C.A.P.; GRABLOWITZ, H.; PENNINGS, A.J. Star-shaped poly[(trimethylene carbonate)-co-(ϵ -capro-lactone)] and its block copolymers with lactide/glycolide: synthesis, characterization and properties. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 201, n. 1, p. 107-112, 2000.

KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-5491, 2005.

KATTI, D.S.; LAKSHMI, S.; LANGER, R.; LAURENCIN, C.T. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 54, n. 7, p. 933-61, 2002.

KE, Y.; WANG, Y.J.; REN, L.; ZHAO, Q.C.; HUANG, W. Modified PHBV scaffolds by in situ UV polymerization: Structural characteristic, mechanical properties and bone mesenchymal stem cell compatibility. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1329-1336, 2010.

KIM, J.-H., LEE, J.H. Preparation and properties of poly(L-lactide)-block-poly(trimethylene carbonate) as biodegradable thermoplastic elastomer. **Polymer Journal**, v. 34, n. 3, p. 203-208, 2002.

KRICHELDORF, H.R. Biodegradable polymers with variable architectures via ring-expansion polymerization, **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 19, p. 4723-4742, 2004.

KRICHELDORF, H.R.; WEEGEN-SCHULZ, B. Polymers of carbonic acid. XIV. High molecular weight poly(trimethylene carbonate) by ring-opening polymerization with butyltin chlorides as initiators. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 33, n. 13, p. 2193-2201, 1995.

KRICHELDORF, H.R.; AHRENSDORF, K.; ROST, S. Star-shaped homo- and copolyesters derived from ϵ -caprolactone. L,L-lactide and trimethylene carbonate. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 205, n. 12, p. 1602-1610, 2004.

KUMARASURIYAR, A.; JACKSON, R.A.; GRØNDAHL, L.; TRAU, M.; NURCOMBE, V.; COOL, S.M. Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) supports *in vitro* osteogenesis. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 7-8, p. 1281-1295, 2005.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.

LÄNSMAN, S.; PÄÄKKÖ, P.; RYHÄNEN, J.; KELLOMÄKI, M.; WARIS, E.; TÖRMÄLÄ, P.; WARIS, T.; ASHAMMAKHI, N. Poly-L/D-lactide (PLDLA) 96/4 fibrous implants: histological evaluation in the subcutis of experimental design. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 6, p. 1121-1128, 2006.

LAURENCIN, C.T.; AMBROSIO, A.M.A.; BORDEN, M.D.; COOPER JR., J.A. Tissue engineering: Orthopedic applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, n. 1, p. 19-46, 1999.

LEE, J.H.; OH, J.H.; LEE, J.H.; KIM, M.R.; MIN, C.K. Evaluation of *in vitro* spermatogenesis using poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based macroporous biodegradable scaffolds. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 5, n. 2, 2011.

LEINONEN, S.; SUOKAS, E.; VEIRANTO, M.; TÖRMÄLÄ, P.; WARIS, T.; ASHAMMAKHI, N. Holding power of bioabsorbable ciprofloxacin-containing self-reinforced poly-L/DL-lactide 70/30 bioactive glass 13 miniscrews in human cadaver bone. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 13, n. 2, p. 212-218, 2002.

LEONG, N.L.; JIANG, J.; LU, H.H. Polymer-ceramic composite scaffold induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **EMBS Annual International Conference**, ago 30-set 3, New York City, USA, 2006.

LEWIS, O.G.; FABISIAL, W. **Sutures**. In: Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. (4th ed.). New York: Wiley, 1997.

LI, S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 48, n. p. 342-53, 1999.

LI, Y.; SHIMIZU, H. Toughening of polylactide by melt blending with a biodegradable poly(ether)urethane elastomer. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 7, p. 921-928, 2007.

LIM, J.I.; LEE, Y.K.; SHIN, J.S.; LIM, K.J. Preparation of interconnected porous chitosan scaffolds by sodium acetate particulate leaching. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 22, n. 10, 2011.

LIU, X.; MA, P.X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, n. 3, p. 477-486, 2004.

LJUNGBERG, N.; WESSLÉN, B. The effects of plasticizers on the dynamic mechanical and thermal properties of poly(lactic acid). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 86, n. 5, p. 1227-1234, 2002.

LOFGREN A., ALBERTSSON A.-C., DUBOIS P., JEROME R. Recent advances in ring-opening polymerization of lactones and related compounds. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. C35, n. 3, p. 379-418, 1995.

LUCCHESI, C.; FERREIRA, B. M. P.; DUEK, E. A. R.; SANTOS Jr., A. R.; JOAZEIRO, P. P. Increased response of Vero cells to PHBV matrices treated by plasma. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 2, p. 635-643, 2008.

LUO, Y.-F.; WANG, Z.-Y.; YE, R.-R.; LUO, S.-H.; YANG, L.-T. Synthesis of poly(D,L-lactic acid) modified by triethanolamine by direct melt copolycondensation and its characterization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 119, n. 4, p. 1883-1888, 2011.

LYSAGHT, M.J.; JAKLENEC, A.; DEWEERD, E. Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 2, p. 305-315, 2008.

MA, J.; HE, X.; JABBARI, E. Osteogenic differentiation of marrow stromal cells on random and aligned electrospun Poly(l-lactide) nanofibers. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 39, n. 1, p. 14-25, 2011.

MA, P.X.; ZHANG, R.; XIAO, G.; FRANCESCHI, R. Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffold. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 54, n. 2, p. 284-93, 2001.

MALUF-MEIKEN, L.C.; SILVA, D.R.; DUEK, E.A.; ALBERTO-RINCON, M.C. Morphometrical analysis of multinucleated giant cells in subdermal implants of poly-lactic acid in rats. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 9, p. 849-857, 2006.

MALVEZZI, H.; MESSIAS, A.D.; CORAÇA, D.C.; PAVANI, A.F.; DUEK, E.A.R. Procedimento Histológico de Implantes Ósseos de Suporte de Poli(L-co-D,L Ácido Láctico)PLDLA Litografados e Cultivados com Osteoblastos. In: 5º CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS (COLAOB), 2008, Ouro Preto,

MANDOLI, C.; MECHERI, B.; FORTE, G.; PAGLIARI, F.; PAGLIARI, S.; CAROTENUTO, F.; FIACCAVENTO, R.; RINALDI, A.; DI NARDO, P.; LICOCCHIA, S.; TRAVERSA, E. Thick soft tissue reconstruction on highly perfusive biodegradable scaffolds. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, n. 2, p. 127-138, 2010.

MÁS, B.A.; ESPOSITO, A.R.; MESSIAS, A.D.; ARAGONES, A.; DUEK, E.A.R. Cultura de Osteoblastos sobre arcabouços de PLDLA. In: 18º CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS (CEBCimat), 2008, Ipojuca, Porto de Galinhas.

MATSUMURA, S.; TSUKADA, K.; TOSHIMA, K. Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of lactide and trimethylene carbonate forming poly(ester carbonate)s. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1-3, p. 161-167, 1999.

MATSUO, J.; AOKI, K.; SANDA, F.; ENDO, T. Substituent effect on the anionic equilibrium polymerization of six-membered cyclic carbonates. **Macromolecules**, v. 31, n. 14, p. 4432-4438, 1998.

McQUILLAN, D.J.; RICHARDSON, M.D.; BATEMAN, J.F. Matrix deposition by a calcifying human osteogenic sarcoma cell line (SAOS-2). **Bone**, v. 16, n. 3, p. 415-426, 1995.

MESSIAS, A.D.; ARAGONES, A.; DUEK, E.A. PLGA-hydroxyapatite composite scaffolds for osteoblastic-like cells. **Key Engineering Materials**, v. 396-398, p. 461-464, 2009.

MESSIAS, A.D.; LUCCHESI, C.; PAVANI, A.F.; CORAÇA, D.C.; DUEK, E.A.R. Morfologia de osteoblastos sobre PLDLA obtido pela litografia. In: 9º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS (CBPol), 2007, Campina Grande, Paraíba.

MESSIAS, A.D.; LUCCHESI, C.; PAVANI, A.F.; CORAÇA, D.C.; DUEK, E.A.R. Citocompatibilidade de Células Osteoblásticas sobre Suportes Porosos e Lisos de PLDLA. In: 5º CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS (COLAOB), 2008, Ouro Preto, Minas Gerais.

MIDDLETON, J.C.; TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335-2346, 2000.

MOISENOVICH, M.M.; PUSTOVALOVA, O.L.; YU ARHIPOVA, A.; VASILJEVA, T.V.; SOKOLOVA, O.S.; BOGUSH, V.G.; DEBABOV, V.G.; SEVASTIANOV, V.I.; KIRPICHNIKOV, M.P.; AGAPOV, I.I. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 96, n. 1, 2011.

MOON, S.-I.; KIMURA, Y. Melt polycondensation of L-lactic acid to poly(L-lactic acid) with Sn(II) catalysts combined with various metal alkoxides. **Polymer International**, v. 52, n. 2, p. 299-303, 2003.

MOON, S.-I.; LEE, C.-W.; MIYAMOTO, M.; KIMURA, Y. Melt polycondensation of L-lactic acid with Sn(II) catalysts activated by various proton acids: A direct manufacturing route to high molecular weight Poly(L-lactic acid). **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 38, n. 9, 1673-1679, 2000.

MOON, S.-I.; LEE, C.-W.; TANIGUCHI, I.; MIYAMOTO, M.; KIMURA, Y. Melt/solid polycondensation of L-lactic acid: An alternative route to poly(L-lactic acid) with high molecular weight. **Polymer**, v. 42, n. 11, p. 5059-5062, 2001.

MOONEY, D.J.; KAUFMANN, P.M.; SANO, K.; MCNAMARA, K.M.; VACANTI, J.P.; LANGER, R. Transplantation of hepatocytes using porous, biodegradable sponges. **Transplantation Proceedings**, v. 26, n. 6, p. 3425-3426, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTTA, A.C.; DUEK, E.A.R. Síntese e caracterização do copolímero poli (L-co-D,L Ácido Láctico). **Polímeros**, v. 17, n. 2, p. 123-129, 2007.

MOTTA, A.C.; DUEK, E.A.R. Estudo inicial da degradação "in vivo" de poli(L-co-D,L ácido láctico), sintetizado em laboratório, aplicado como prótese tibial em coelhos. **Matéria**, v. 14, n. 3, p. 1070-1075, 2009.

MOURA, Lucas Alves. Utilização de membranas de Poli (L-acido láctico) em regeneração tecidual guiada para periodontia. 2007. 86p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.

NOUVEL, C.C.; DUBOIS, P.; DELLACHERIE, E.; SIX, J.-L. Controlled synthesis of amphiphilic biodegradable polylactide-grafted dextran copolymers. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 11, p. 2577-2588, 2004.

ODELIUS, K.; PLIKK, P.; ALBERTSSON, A.C. The influence of composition of porous copolyester scaffolds on reactions induced by irradiation sterilization. **Biomaterials**, v. 29, n. 2, p. 129-140, 2008.

OKADA, T., IMAMURA, Y., MATSUDA, T., Polymerization of trimethylene carbonate in aqueous solutions: Reaction Mechanism and Characterization. **Polymer Chemistry**, p. 1485-1492, 2009.

OUCHI, T.; OHYA, Y. Design of lactide copolymers as biomaterials. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 453-462, 2004.

PALMIERI, A.; ZOLLINO, I.; CLAUSER, L.; LUCCHESI, A.; GIRARDI, A.; FARINELLA, F.; CARINCI, F. Biological effect of resorbable plates on normal osteoblasts and osteoblasts derived from pfeiffer syndrome. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 22, n. 3, p. 860-863, 2011.

PÊGO, Ana Paula G. M. Biodegradable polymers based on trimethylene carbonate for tissue engineering applications. 2002. 304p. Tese (Doutorado) – Universidade de Twente, Holanda.

PÊGO, A.P.; POOT, A.A.; GRIJPMMA, D.W.; FEIJEN, J. Physical properties of high molecular weight 1,3-trimethylene carbonate and D,L-lactide copolymers. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, n. 9, p. 767-773, 2003.

PELOUZE, P. M. J., Ann. Chim. Phys., 13, 257, 1845. *apud* DRUMRIGHT, R.E.; GRUBER, P.R.; HENTON, D.E. Polylactic acid technology. **Advanced Materials**, v. 12, n. 23, p. 1841-1846, 2000.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 2005. 304p.

PEZZIN, Ana Paula T. Obtenção e caracterização de blendas de poli(p-dioxanona)/poli(L-ácido láctico) (PPD/PLLA) para aplicação como prótese de menisco biorreabsorvível. 2001. 149p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PIERUCCI, A.; DUEK, E.A.; DE OLIVEIRA, A.L. Expression of basal lamina components by Schwann cells cultured on poly(lactic acid) (PLLA) and poly(caprolactone) (PCL) membranes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 489-495, 2009.

PIERUCCI, A.; DUEK, E.A.; DE OLIVEIRA, A.L. Peripheral Nerve Regeneration through Biodegradable Conduits Prepared Using Solvent Evaporation. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 5, 2008.

PIETRO, L.; SILVA, D.R.; ALBERTO-RINCON, M.C.; DUEK, E.A. The influence of triethylcitrate on the biological properties of poly (L-lactic-co-glycolic acid) membranes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 481-485, 2006.

PINTO, Marcelo R. Osteointegração de Blendas de PLDLA/PCL-T. Estudo *in vitro* e *in vivo*. 2007. 108p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

POSPIECH, D.; KOMBER, H.; JEHNICHEN, D.; HÄUSSLER, L.; ECKSTEIN, K.; SCHEIBNER, H.; JANKE, A.; KRICHELDORF, H.R.; PETERMANN, O. Multiblock Copolymers of L-Lactide and Trimethylene Carbonate. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 1, p. 439-446, 2005.

PRAEMER, A.; FURNER, S.; RICE, D.P. **Musculoskeletal conditions in the United States**. Chicago, IL, USA: American Academy of Orthopedic Surgeons, 1992.

QUIRK, R.A.; CHAN, W.C.; DAVIES, M.C.; TENDLER, S.J.B.; SHAKESHEFF, K.M. Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid). **Biomaterials**, v. 22, n. 8, p. 865-872, 2001.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor**. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials Science: a introduction to materials in medicine**. 2 ed. San Diego: Elsevier, 2004, 879p.

REICHERT, W., RATNER, B.D., ANDERSON, J., COURRY, A., HOFFMAN, A.S., LAURENCIN, C.T., TIRRELL, D. 2010 panel on the biomaterials grand challenges. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, vol. 96A, n. 2, p. 275-287, 2011.

RUCKENSTEIN, E.; YUAN, Y. Molten ring-open copolymerization of L-lactide and cyclic trimethylene carbonate. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 69, n. 7, p. 1429-1434, 1998.

SALGADO, A.J.; COUTINHO, O.P.; REIS, R.L. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, n. 8, p. 743-765, 2004.

SANTOS JR, A.R.; WADA, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros**, v. 17, n. 4, p. 308-317, 2007.

SANTOS, A.R. Jr.; BARBANTI, S.H.; DUEK, E.A.; DOLDER, H.; WADA, R.S.; WADA, M.L. Vero cell growth and differentiation on poly(L-lactic acid) membranes of different pore diameters. **Artificial Organs**, v. 25, n. 1, p. 7-13, 2001.

SANTOS, A.R. JR; FERREIRA, B.M.; DUEK, E.A.; DOLDER, H.; WADA, R.S.; WADA, M.L. Differentiation pattern of Vero cells cultured on poly(L-lactic acid)/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) blends. **Artificial Organs**, v. 28, n. 4, p. 381-389, 2004.

SATYANARAYANA, D.; CHATTERJI, P.R. Biodegradable polymers: challenges and strategies. **Journal of Macromolecular Science**, v. C33, n. 3, p. 349-368, 1993.

SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v.34, n. 4-5, p. 147-230, 2001.

SERINO, G.; RAO, W.; IEZZI, G.; PIATTELLI, A. Polylactide and polyglycolide sponge used in human extraction sockets: Bone formation following 3 months after its application. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, n. 1, p. 26-31, 2008.

SEYEDJAFARI, E.; SOLEIMANI, M.; GHAEMI, N.; SHABANI, I. Nanohydroxyapatite-coated electrospun poly(L-lactide) Nanofibers enhance osteogenic differentiation of stem cells and induce ectopic bone formation. **Biomacromolecules**, v. 11 n. 11, p. 3118-3125, 2010.

SHALABY, S.W.; JOHNSON, R.A. Synthetic absorbable polyesters. *In*: SHALABY, S.W. (ed). Biomedical polymers. Designed to degrade systems. New York: Hanser, 1994. p. 1-34.

SILVA, D.R.; JOAZEIRO, P.P.; DUEK, E.A.; ALBERTO-RINCON, M.C. Subdermal implants of poly(L-lactic acid) with plasticizer: an ultrastructural study in rats. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 17, n. 1-2, p. 177-185, 2006.

SONG, Y.; WENNINK, J.W.; KAMPHUIS, M.M.; STERK, L.M.; VERMES, I.; POOT, A.A.; FEIJEN, J.; GRIJPMMA, D.W. Dynamic culturing of smooth muscle cells in tubular poly(trimethylene carbonate) scaffolds for vascular tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 17, n. 3-4, 2011.

THOMAS, C.B.; MAXSON, S.; BURG, K.J.L. Preparation and characterization of a composite of demineralized bone matrix fragments and polylactide beads for bone tissue engineering. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 22, n. 4-6, p. 589-610, 2011.

TORRES, A.; LI, S.M.; ROUSSOS, S.; VERT, M. Poly(lactic acid) degradation in soil or under controlled conditions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 62, n. 13, p. 2295-2302, 1996.

TRESOHLAVÁ, E.; POPELKA, S.; MACHOVÁ, L.; RYPÁČEK, F. Modification of polylactide surfaces with lactide-ethylene oxide functional block copolymers: accessibility of functional groups. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 1, p. 68-75, 2010.

TSURUGA, E.; TAKITA, H.; ITOH, H.; WAKISAKA, Y.; KUBOKI, Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. **Journal of Biochemistry**, v. 121, n. 2, p. 317-324, 1997.

TURKSEN, K.; AUBIN, J.E. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 114, n. 2, p. 373-384, 1991.

VERT, M. Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 538-46, 2005.

VERT, M.; SCHWARCHA, G.; COUDANE, J. Present and future of PLA polymers. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 787-796, 1995.

WALTON, M.; COTTON, N.J. Long-term in vivo degradation of poly-L-lactide (PLLA) in bone. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 21, n. 4, p. 395-411, 2007.

WANG, H.; DONG, J.H.; QIU, K.Y.; GU, Z.W. Synthesis of poly(1,4-dioxan-2-one-co-trimethylene carbonate) for application in drug delivery systems. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1301-1307, 1998.

WANG, Y.; BELLA, E.; LEE, C.S.; MIGLIARESI, C.; PELCASTRE, L.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B.D.; MOTTA, A. The synergistic effects of 3-D porous silk fibroin matrix scaffold properties and hydrodynamic environment in cartilage tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 31, n. 17, p. 4672-4681, 2010.

WILLIAMS, D.F. **Definitions in Biomaterials:** Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3–5, 1986, Vol. 4, New York: Elsevier, 1987. 72p.

WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.

XUE, Y.; XING, Z.; ARVIDSON, K.; ALBERTSSON, A.-C.; HELLEM, S.; FINNE-WISTRAND, A.; MUSTAFA, K. Growth and differentiation of bone marrow stromal cells on biodegradable polymer scaffolds: An in vitro study. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 95, n. 4, p. 1244-1251, 2010.

YANG, J.; LIU, F.; TU, S.; CHEN, Y.; LUO, X.; LU, Z.; WEI, J.; LI, S. Haemo- and cytocompatibility of bioresorbable homo- and copolymers prepared from 1,3-trimethylene carbonate, lactides, and ϵ -caprolactone. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 94, n. 2, p. 396-407, 2010.

YU, G.; JI, J.; ZHU, H.; SHEN, J. Poly(D,L-lactic acid)-block-(ligand-tethered poly(ethylene glycol)) copolymers as surface additives for promoting chondrocyte attachment and growth. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. v. 76B, n. 1, p. 64–75, 2006.

YU, N.Y.C., SCHINDELER, A., LITTLE, D.G., RUYS, A.J. Biodegradable poly(α -hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 93, n. 1, p. 285-295, 2010.

ZAMBUZZI, W.F.; COELHO, P.G.; ALVES, G.G.; GRANJEIRO, J.M. Intracellular signal transduction as a factor in the development of "Smart" biomaterials for bone tissue engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 6, p. 1246-1250, 2011.

ZHANG, J.; WU, L.; JING, D.; DING, J. A comparative study of porous scaffolds with cubic and spherical macropores. **Polymer**, v. 46, n. 13, p. 4979-4985, 2005.

ZHANG, Z.; GRIJPMAN, D.W.; FEIJEN, J. Creep-resistant porous structures based on stereo-complex forming triblock copolymers of 1,3-trimethylene carbonate and lactides. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 4, p. 381-385, 2004a.

ZHANG, Z.; GRIJPMMA, D.W; FEIJEN, J. Triblock Copolymers Based on 1,3-Trimethylene Carbonate and Lactide as Biodegradable Thermoplastic Elastomers. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 205, n. 7, p. 867-875, 2004b.

ZHANG, Z.; KUIJERB, R.; BULSTRAB, S.K.; GRIJPMMA, D.W.; FEIJEN, J. The in vivo and in vitro degradation behavior of poly(trimethylene carbonate). **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 1741-1748, 2006.

ZHAO, Y.; WANG, Z.; YANG, F. Characterization of poly(D,L-lactic acid) synthesized by direct melt polymerization and its application in Chinese traditional medicine compound prescription microspheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 97, n. 1, p. 195-200, 2005.

ZHU, K. J.; HENDREN, R.W.; JENSEN, K.; PITT, C.G. Synthesis, properties, and biodegradation of poly(1,3-trimethylene carbonate). **Macromolecules**, v. 24, n. 8, p. 1736-1740, 1991.