

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS  
POR FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO VISANDO  
APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDO”**

**Rafaella Takehara Paschoalin\***

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA.

**Orientador: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso**

**\* bolsista FAPESP – processo N<sup>o</sup> 2013/03474-3**

**São Carlos - SP  
2017**



---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Rafaella Takehara Paschoalin, realizada em 09/11/2017:

---

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso  
Embrapa

---

Profa. Dra. Leticia Vitorazi  
UFF

---

Prof. Dr. Hernane da Silva Barud  
UNESP

---

Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz  
UFSCar

---

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa  
Embrapa

*Dedicado aos meus pais,  
Airton e Roberta,  
Ao meu irmão,  
Gustavo,  
Ao meus avós e tia Lú  
Ao meu amigo e companheiro, Stanley.*

*“Daher ist die Aufgabe nicht sowohl, zu sehn was noch keiner gesehn hat, als,  
bei dem, was jeder sieht, zu denken, was noch keiner gedacht hat”*

*“Thus, the task is not so much to see what no one yet has seen, but to think what  
nobody yet has thought about that which everybody sees”*

Arthur Schopenhauer

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de ressaltar o meu agradecimento e a importância de algumas pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho e certamente de outros por vir. É importante, portanto, expressar o meu maior agradecimento:

Ao Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso, pela oportunidade de desenvolver o projeto em sua linha de pesquisa, pela orientação, amizade e por permitir que eu explorasse minhas idéias. Minha eterna gratidão pela oportunidade e pelo aprendizado.

*I am very grateful to Prof. Martin Zenke for generously hosting me in his lab during our collaboration, and for his scientific support.*

*My sincere appreciation goes to Dr. Antonio Sechi who supported me in every possible way. I have admired his genuine dedication to scientific research and his critical approach to this study.*

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - processos (2013/03474-3 e BEPE-2015/00771-2) pelo apoio financeiro e bolsa de estudo para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia Pranke e à Dra. Natasha Maurmann pelo auxílio nas análises de cultura de células-tronco mesenquimais.

Ao Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira pela ajuda na escolha do tema deste trabalho, pelo incentivo e dedicação concedida durante a realização desta pesquisa.

A todos da Embrapa Instrumentação que contribuíram com equipamentos, metodologias, análises, críticas, sugestões e discussões para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos amigos do LNNA, tanto aqueles que já passaram pelo laboratório, quanto aqueles que ainda estão presentes. Obrigado pela convivência e amizade.

*I am thankful to all members of the Cell Biology lab for their help and the time we shared during “Kaffeeklatsch” and outside the Klinikum.*

À Embrapa Instrumentação, PPGQ-UFSCar, DQ, UFSCar pela possibilidade do desenvolvimento deste doutorado.

À minha família, pelo apoio, suporte e incentivo durante minha vida pessoal, acadêmica e profissional. Palavras não descrevem minha imensa gratidão.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1- Materiais utilizados .....  | 15 |
| TABELA 2 - Anticorpos monoclonais usados para a detecção dos marcadores de superfícies.....   | 29 |
| TABELA 3 - Dados dos iniciadores da RT-PCR utilizados para a quantificação de citocinas.....  | 31 |
| TABELA 4 - Bandas relevantes e os grupos funcionais referente ao espectro de infravermelho das fibras de PLA e das blendas PLA/PEG.....   | 42 |
| TABELA 5 - Razão entre as absorbâncias do pico do grupo metileno (CH <sub>2</sub> ) em 2880 cm <sup>-1</sup> das blendas PLA/PEG em relação a banda em 2880 cm <sup>-1</sup> do PLA. ..                           | 43 |
| TABELA 6 - Eventos térmicos* das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA e das blendas PLA/PEG.....  | 44 |
| TABELA 7 - Eventos térmicos das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA e da blenda PLA/PEG 80:20 (m/m). Após a incubação com as bactérias <i>S. aureus</i> . Valores referentes ao primeiro aquecimento. .... | 57 |
| TABELA 8 - Eventos térmicos das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA e da blenda PLA/PEG 80:20 (m/m). Após a incubação com as bactérias <i>S. aureus</i> . Valores referentes ao segundo aquecimento. ....  | 57 |
| TABELA 9 - Valores do perfil de degradação térmica das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA e da blenda PLA/PEG 80:20 (m/m), após a incubação com as bactérias <i>S. aureus</i> . ....                      | 60 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 2.1 - Representação do aparato experimental empregado na fiação por sopro em solução .....  | 6  |
| FIGURA 2.2 - Estrutura química do a) L-ácido láctico e b) D-ácido láctico <sup>43</sup> ....   | 8  |
| FIGURA 4.1 - Imagem do sistema de fiação por sopro em solução .....  | 17 |
| FIGURA 4.2 - Representação esquemática do processo de geração e maturação das células dendríticas.....   | 28 |
| FIGURA 5.1 - (A) Micrografias obtidas por MEV das fibras de PLA e das blendas poliméricas; (B) Distribuição do diâmetro das fibras, obtida com o <i>software</i> Image J; C) Diâmetro médio das fibras.....  | 36 |
| FIGURA 5.2 - Viscosidade das soluções de PLA e das blendas PLA/PEG contendo 12% m/v, em função da taxa de cisalhamento a 25 °C, utilizando a mistura de solventes clorofórmio:acetona na proporção 3:1 v/v. ....   | 38 |
| FIGURA 5.3 - A porcentagem da porosidade das mantas de PLA e das blendas PLA/PEG.....  | 39 |
| FIGURA 5.4 - Espectro de infravermelho em modo de reflectância total Atenuada – (ATR) das fibras de PLA e das blendas PLA/PEG. ....  | 41 |
| FIGURA 5.5 - Curvas de DSC das fibras de PLA e suas blendas com PEG. Taxa de 10 °C/min.....  | 44 |
| FIGURA 5.6 - (A) Curvas TGA, relacionando a perda de massa em função da temperatura e (B) curvas DTG relacionando a primeira derivada da variação de massa em função da temperatura. Atmosfera: ar sintético e taxa de aquecimento: 10 °C/min.....   | 46 |
| FIGURA 5.7 - Valores do ângulo de contato médio obtido da água deionizada sobre a superfície das fibras de PLA e das blendas de PLA/PEG. ....  | 48 |
| FIGURA 5.8 - Ângulo de contato médio da água deionizada obtido para as mantas de fibras de PLA e das mantas da blendas com PEG após 12 horas de exposição em PBS e meio de cultura celular RPMI 1640 (Gibco).....  | 50 |
| FIGURA 5.9 - Cinética de dissolução do PEG das fibras da blenda PLA/PEG após a incubação com PBS e meio de cultura celular. A razão das intensidades do pico em 2880 cm <sup>-1</sup> , foi determinada por espectroscopia no infravermelho por reflectância total atenuada. A dissolução do PEG é evidente durante as primeiras 12 horas, seguido por uma menor taxa de dissolução durante as seguintes 36 horas. A inserção mostra as proporções de intensidade das fibras PLA/PEG antes da incubação..... | 51 |



- FIGURA 5.10 - Perda de massa (%) das mantas após 12 horas de exposição em PBS e meio de cultura. A) % da perda de massa total (manta PLA/PEG); B) % de perda de massa em relação a massa de PEG presente na blenda. .... 52
- FIGURA 5.11 - Micrografias obtidas por MEV das fibras poliméricas de PLA e das fibras da blenda 80:20 antes e após a incubação com as bactérias *S. aureus*. Incubação a 37 °C, durante 0; 7; 14; 21; 28; 35 e 42 dias, em meio de cultura *Ágar Baird-Parker*. .... 54
- FIGURA 5.12 - Curvas de DSC mostrando a temperatura de transição vítrea, temperatura de cristalização e temperatura de fusão das fibras de PLA e das blendas PLA/PEG após 0; 7; 14; 21; 28; 35 e 42 dias de incubação com as bactérias *S. aureus*. .... 56
- FIGURA 5.13 - Termograma das mantas de PLA e da blenda PLA/PEG 80:20 após a incubação com bactéria. (A,C) Curvas TGA relacionando perda de massa em função da temperatura e (B,D) curvas DTG relacionando a primeira derivada da variação de massa em função da temperatura. Atmosfera: ar sintético e taxa de aquecimento: 10 °C/minuto. .... 59
- FIGURA 5.14 - Espectro de infravermelho em modo de reflectância total atenuada – (ATR) das fibras de PLA e das blendas PLA/PEG após 7; 14; 21; 28; 35 e 42 dias de incubação com as bactérias *S. aureus*. .... 61
- FIGURA 5.15 - Espectro de infravermelho em modo de reflectância total atenuada – (ATR) das fibras de PLA e das blendas PLA/PEG na região de 4000 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao grupamento químico OH, após 7; 14; 21; 28; 35 e 42 dias de incubação com as bactérias *S. aureus*. .... 61
- FIGURA 5.16 - Avaliação da citotoxicidade celular por meio do teste da dosagem da enzima citoplasmática LDH após 1, 7 e 15 dias de cultura. Controle negativo; Controle positivo; (G1) PLA; (G2) 99/1; (G3) 95/5; (G4) 90/10; (G5) 80/20. Asterisco indica diferença estatística ( $P < 0.05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. .... 63
- FIGURA 5.17 - Avaliação da viabilidade celular por meio do teste de MTT. Grupo controle; (G1) PLA; (G2) 99/1; (G3) 95/5; (G4) 90/10; (G5) 80/20. Asterisco indica diferença estatística ( $P < 0.05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's. .... 65
- FIGURA 5.18 - Micrografias obtidas por MEV das fibras poliméricas após 24 horas de cultura com as células dendríticas imaturas. (A) PLA; (B) 99:1; (C) 95:5; (D) 90:10 e (E) 80:20. As inserções mostram as interações das DCs com as fibras poliméricas por meio da extensão celular. .... 67
- FIGURA 5.19 - Micrografias obtidas com microscopia de fluorescência mostrando a distribuição dos microfilamentos de actina das células dendríticas em contato com as fibras poliméricas. As DCs foram cultivadas nas fibras durante 24 horas, fixadas e marcadas com faloidina, para corar a actina e

Hoechst para corar o núcleo. A inserção mostra os filamentos de actina nos locais de contato entre células e as fibras (indicado pelas setas)..... 69

FIGURA 5.20 - Micrografias obtidas com microscopia de fluorescência mostrando a distribuição de vinculina das células dendríticas em contato com as fibras poliméricas. As DCs foram cultivadas nas fibras durante 24 horas, fixadas e marcadas com anticorpo anti-vinculina, para corar a vinculina. A inserção mostra os filamentos nos locais de contato entre células e as fibras (indicado pelas setas)..... 70

FIGURA 5.21 - Micrografias obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando a motilidade das células dendríticas nas fibras poliméricas produzidas por meio da técnica de SBS (A) PLA; (B) 99: 1; (C) 95: 5; (D) 90:10 e (E) 80:20. As DCs foram cultivadas nas fibras poliméricas durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em meio de cultura. As imagens foram adquiridas a cada 7 segundos. Escala 10 µm. .... 72

FIGURA 5.22 - Histograma representativo dos resultados obtidos por meio da citometria de fluxo da expressão das moléculas co-estimuladoras, CD40, CD80, CD86 e da molécula MHC classe II. Foram realizados três experimentos independentes e, cada experimento, foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram semelhantes em todos os experimentos. Os histogramas preenchidos em cinza representam as amostras não marcadas, os histogramas vermelhos representam as DCs maduras, estimuladas com LPS, (grupo controle positivo), os histogramas em preto representam as DC imaturas (grupo controle negativo) e os azuis são as DCs cultivadas com as fibras poliméricas..... 75

FIGURA 5.23 - Média geométrica da intensidade de fluorescência (MIF) da análise de citometria de fluxo das moléculas co-estimulatórias e do MHC de classe II das DCs tratadas com fibras poliméricas. O controle negativo foi utilizado para normalização (linha cinza). A linha no meio da caixa indica a mediana, o topo da caixa indica o 75° quartil, enquanto o fundo da caixa indica o 25° quartil. Os *whiskers* representam o percentil 10 (inferior) e 90 (superior), respectivamente. Asteriscos indicam o aumento significativo na expressão dos marcadores de superfície ( $p < 0,05$ )...... 76

FIGURA 5.24 - Análise da expressão das citocinas liberadas pelas DCs em resposta as fibras poliméricas. (A) Gel de agarose da RT-PCR representativo que mostra a expressão de IL-6, IL-10, IL-12p40, RANTES, IL-1b e TNFa das DCs incubadas com fibras poliméricas. O gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi empregado como controle endógeno na análise. O controle negativo representa as DCs sem tratamento (iDCs), enquanto o controle positivo representa as DCs tratadas com LPS (mDCs). (B) Quantificação da expressão de citoquinas foi realizada três RT-PCR independentes. Os valores foram normalizados para os níveis de expressão de GAPDH. Os asteriscos (\*\*\*) indicam  $p < 0,0001$  e o (ns): indica não significativo. .... 78

## RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS POR FIAÇÃO POR SOPRO EM SOLUÇÃO VISANDO APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDO. A Engenharia de Tecidos é hoje essencial para o desenvolvimento de materiais e técnicas para aplicações em medicina, tais como os implantes de dispositivos biomédicos, órgãos artificiais, cicatrização e regeneração de pele. O sucesso dessas aplicações depende do desenvolvimento de biomateriais, acompanhado do estudo da interação biomaterial/células animais. Neste trabalho, mantas nanoestruturadas poliméricas foram desenvolvidas com a técnica de fiação por sopro em solução (SBS). As mantas produzidas foram caracterizadas, objetivando principalmente o conhecimento de suas propriedades físico-químicas e sua avaliação como biomaterial. Especificamente, foram produzidas, mantas compostas por fibras de poli(ácido láctico), PLA, e das blendas PLA/polietilenoglicol (PEG). A dissolução do PEG das mantas nanoestruturadas poliméricas PLA/PEG foram avaliados em solução tampão fosfato-salino (PBS) e meio de cultura celular. Também foi avaliado a biodegradação das mantas nanoestruturadas poliméricas por plaqueamento em ágar, o qual foi realizado por meio da inoculação da bactéria *Staphylococcus aureus* no material. Os resultados da exposição das mantas em *phosphate buffer solution* (PBS) e meio de cultura celular demonstraram que após 12 horas de exposição uma fração do PEG, sobre a superfície da fibra, foi dissolvida, possivelmente devido à sua solubilidade na água, o que poderá ser utilizado para ajustar as taxas de degradação. Os resultados obtidos após a biodegradação permitiram observar a degradação em função do tempo de incubação das fibras poliméricas por meio da ação das bactérias *S. aureus*. A avaliação da citotoxicidade das células-tronco mesenquimais (CTM), cultivadas nas mantas nanoestruturadas poliméricas, foi determinada por meio da liberação de lactato desidrogenase (LDH) e por meio do ensaio de MTT (Abreviação do corante

brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium). O ensaio de liberação de LDH no meio de cultura demonstrou que os *scaffolds* não foram citotóxicos. Foi analisada a resposta da interação das células dendríticas imaturas (iDCs) com as mantas. Os resultados mostraram que as células dendríticas interagiram e, além disso, moveram-se de ao longo das fibras. Após o contato com os biomateriais, as células dendríticas (DCs) mostraram que os níveis de moléculas co-estimuladoras e o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II foram semelhantes ao grupo controle de DCs imaturas. As DCs mantiveram o fenótipo característico de células imaturas, que é caracterizado pela baixa ou ausente expressão de marcadores de superfície de ativação e da secreção de citocinas. Dessa forma, as fibras PLA e as blendas PLA/PEG não provocaram a maturação das DCs. As fibras de PLA e as blendas de PLA/PEG por não apresentarem citotoxicidade e não induzirem a maturação das células dendríticas, e portanto não apresentaram indicativos de reações inflamatórias, tornam-se particularmente interessantes para aplicação na Engenharia de Tecidos.

## ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLYMERIC NANOFIBER BY SOLUTION BLOW SPINNING FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATION. Tissue engineering is now essential for medical applications, such as in implants for biomedical devices, artificial organs, healing and skin regeneration. The success of these applications depends on the development of biomaterials, which should be accompanied by the study of biomaterial/cell interactions. In this work, nanostructured polymer mats were developed with a solution blow spinning technique (SBS). Polymers mats were characterized aiming the knowledge of their physicochemical properties as well as the processing effects and their effects in the biological response. Specifically, mats composed of poly(lactic acid) (PLA) fibers and PLA/polyethyleneglycol (PEG) blends were produced in the ratio of PLA/PEG 99:1, 95:5, 90:10 and 80:20 (m/m). PEG dissolution of the PLA/PEG polymer mats was evaluated with phosphate buffered saline (PBS) and cell culture medium. Also, the biodegradation of polymer mats was evaluated by culture in agar, which was performed by inoculating the *Staphylococcus aureus* bacteria on the fibers. The results of the polymer mats with PBS and cell culture medium demonstrated that after 12 hours of exposure a portion of PEG on the fiber surface was dissolved, probably due to PEG solubility in water, that can be used to adjust the polymeric fibers degradation rates. The biodegradation results allowed observing the degradation in function of the polymer fibers incubation time by means of the action of *S. aureus* bacteria. Cytotoxicity of mesenchymal stem cells (CTM) seeded on polymer mats were determined by the LDH release medium and MTT (Abbreviation for the dye compound 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromidefor) assay. The release of LDH into the culture medium and MTT assay demonstrated that the scaffolds are not cytotoxic. The response of immature dendritic cells (iDCs) interaction with polymers mats was analyzed. The results

showed that dendritic cells physically interacted and furthermore moved along nanofibers. After contact with biomaterials DCs cells showed the costimulatory molecules levels and MHC class II were similar to the immature DCs control group. DCs retained an immature phenotype, which is characterized by low or absent expression of up regulation of surface marker and cytokines. Thus, PLA fibers and the PLA/PEG blends do not stimulated DCs maturation. PLA nanofibers and PLA/PEG blends are not cytotoxic and do not induce dendritic cell maturation then, they become interesting for tissue engineering application.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 - INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....   | 3  |
| 2.1 - Engenharia de Tecidos.....   | 3  |
| 2.2 - Fiação por sopro em solução (SBS) .....  | 4  |
| 2.3 - Blendas Poliméricas .....  | 6  |
| 2.4 - Polímeros biodegradáveis.....  | 7  |
| 2.5 - Degradação do PLA.....   | 8  |
| 2.6 - Biocompatibilidade.....  | 9  |
| 2.7 - Adesão e motilidade celular .....  | 11 |
| 3 - OBJETIVOS.....   | 13 |
| 3.1 - Objetivos.....   | 13 |
| 3.2 - Objetivos específicos .....  | 13 |
| 4 - MATERIAIS E MÉTODOS .....  | 14 |
| 4.1 - Materiais .....  | 15 |
| 4.2 - Produção das mantas nanoestruturadas poliméricas .....   | 15 |
| 4.3 - Fiação por sopro em solução (SBS) .....  | 16 |
| 4.4 - Esterilização das mantas nanoestruturadas poliméricas .....  | 17 |
| 4.5 - Técnicas de caracterização das mantas nanoestruturadas poliméricas ....  | 17 |
| 4.5.1 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....   | 17 |
| 4.5.2 - Propriedades reológicas das soluções poliméricas .....   | 19 |
| 4.5.3 - Análise Térmica - Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....   | 19 |
| 4.5.4 - Análise Térmica - Termogravimetria (TGA) .....   | 20 |
| 4.5.5 - Molhabilidade .....  | 20 |
| 4.5.6 - Espectroscopia por reflectância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) .....                       | 21 |
| 4.6 - Estudos de dissolução do PEG nas mantas das blendas poliméricas .....  | 21 |
| 4.6.1 - Dissolução do PEG nas blendas poliméricas .....  | 21 |
| 4.7 - Estudos da degradação das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA puro e das blendas poliméricas por meio de micro-organismo..... | 23 |
| 4.7.1 - Preparo da suspensão da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> .....  | 23 |
| 4.7.2 - Cultivo das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> nas mantas nanoestruturadas poliméricas .....                                   | 24 |
| 4.8 - Biocompatibilidade <i>in vitro</i> das mantas nanoestruturadas poliméricas ....  | 24 |
| 4.8.1 - Citotoxicidade das Células-tronco Mesenquimais (CTMs) .....  | 24 |
| 4.8.1.1 - Obtenção das CTMs.....   | 24 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 4.8.1.2 - | Cultivo celular das CTMs .....  | 25 |
| 4.8.1.3 - | Testes colorimétricos de citotoxicidade e viabilidade celular (LDH e MTT) 26  |    |
| 4.8.2 -   | Células dendríticas (DCs).....  | 27 |
| 4.8.2.1 - | Geração e maturação das células dendríticas.....  | 27 |
| 4.8.2.2 - | Determinação da expressão de marcadores de superfície das células dendríticas .....   | 28 |
| 4.8.2.3 - | Análise de citocinas pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) .....   | 29 |
| 4.8.2.4 - | Imunofluorescência.....   | 31 |
| 4.8.2.5 - | Microscopia de série temporal (time-lapse).....   | 32 |
| 4.9 -     | Análises estatísticas .....   | 32 |
| 5 -       | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....  | 34 |
| 5.1 -     | Caracterização morfológica das fibras poliméricas obtidas com a técnica de fiação por sopro em solução .....                              | 34 |
| 5.2 -     | Avaliação da presença do PEG nas mantas de PLA/PEG.....   | 40 |
| 5.3 -     | Degradação das mantas de fibras poliméricas.....  | 53 |
| 5.3.1 -   | Estudo da degradação por meio da ação das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> (biodegradação) .....                                    | 53 |
| 5.4 -     | Estudo da citotoxicidade <i>in vitro</i> das fibras poliméricas.....  | 62 |
| 5.4.1 -   | Avaliação da citotoxicidade celular das células-tronco mesenquimais após a exposição das fibras poliméricas.....                          | 62 |
| 5.4.2 -   | Avaliação da viabilidade celular das células-tronco mesenquimais após a exposição das fibras poliméricas.....                             | 64 |
| 5.5 -     | Análise da resposta pré-inflamatória <i>in vitro</i> .....  | 66 |
| 5.5.1 -   | Interação das células dendríticas com as fibras poliméricas .....   | 66 |
| 5.5.2 -   | Motilidade das células dendríticas nas fibras poliméricas .....   | 71 |
| 5.5.3 -   | Reconhecimento do biomaterial por meio da determinação de moléculas co-estimulatórias presentes na membrana das células dendríticas ..... | 73 |
| 5.5.4 -   | Análise da produção de citocinas inflamatórias em resposta as fibras poliméricas 77   |    |
| 6 -       | CONCLUSÕES.....   | 80 |
|           | REFERÊNCIAS .....   | 82 |



## 1 - INTRODUÇÃO

Lesões em tecidos e/ou órgãos são um dos problemas mais frequentes enfrentados na medicina, sendo considerados uma preocupação mundial.<sup>1</sup> Dentre as principais enfermidades, podemos citar as degenerações crônicas como úlceras por pressão, venosas e diabéticas, traumatismos, infecções, doenças autoimunes e feridas complexas. As queimaduras também causam lesões teciduais e são consideradas um grande problema na saúde pública. No Brasil, ocorre em torno de 1.000.000 acidentes resultando em queimaduras por ano.<sup>2</sup> Em termos de dispêndios públicos, o Brasil financia 92% dos procedimentos cirúrgicos e é o segundo país apresentando maior número de transplantes, sendo apenas superado pelos Estados Unidos.<sup>3</sup>

Adicionalmente, o transplante de tecidos e órgãos são alternativas terapêuticas no tratamento de diversas doenças, determinando melhoria na qualidade e na perspectiva de vida. No entanto, estas opções estão associadas a limitações incluindo inflamação, baixa integração com o hospedeiro e potencial rejeição do implante. Assim, a Engenharia de Tecidos foi desenvolvida com o objetivo de superar tais limitações e de encontrar terapias revolucionárias capazes de sanar as lesões do tecido por meio do reparo ou criação de tecidos ou órgãos visando a restauração das funções prejudicadas.<sup>4</sup>

Nesse contexto, biomateriais poliméricos são uma das alternativas amplamente estudadas atualmente. Nos últimos 10 anos, o progresso tecnológico permitiu o desenvolvimento de dispositivos para liberação controlada de fármacos,<sup>5</sup> válvulas cardíacas<sup>6</sup> e suportes para o crescimento celular (do inglês, *scaffolds*), para a reparação de tecidos, como pele, cartilagem e ossos.<sup>7,8</sup> Mesmo com os avanços nos últimos 30 anos da indústria farmacêutica e as novas descobertas na medicina, como por exemplo, o conhecimento do comportamento celular e a patologia das lesões crônicas, ainda existem muitos desafios no que concerne o desenvolvimento de novas alternativas como substitutos de tecidos.

Dessa forma, esta tese de doutorado, se propôs a desenvolver um material nanoestruturado, como alternativa aos transplantes de pele. Para tanto, mantas constituídas de fibras poliméricas de poli(ácido lático) (PLA) e mantas de blendas de PLA/Polietilenoglicol (PEG) foram produzidas por meio da técnica de fiação por sopro em solução (do inglês, *solution blow spinning* - SBS). O tempo de degradação de polímeros biocompatíveis é um dos principais critérios de seleção para aplicações biomédicas, dessa forma, neste trabalho, também foram avaliados a dissolução do PEG das mantas nanoestruturadas poliméricas em solução tampão fosfato-salino e meio de cultura celular e a biodegradação das mantas de PLA e da blenda PLA/PEG. Para a validação dos novos dispositivos na área da saúde é imprescindível a realização de ensaios *in vitro* consistentes que servirão para a posterior fase de ensaios *in vivo* em modelo animal. Portanto, nesta tese de doutorado, a avaliação da viabilidade e citotoxicidade de células-tronco mesenquimais (CTM) e a resposta da interação das células do sistema imunológico, com os novos *scaffolds* também foram estudados.

## 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1 - Engenharia de Tecidos

O princípio da Engenharia de Tecidos é restaurar e aprimorar as funções dos tecidos, por meio do desenvolvimento de novos materiais biocompatíveis.<sup>9</sup> A utilização de células alvo, o fornecimento de fatores bioquímicos e/ou estímulos para promover o crescimento celular e o uso de matrizes para fornecer suporte celular, são as três principais abordagens da engenharia regenerativa de tecidos.<sup>9-11</sup>

Dependendo da aplicação biomédica, é essencial que os suportes apresentem dimensões na escala nanométrica,<sup>12</sup> pois a matriz extracelular (MEC), composta por um tecido natural com diversos tipos de células, possui características topográficas que variam de nanômetros a micrômetros. Exemplos são as proteínas da MEC que interagem com as células, controlando seu comportamento, estão na escala submicrométrica. A fibrila de colágeno têm diâmetro de 20 a 200 nm, estruturando-se hierarquicamente em fibras e essa arquitetura de fibrila/fibra em escala nano e micro determina a polaridade celular e promove migração ao longo das fibrilas. A orientação da migração celular é essencial para vários fatores fisiológicos e processos patológicos, incluindo embriogênese, cicatrização de feridas e metástases.<sup>13</sup> As características topográficas dos materiais que interagem com as células podem, portanto, serem importantes no controle dos processos celulares, inclusive de sinalização.<sup>14,15</sup>

Neste contexto, a fiação por sopro em solução pode ser considerada como uma tecnologia versátil para a produção de suportes tridimensionais compostos por nanofibras para o crescimento celular.<sup>16,17</sup> As nanofibras obtidas são contínuas, apresentam alta relação superfície/volume, alta porosidade, distribuição de tamanho ajustável e fornece um substrato apropriado para a fixação celular e o transporte de nutrientes.<sup>18</sup> Além disso, foi reportado que as

estruturas compostas por nanofibras imitam a MEC e são capazes de estimular a organização *in vivo* e a morfogênese das células em cultura.<sup>19</sup>

## 2.2 - Fiação por sopro em solução (SBS)

Há cerca de 8 anos, a técnica de fiação por sopro em solução foi desenvolvida por Medeiros et al.<sup>20</sup> e teve grande repercussão no meio acadêmico. O destaque foi o ineditismo do sistema por meio da combinação de elementos das técnicas de eletrofiação e “*melt blowing*” para a produção de fibras poliméricas apresentando alta taxa de produtividade em relação a técnica de eletrofiação. É uma técnica segura, de fácil manuseio, e o grande atrativo é a possibilidade da deposição das fibras sobre qualquer tipo de superfície.<sup>21,22</sup>

A técnica de SBS é composta basicamente por canais concêntricos com geometria adequada que permite a produção de nanofibras poliméricas de modo análogo à eletrofiação, sendo que, na fiação por sopro em solução, as forças elétricas são substituídas pelas forças aerodinâmicas por meio de um gás pressurizado. A solução polimérica é injetada através de um canal interno e um jato de ar por um canal externo, o ar pode ser nitrogênio, argônio ou simplesmente ar comprimido e é controlado por um regulador de pressão. Uma bomba injetora controla a taxa de alimentação da solução polimérica, que encontra o jato de ar e é arrastada até o coletor com velocidade de rotação controlável. Sendo assim, a solução polimérica é forçada através do tubo interno em uma taxa constante e conhecida, resultando na formação de uma gota em sua ponta, a qual é estirada pelo jato de ar oriundo do tubo externo. Quando a tensão superficial do líquido é superada, a gota é deformada até adquirir o formato de um cone e quando a pressão de ar crítica é excedida, o jato é acelerado até o coletor. Nesse trajeto, ocorre uma rápida evaporação do solvente formando fibras poliméricas que se depositam umas sobre as outras.

Muitos parâmetros podem influenciar a obtenção das nanofibras a partir de soluções poliméricas.<sup>23</sup> Podemos citar as propriedades da solução

(viscosidade, elasticidade do polímero e tempo de evaporação do solvente), condições do ambiente (umidade, temperatura) e variáveis do processo (distância da agulha (bocal interno) ao coletor, taxa de alimentação da solução e velocidade do ar).

Alguns parâmetros devem ser levados em conta no controle de qualidade das fibras. Entre as propriedades mais importantes para a utilização das nanofibras poliméricas para a medicina regenerativa, podemos citar a elevada área superficial, boa elasticidade e alta porosidade. Além disso, com essa técnica, é possível processar materiais naturais e sintéticos, blendas e compósitos.

De fato, a combinação de materiais pode melhorar biocompatibilidade, biodegradabilidade e resistência mecânica. Podem-se usar biomateriais naturais, que se assemelham à matriz extracelular das células, combinados com materiais sintéticos que provêm reforço e resistência mecânica. A combinação de dois materiais na mesma estrutura pode conferir propriedades únicas e úteis para aplicações biomédicas.<sup>24,25</sup> A mistura entre polímeros é uma rota conveniente para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, capaz de produzir materiais com propriedades superiores às daquelas dos polímeros que o constituem. Esse método é mais barato e consome um tempo menor para a criação de materiais poliméricos com novas propriedades do que o desenvolvimento de novos polímeros e/ou novas rotas de polimerização.

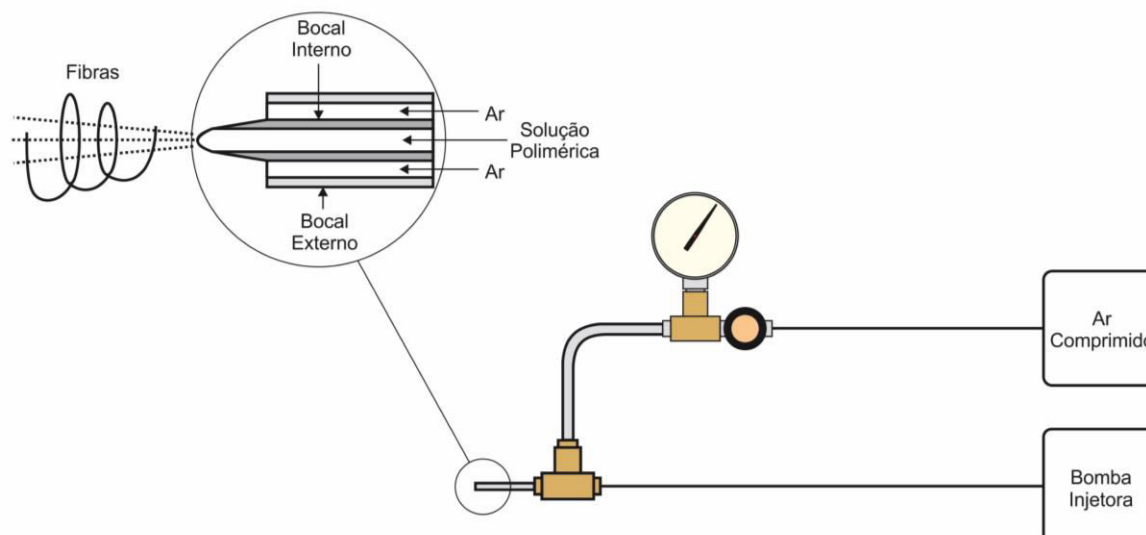


FIGURA 2.1 - Representação do aparato experimental empregado na fiação por sopro em solução .

### 2.3 - Blendas Poliméricas

Blendas poliméricas são misturas físicas ou mecânicas de diferentes polímeros com ligações não covalentes entre seus componentes poliméricos.<sup>26</sup> Existe um grande interesse pelas blendas poliméricas, devido ao seu crescente uso industrial e suas propriedades.<sup>27</sup> São importantes, devido à modificação de propriedades mecânicas, em relação aos polímeros originais, à melhoria da resistência ao impacto a baixas temperaturas, à resistência ao aquecimento e principalmente a sua processabilidade.<sup>28</sup> A blenda é caracterizada pelas combinações dos componentes dos polímeros, podendo ocorrer um tipo de sinergismo nas propriedades dos materiais obtidos. A mútua interação dos componentes poliméricos tem influência na resistência térmica da blenda e no seu potencial de deterioração.<sup>27,29</sup> A mistura de polímeros biodegradáveis pode levar a uma redução de custos dos materiais, modificação de propriedades e maiores possibilidades para que ocorra a degradação.<sup>30</sup> A produção de blendas miscíveis inclui a possibilidade de conseguir morfologicamente uma única fase dos componentes da blenda, revelando interações intermoleculares entre os dois polímeros.<sup>30</sup> No entanto, quando se forma uma blenda miscível com um

polímero não biodegradável, pode ocorrer redução ou até inibição de degradação do componente biodegradável.<sup>30</sup> A produção de blendas com diferentes polímeros (degradáveis ou não) é provavelmente o método mais amplamente utilizado.<sup>31,32</sup>

Uma vantagem adicional das blendas é que suas propriedades podem ser adaptadas por meio da combinação dos componentes poliméricos e da mudança da composição da blenda.<sup>33,34</sup> O processamento e o estudo das blendas são temas importantes da ciência dos polímeros.

## 2.4 - Polímeros biodegradáveis

Muitos dos materiais utilizados na Engenharia de Tecidos, como materiais à base de colágeno e o grupo de polímeros poliláctico, poliglicol e policaprolactona, são atraentes inicialmente porque tem aprovação das agências regulatória.

Como exemplo de um polímero pioneiro em mercados emergentes de plásticos biodegradáveis temos o poli(ácido láctico) (PLA), um poliéster alifático, biocompatível e biodegradável, o qual pode ser obtido por fermentação bacteriana de glicose extraída do milho.<sup>35</sup> Devido a facilidade de processamento, o PLA é um material termoplástico com uma vasta gama de aplicações, desde médicas<sup>36</sup> e farmacêuticas<sup>37</sup> até embalagens alimentícias.<sup>38</sup> O PLA degrada por meio da hidrólise dos grupos de ésteres e a taxa de degradação depende da cristalinidade, massa molar, morfologia, difusão de água e a estereoisomeria.<sup>39</sup> A degradação é um dos maiores critérios de seleção para aplicações biomédicas.<sup>40</sup> A lenta taxa de degradação gera um longo período de vida *in vivo*, que pode ser de até sete anos.<sup>41</sup> O PLA é relativamente hidrofóbico, alguns trabalhos reportam que sua hidrofobicidade têm uma maior tendência para adsorver proteínas, resultando em baixa afinidade celular o que pode provocar, em alguns casos, resposta inflamatória no local implantado.<sup>41,42</sup>

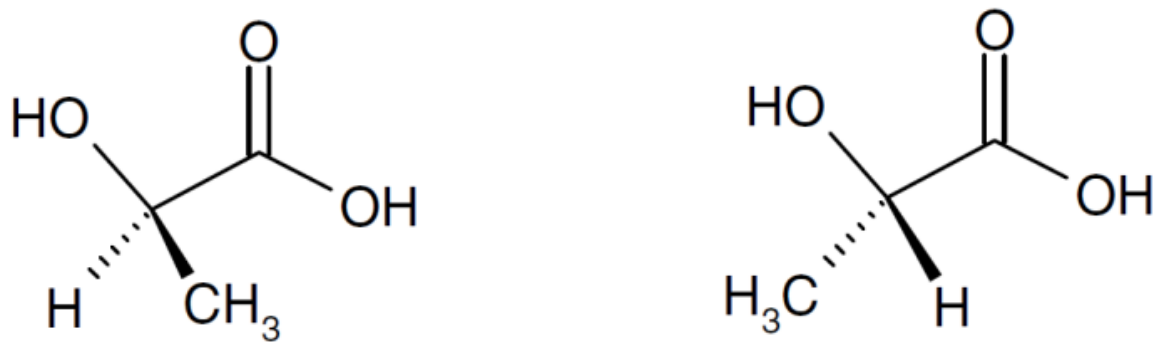


FIGURA 2.2 - Estrutura química do a) L-ácido láctico e b) D-ácido láctico<sup>43</sup>

## 2.5 - Degradação do PLA

O processo de degradação do PLA é dependente das suas propriedades, como a estrutura molecular (massa molar, estereoisomeria); cristalinidade; temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ); temperatura de fusão ( $T_m$ ); fatores ambientais (umidade, temperatura) e espécies catalíticas (pH e a presença de enzimas ou micro-organismos).<sup>44</sup> PLA com menor massa molar ( $M_w < 100.000$  g/mol) normalmente são frágeis e opacos, enquanto moléculas de PLA maiores, são mais resistentes, mais transparentes e menos susceptíveis à degradação.<sup>45</sup> No PLA semicristalino, a degradação ocorre primeiramente nas regiões amorfas e em seguida nas regiões cristalinas. A medida que a água difunde na estrutura do PLA, as regiões cristalinas hidrolisam mais lentamente quando comparadas as regiões amorfas,<sup>46-48</sup> dessa forma, a proporção das regiões cristalinas aumenta e conseqüentemente a velocidade de degradação diminui.<sup>49,50</sup> A velocidade de degradação do PLA é aumentada acima da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ , 55 – 62 °C), pois na medida em que as cadeias do polímero tornam-se mais flexíveis, a absorção de água aumenta, acelerando a hidrólise.<sup>46,51</sup> Assim, em temperaturas iguais ou superiores a  $T_g$  do PLA e com elevada humidade relativa (> 60%), a hidrólise é acelerada.<sup>45,52-54</sup>



A biodegradação do PLA é geralmente vista como sendo um mecanismo de dois passos envolvendo primeiro fatores abióticos e depois fatores bióticos.<sup>55,56</sup> O processo abiótico, que é a hidrólise química na presença de água em temperaturas elevadas, é seguido pela degradação biótica, na qual os micro-organismos decompõem produtos de decomposição de polímeros que geram dióxido de carbono, água e biomassa sob condições aeróbicas e metano, hidrocarbonetos e biomassa em condições anaeróbicas.<sup>57,58</sup> Embora alguns estudos tenham relatado que os micro-organismos não melhoram a degradação do PLA,<sup>53</sup> outros estudos sugerem que existem enzimas microbianas que são capazes de degradar diretamente PLA de alta massa molar.<sup>59-61</sup>

## 2.6 - Biocompatibilidade

Para a utilização dos biomateriais nas áreas médica e veterinária, é necessário o entendimento dos mecanismos de interação com os sistemas biológicos. Durante o desenvolvimento de um novo material, deve existir a preocupação com possíveis efeitos biológicos desfavoráveis que podem ocorrer devido a composição do material.<sup>62</sup>

Os estudos de biocompatibilidade de um biomaterial são baseados em experimentos *in vitro* e *in vivo*, com o intuito de verificar os efeitos locais sistêmicos do material nas células e, assim como, nos tecidos. Os programas de pesquisas envolvendo a avaliação de biomateriais devem incluir uma série de testes *in vitro* anteriormente aos testes *in vivo*, segundo *A common European approach to the regulatory testing of Manufactured Nanomaterials* (NANoREG) . Nesse aspecto, estudos envolvendo a biocompatibilidade são fundamentais para a utilização segura dessas novas nanoestruturas. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é considerado o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de diversos materiais, onde vários métodos foram padronizados utilizando culturas celulares.<sup>63,64</sup> Estes testes consistem em colocar

o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células obtida de mamíferos, verificando-se as alterações celulares.

Os testes de citotoxicidade são baseados na determinação da porcentagem de células viáveis, geralmente usando linhas celulares como fibroblastos de ratos. Esses testes são simples e altamente reprodutíveis, mas não avaliam algumas funções celulares que materiais não tóxicos podem influenciar, como por exemplo, as reações inflamatórias.

Os materiais podem alterar severamente a homeostase dos principais componentes do sistema imunológico.<sup>65,66</sup> Zhang et al.<sup>67</sup> desenvolveram *scaffolds* de nanofibras compostos por óxido de grafeno (GO) incorporado em poli(ácido láctico) (PLA) usando a técnica de *eletrospinning* e avaliaram a viabilidade celular e proliferação. Embora as fibras tenham apresentado compatibilidade, esses testes não levaram em consideração a influência nas principais funções celulares. Outros estudos<sup>66-69</sup> mostraram o efeito dos biomateriais quando expostos a células do sistema imune inato.

As células dendríticas (DCs) atraíram a atenção de pesquisadores de diversas áreas, pois desempenham um papel fundamental na iniciação e manutenção da resposta imune. Shokouhi et al.<sup>66</sup> reportaram os mecanismos das DCs após o reconhecimento de filmes de materiais poliméricos. As DCs reconheceram os biomateriais por meio dos mesmos mecanismos que reconhecem agentes patogênicos.

Poliésteres, como o poli(ácido láctico) (PLA), são atualmente utilizados em sistemas de administração de vacinas.<sup>70,71</sup> As células dendríticas reconhecem o PLA como um antígeno e reagem aumentando da expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) e das moléculas co-estimulatórias, CD40, CD80, CD86 (CD - grupamento de diferenciação) e secreta citocinas pró-inflamatórias interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ).<sup>72,73</sup> No entanto, um estudo mostrou que as DCs podem fagocitar micropartículas de PLA e não afetar as respostas celulares.<sup>74</sup> Assim, as DCs

apresentam diferentes respostas aos filmes de PLA ou micropartículas, sendo a compreensão e o controle da interação célula/biomaterial essenciais para o desenvolvimento seguro e efetivo dos biomateriais. A geometria do biomaterial pode ser responsável pelas diferentes respostas e poderá ser explorada para monitorar a resposta biológica dessas células em locais de implante. Portanto, é de grande importância caracterizar as interações celulares com *scaffolds* 3D para melhor compreender o comportamento dessas células.<sup>75</sup>

## 2.7 - Adesão e motilidade celular

A adesão e a motilidade celular são fundamentais para a Engenharia de Tecidos.<sup>76,77</sup> A adesão celular é relacionada a primeira fase de interação entre a célula e o suporte de ancoragem. Esta primeira etapa irá influenciar nas respostas subsequentes das células, por exemplo, na capacidade das células se proliferarem e diferenciarem.

A adesão celular a um biomaterial está relacionada a dois mecanismos, a anexação e a adesão. A anexação celular é considerada o primeiro contato das células aos biomateriais, essa fase ocorre rapidamente, e é realizada por meio de ligações físico-químicas entre as células e o biomaterial, por forças iônicas e forças de van der Waals.<sup>78</sup> A adesão celular ocorre após a etapa de anexação e envolve diversas moléculas biológicas como proteínas de matriz extracelular, proteínas de membrana celular e do citoesqueleto.<sup>79</sup> Essas proteínas interagem conjuntamente para induzir a transdução do sinal, promovendo a ação de fatores de transcrição e, conseqüentemente, regulam a expressão gênica.<sup>80</sup>

Sabe-se que o processo de adesão da célula ao suporte é de grande importância para a motilidade celular.<sup>81</sup> Para que a célula se movimente, primeiramente ela deve aderir-se ao suporte para que sejam desencadeados os eventos que irão possibilitar seu movimento. A migração celular é essencial para que as células sejam capazes de realizar suas funções, por exemplo, é

fundamental para a formação dos órgãos na embriogênese, para a reparação de feridas e diferenciação celular. Uma alteração do comportamento das células pode levar a metástase tumoral.<sup>82</sup> Dessa forma, o entendimento da adesão celular nos biomateriais que estão em desenvolvimento é de grande importância.

## **3 - OBJETIVOS**

### **3.1 - Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de novas mantas tridimensionais constituídas por fibras de poli(ácido lático) (PLA) e de blendas de poli(ácido lático)/polietilenoglicol (PEG), por meio da técnica de fiação por sopro em solução, visando à aplicação em Engenharia de Tecidos.

### **3.2 - Objetivos específicos**

- Estudar sistematicamente a preparação das mantas de fibras de PLA puro e das blendas PLA/PEG, otimizando condições de processamento para formar fibras homogêneas e sem defeitos;
- Avaliar a degradação das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA e da blenda PLA/PEG por meio de micro-organismos;
- Verificar o efeito das mantas nanoestruturadas poliméricas na viabilidade celular e citotoxicidade das células-tronco mesenquimais;
- Estudar a resposta da célula do sistema imunológico após a interação com as mantas nanoestruturadas poliméricas.

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia deste trabalho foi desenvolvida parcialmente no Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) da Embrapa Instrumentação (São Carlos, SP), no Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar - São Carlos, SP), bem como no *Institute for Biomedical Engineering – Cell Biology* e juntamente com a universidade *Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen* (RWTH – Aachen, Alemanha).

A primeira etapa do trabalho visou a obtenção das mantas nanoestruturadas poliméricas. Para a produção das fibras poliméricas, foi realizado a otimização dos parâmetros do processo de fiação por sopro em solução. Este estudo foi considerado uma etapa crucial para o completo entendimento e produção com êxito das fibras poliméricas e serão reportados os resultados mais representativos. A segunda etapa abordou os estudos da interação biomaterial/células.

## 4.1 - Materiais

TABELA 1- Materiais utilizados

| <b>Materiais</b>                   | <b>Fabricante</b>                             |
|------------------------------------|---|
| Acetona                            | Vetec - Sigma-Aldrich                         |
| Ágar Baird-Parker (BP)             | Sigma-Aldrich                                 |
| Bomba injetora                     | modelo NE-1010-US, One Channel 100 lb         |
| Capilar                            | Fluran HCA F- 5500-A, Ismatec)                |
| Clorofórmio                        | Vetec - Sigma-Aldrich                         |
| Colagenase do tipo 1               | Thermo Fisher                                 |
| Compressor                         | Schulz, modelo Msv 10 VL/200-2HP de 1 estágio |
| DMEM                               | Gibco   |
| Enzima lactato desidrogenase       | Labtest                                       |
| Glutaraldeído 3%                   | Agar Scientific, Stansted, United Kingdom     |
| Hexametildisilazano                | Sigma-Aldrich                                 |
| Luria-Bertani (LB)                 | Sigma-Aldrich                                 |
| Manômetro                          | Matheson, modelo 22024-1                      |
| Penicilina                         | Invitrogen Life Technologies                  |
| Poli(ácido láctico)                | Biomater                                      |
| Polietilenoglicol (PEG)            | Sigma-Aldrich                                 |
| Solução tampão fosfato de Sorensen | Merck, Darmstadt, Germany                     |
| Seringa de vidro de 25 mL          | B-D Yale, Becton-Dickinson & Co, EUA          |
| Solução padrão McFarland 0.5       | Becton-Dickinson                              |
| Triptona de soja                   | Hexis   |
| Tripsina/EDTA                      | Gibco   |
| Triton X-100                       | Sigma-Aldrich                                 |

## 4.2 - Produção das mantas nanoestruturadas poliméricas

Foram preparadas soluções de poli(ácido láctico), 70.000 g/mol (Biomater) e das blendas de PLA/Polietilenoglicol, 8.000 g/mol (Sigma). Estas soluções foram preparadas por meio da dissolução de 12% (m/v) dos polímeros na mistura dos solventes clorofórmio:acetona 3:1 (v/v), sendo mantidos em agitação por 3 horas. Na obtenção das blendas PLA/PEG, o PEG foi adicionado em diferentes concentrações (0, 1, 5, 10 e 20% m/m), mantendo a concentração total de 12% (m/v).

### 4.3 - Fiação por sopro em solução (SBS)

As mantas nanoestruturadas poliméricas foram produzidas por meio da técnica SBS, empregando um equipamento disponível no Laboratório Nacional de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LNNA) situado na Embrapa Instrumentação em São Carlos.

Basicamente, o arranjo experimental representado na FIGURA 4.1 consistiu em um sistema injetor da solução polimérica, uma fonte de ar comprimido e um sistema para a coleta das fibras.

As soluções poliméricas foram dispostas em uma seringa de vidro de 25 mL (B–D Yale, Becton–Dickinson & Co, EUA) acoplada a um capilar resistente a solventes orgânicos (Fluran HCA F- 5500-A, Ismatec) e a um bocal com diâmetro de 0,5 mm. A vazão da solução polimérica foi mantida em 7,2  $\mu\text{L/h}$  por uma bomba injetora modelo NE-1010-US, One Channel 100 lb.

O ar foi alimentado por um compressor da marca Schulz, modelo Msv 10 VL/200-2HP de 1 estágio. A pressão do ar foi mantida a 30 psi e monitorada por meio de um manômetro da marca Matheson, modelo 22024-1. O manômetro foi conectado ao bocal externo contendo internamente um capilar com a solução polimérica. O bocal interno foi mantido a 2 mm de distância do capilar externo contendo o ar.

A distância utilizada entre o bocal concêntrico e o coletor (distância de trabalho) foi de 18 cm. O coletor foi utilizado em modo rotacional com velocidade de 180 rpm<sup>20</sup>.





FIGURA 4.1 - Imagem do sistema de fiação por sopro em solução

#### 4.4 - Esterilização das mantas nanoestruturadas poliméricas

As mantas nanoestruturadas poliméricas foram depositadas sob lamínulas de vidro circulares com 15 mm de diâmetro e, para esterilização, foram expostas à radiação ultravioleta durante 1 hora em uma câmara de fluxo laminar vertical. O tempo foi determinado por meio de estudos prévios.

#### 4.5 - Técnicas de caracterização das mantas nanoestruturadas poliméricas

##### 4.5.1 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das fibras foi observada com microscópio eletrônico de varredura (modelo DSM960 Zeiss) usando voltagem de aceleração de 10 kV e distância de trabalho de 10 mm. Para isso, as mantas coletadas foram previamente recobertas com uma fina camada de ouro com o auxílio de um metalizador (Balzer, SCD 050). Os diâmetros das fibras e a porosidade das mantas nanoestruturadas poliméricas foram mensurados com *software*

analisador de imagens *Image J* (disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij>; desenvolvido por: Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). A distribuição do diâmetro médio foi determinada a partir das micrografias obtidas, onde foram analisadas 100 fibras aleatórias.

A porosidade das mantas nanoestruturadas poliméricas foi medida a partir de três imagens representativas utilizando a ferramenta *plugin ND* no *software Image J* como descrito por Haeri e Haeri.<sup>83</sup> A porosidade foi determinada por meio dos espaços entre as fibras e expressa a fração da área total em porcentagem.

A morfologia das fibras antes e após o tratamento com as bactérias foram observadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV), nas condições apresentadas anteriormente. Após a semeadura da bactéria *Staphylococcus aureus* nas fibras poliméricas, as amostras foram fixadas com solução Karnovsky<sup>84</sup> por 2 horas e lavadas em solução tampão (PBS) (pH 7.0; Invitrogen Life Technologies). Em seguida, as bactérias foram desidratadas por 10 minutos sequencialmente nas soluções de etanol:água nas concentrações de 30, 40, 50, 70, 80, 90 e finalizando com 3 × 100% de etanol. A secagem das amostras foi realizada com hexametildisilazano (Sigma-Aldrich) durante 1 hora em temperatura ambiente.

A microscopia eletrônica de varredura das células dendríticas após 24 e 48 horas em cultura com as fibras poliméricas foram realizadas como descrito por Mohanty et al. e Gamper et al.<sup>85,86</sup> Primeiramente, as fibras poliméricas cultivadas com as células dendríticas e as células B16F1 foram fixadas em glutaraldeído 3% (Agar Scientific, Stansted, United Kingdom) em solução tampão fosfato de Sorensen (Merck, Darmstadt, Germany) durante 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as fibras contendo as células foram submetidas a lavagem em solução tampão fosfato de Sorensen durante 15 min e então foram desidratadas em etanol:água (30, 50, 70 e 95%) durante 10 min em cada solução seguido de uma incubação final em etanol a 100% durante 30 min.

A secagem das amostras foi realizada em hexametildisilazano (Sigma-Aldrich, Germany) durante 20 minutos em temperatura ambiente. As fibras poliméricas contendo as células foram revestidas com uma camada de ouro de 10 nm por meio do metalizador (Sputter Coater EM SCD500, Leica, Wetzlar, Germany). As amostras foram analisadas por meio do microscópio eletrônico de varredura (ESEM XL30 FEG, FEI, Eindhoven, Netherland) utilizando uma voltagem de aceleração de 5 kV e a uma distância de trabalho de 8 mm. As micrografias foram processadas com Photoshop 13.0 (Adobe Systems, Inc., EUA).

#### **4.5.2 - Propriedades reológicas das soluções poliméricas**

As propriedades reológicas das soluções poliméricas de PLA foram obtidas utilizando um reômetro (TA Instruments, modelo AR2000) com geometria de cilindros coaxiais (28 e 30 mm de diâmetro e 42 mm de altura). As medidas foram realizadas em modo rotacional a 25 °C variando a taxa de cisalhamento entre 1 e 100 s<sup>-1</sup>.

#### **4.5.3 - Análise Térmica - Calorimetria diferencial exploratória (DSC)**

As análises de DSC foram realizadas com o equipamento Q100 TA Instruments em atmosfera de nitrogênio. As amostras (~ 6 mg) foram colocadas em panelas herméticas de platina, as quais foram aquecidas de 0 a 180 °C a uma taxa de 10 °C/min (primeiro aquecimento) e mantidas a esta temperatura por 3 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas até -10 °C a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup> e mantidas a esta temperatura por 3 min. Após o resfriamento, as amostras foram reaquecidas até 180 °C a uma taxa de 10 °C/min (segundo aquecimento). As análises de DSC foram realizadas em triplicata. O grau de cristalinidade ( $\chi_c$ )<sup>87,88,89</sup> de cada amostra foi calculado segundo a Equação (1):

$$\chi_c, (\%) = [(\Delta H_m^{PLA} - \Delta H_{cc}^{PLA}) / (\Delta H_m^{PLA,0} \times W^{PLA})] \times 100 \quad (1)$$

onde  $\Delta H_m^{PLA}$  é a entalpia de fusão da amostra,  $\Delta H_{cc}^{PLA}$  é a entalpia de cristalização a frio e  $\Delta H_m^{PLA,0}$  é a entalpia de fusão baseada no PLA 100 % cristalino (93 J/g)<sup>90</sup> e  $W^{PLA}$  é a porcentagem do PLA nas mantas nanoestruturadas poliméricas.

#### 4.5.4 - Análise Térmica - Termogravimetria (TGA)

As amostras foram armazenadas em dessecador durante 48 horas antes da análise. A termogravimetria (TGA) das mantas nanoestruturadas poliméricas foram realizadas em um equipamento Q500 TA Instruments em atmosfera de nitrogênio a um fluxo de 60 mL/cm. As amostras foram aquecidas a partir da temperatura ambiente até 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/minuto.

#### 4.5.5 - Molhabilidade

Valores do ângulo de contato médio da água deionizada na superfície das fibras foram obtidos por meio do equipamento CAM 101 (KSV Instruments, Monroe, USA) equipado com uma câmera CCD modelo KGV-5000. Em cada medida uma gota de aproximadamente 2 µL de água deionizada foi gotejada sobre a superfície das membranas e as imagens coletadas automaticamente em função do tempo. A partir das imagens obtidas, foi escolhida a imagem no tempo de 5 segundos, e o ângulo de contato médio foi calculado utilizando o software (KGV-500). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e em temperatura de 25 °C e aproximadamente 53% de umidade relativa.

Para determinar a molhabilidade das fibras poliméricas após a exposição em PBS e meio de cultura celular, as fibras foram incubadas com PBS e DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C durante 24 horas. Após incubação, as fibras foram lavadas com água destilada. Após a secagem durante 24 horas o ângulo de contato foi determinado como descrito acima.

#### **4.5.6 - Espectroscopia por reflectância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)**

Os espectros de infravermelho (ATR-FTIR) foram obtidos com auxílio de um espectrômetro (Vertex 70, Bruker, Germany) operando em modo refletância, na região espectral entre 3300-600  $\text{cm}^{-1}$ . O espectrômetro foi purgado continuamente, durante toda a análise, com nitrogênio. Para todas as amostras, foram coletados um total de 128 varreduras com uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  para cada espectro.

### **4.6 - Estudos de dissolução do PEG nas mantas das blendas poliméricas**

#### **4.6.1 - Dissolução do PEG nas blendas poliméricas**

Os estudos da degradação e dissolução das mantas nanoestruturadas poliméricas em PBS foram realizados com base na norma ASTM F1635-04 *Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants* (2009).

Para determinar a dissolução do PEG em PBS (pH 7,2) e em meio de cultura das blendas poliméricas PLA/PEG, as fibras foram incubadas durante

48 horas, a uma temperatura de 37 °C e mantidas sob agitação contínua em mesa agitadora com velocidade de agitação de 100 rpm. As amostras foram retiradas após 2, 6, 12, 24 e 48 horas. Em seguida as amostras foram lavadas com água destilada e secas sob vácuo até obterem massa constante, para posterior caracterização. Para verificar a dissolução do PEG, amostras secas foram analisadas por espectroscopia de infravermelho, a partir do método da razão das refletâncias como descrito por Forato et al., número de onda 2700 e 3300 cm<sup>-1</sup>.

Para determinar a porcentagem de perda de massa do PEG em PBS (pH 7,2) e em meio de cultura, foi escolhido a blenda 80:20 devido à maior concentração de PEG, permitindo medições mais precisas da perda de massa. Para isso, a manta na concentração 80:20 foi recortada em quadrado de aproximadamente 2,5 x 2,5 cm, e colocados separadamente em frascos Falcon<sup>®</sup> contendo 15 mL de PBS e meio de cultura e incubados a uma temperatura de 37 °C e mantidas sob agitação contínua em mesa agitadora com velocidade de agitação de 150 rpm. As amostras em triplicata foram retiradas após 4, 8 e 12 horas e lavadas com água destilada e secas sob vácuo até obterem massa constante. A porcentagem de eluição do PEG foi calculada utilizando a equação (2).

$$\text{Perda de massa (\%)} = 100 \times \frac{(\text{Massa seca}_0 - \text{Massa seca}_t)}{\text{Massa seca}_0} \quad (2)$$

onde *Massa seca*<sub>0</sub> é a massa antes da incubação e *Massa seca*<sub>t</sub> é a massa após a incubação. A porcentagem de eluição do PEG foi corrigida considerando a perda de massa do PLA.

## **4.7 - Estudos da degradação das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA puro e das blendas poliméricas por meio de micro-organismo**

### **4.7.1 - Preparo da suspensão da bactéria *Staphylococcus aureus***

As amostras biológicas foram preparadas seguindo os devidos padrões de segurança: todo manuseio foi realizado em capela de fluxo laminar, com lâmpada UV germicida ligada por 1 hora antes de cada manipulação e com bico de Bunsen aceso por pelo menos 10 min antes de cada manipulação. Além de procedimentos de rotina, todos os aparatos foram previamente esterilizados com álcool etílico 70%. Todas as manipulações foram realizadas próximas ao bico de Bunsen.

Inicialmente, as bactérias foram adquiridas na forma de ampolas com cultura liofilizada e recomendação de uso em temperatura de 37 °C. O cultivo bacteriano inicial foi realizado em placas de Petri com meio de cultura sólido *Luria-Bertani* (LB). A partir desta cultura em meio sólido foram retiradas alíquotas de colônias bacterianas e diluídas no meio de cultura líquido (MC) de Triptona de soja, permanecendo incubadas a 37 °C sob agitação.

Após o tempo de incubação padrão, retirou-se uma alíquota da solução de meio de cultura com as bactérias cultivadas e verificou-se a absorvância das mesmas *vs* a solução padrão McFarland 0.5. Esta solução padrão possui uma turbidez equivalente a  $1.5 \times 10^5$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Para o plaqueamento em superfície, as placas foram previamente preparadas com 15 mL do meio Ágar Baird-Parker (BP) e as bactérias foram inoculadas com 0,1 mL de cada diluição em cada placa. A concentração utilizada de bactérias foi de  $10^6$  UFC. O inóculo foi espalhado com

alça de drigalski e em seguida foram colocadas as mantas nanoestruturadas poliméricas.

#### **4.7.2 - Cultivo das bactérias *Staphylococcus aureus* nas mantas nanoestruturadas poliméricas**

As bactérias *Staphylococcus aureus* (cepa TCC 25923 INCQS 00015) foram cultivadas nas fibras poliméricas de PLA e na blenda de PLA/PEG 80:20 durante 42 dias. As amostras foram retiradas após 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias e foram caracterizadas por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, espectroscopia por reflectância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier, como descritos no item (4.5).

### **4.8 - Biocompatibilidade *in vitro* das mantas nanoestruturadas poliméricas**

#### **4.8.1 - Citotoxicidade das Células-tronco Mesenquimais (CTMs)**

##### **4.8.1.1 - Obtenção das CTMs**

As células-tronco mesenquimais foram isoladas a partir de quatro culturas independentes, utilizando quatro diferentes dentes, conforme metodologia citada por Bernardi et al.<sup>91</sup> Após a coleta, cada dente foi imerso em meio de cultura DMEM, do inglês, *Dulbecc's Modified Eagle's Medium*. Em capela de fluxo laminar, a polpa do dente foi removida e digerida com 0,2% de collagenase do tipo 1 a 37 °C por 60 minutos. Foi adicionado meio de cultura



DMEM suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), e 100 µL/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e 0,45 µg/ml de gentamicina. A suspensão obtida foi centrifugada a 400 rpm por 10 minutos e semeada em placas de 12 poços a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingida a confluência de aproximadamente 90%, a cultura foi tripsinizada utilizando 0,05% de Tripsina/EDTA. As células dissociadas foram transferidas na densidade de 5.000 células por cm<sup>2</sup>, procedimento esse denominado como “passagem celular”. Dessa forma, subseqüentes passagens foram realizadas, e as culturas celulares foram avaliadas aproximadamente na quinta passagem. Anteriormente aos experimentos, as células foram caracterizadas como células-tronco mesenquimais humanas, conforme as recomendações do Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais, da *International Society for Cellular Therapy (ISCT)*.

#### **4.8.1.2 - Cultivo celular das CTMs**

Para avaliação das respostas, as CTMs foram semeadas nas mantas a uma densidade de  $3 \times 10^5$  células viáveis/poço e incubadas a 37 °C com atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>. Para o grupo controle, foi semeado o mesmo número de células diretamente sobre a placa de cultivo (padrão ouro para cultivo celular). Em seguida, foram realizados os testes de citotoxicidade e viabilidade celular. Para cada teste foram realizados quatro experimentos, derivados de quatro diferentes isolamentos de células-tronco.

#### **4.8.1.3 - Testes colorimétricos de citotoxicidade e viabilidade celular (LDH e MTT)**

A citotoxicidade das fibras poliméricas nas células-tronco mesenquimais foi avaliada por meio da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) (Labtest) por meio do NADH formado pela ação enzimática, utilizando o método colorimétrico (Labtest). O teste foi realizado em alíquotas do sobrenadante das culturas celulares e das dosagens de LDH, nos seguintes tempos: 1, 7, e 15 dias de cultivo. Para isso, além das fibras poliméricas, também foram avaliados dois grupos controles: controle negativo, no qual as células-tronco foram aderidas diretamente nos poços e controle positivo, no qual as células-tronco foram aderidas diretamente nos poços mas sendo adicionado, no dia da dosagem, Triton X-100 (Sigma-Aldrich) na concentração de 1% (v/v) durante 30 minutos. O Triton X-100 tem a função de causar a morte celular total, ou seja, verificar a liberação máxima de LDH. A leitura da absorbância foi realizada no equipamento 560 Labmax (Labtest Diagnóstica SA) utilizando o kit LDH Liquiform - LABTEST.

A viabilidade das células-tronco mesenquimais cultivadas sobre as fibras poliméricas foi avaliada por meio da análise da atividade metabólica mitocondrial pelo teste (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil brometo de tetrazólio) (MTT). Após 1, 7, e 15 dias de cultivo das células-tronco com as fibras poliméricas, o meio de cultura foi retirado e as células-tronco foram incubadas com MTT 0,25 mg/mL em PBS durante 2h30min a 37 °C. Após esse período, a solução de MTT foi removida e os cristais formados foram solubilizados em 400 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) e foram transferidos 200 µL para placa de cultivo de 96 poços. A absorbância obtida foi medida em espectrofotômetro (Spectramax) nos comprimentos de onda de 560 nm e 630 nm e os resultados foram calculados relacionando a diferença entre as duas leituras (570 nm – 630 nm).

## 4.8.2 - Células dendríticas (DCs)

### 4.8.2.1 - Geração e maturação das células dendríticas

As células dendríticas foram obtidas segundo Shokouhi et al.<sup>66</sup> Camundongos *wild type* C57BL/6 foram criados e sacrificados por deslocamento cervical na unidade “*Animal facility at Aachen University Hospital*”. Os camundongos tiveram seus fêmures e tíbias retiradas e colocadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco). As células progenitoras da medula óssea foram retiradas com jatos de meio de cultura com auxílio de uma seringa de 1 mL acoplada com uma agulha 23G. As células obtidas foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM L-glutamina (Gibco), 100 µg/mL estreptomicina (Gibco), 100 U/mL penicilina (Gibco) e 50 µM 2-mercaptoetanol (Sigma). A concentração das células foi ajustada em modo a obter  $2 \times 10^6$  células/mL e suplementado com 30U/mL de *Recombinant Murine SCF* (muSCF), 5 ng/ml de *hyper-interleukin-6* (hyper IL-6) (gentilmente doado por Dr. Rose-John, Kiel), 25 ng/mL *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand* (Flt-3L) (PeproTech), 40 ng/mL *recombinant long-range* (huIGF-1 long range) (Sigma). Após três dias de cultura, as células mortas, eritrócitos e detritos foram removidas por centrifugação, pelo método de gradiente de densidade utilizando meio de separação de linfócitos Ficoll Hypaque (LSM 1077; PAA). Para este fim, 14 mL de LSM foram delicadamente sobrepostos em 20 mL de suspensão celular em um tubo falcon de 50 mL e centrifugados durante 15 min a 2.000 rpm à temperatura ambiente. Após a retirada das células progenitoras da medula óssea (BMPCs) entre as fases, as células foram lavadas com 20 mL de PBS e sua concentração foi ajustada para  $1,5 \times 10^6$  células/mL. Durante a expansão das BMPCs, o meio foi renovado a cada dois dias mantendo a concentração celular de  $1,5 \times 10^6$  células/mL. No sétimo dia de cultura, iniciou-se a diferenciação de

BMPCs em DCs ( $0,75 \times 10^6$  células/mL) com meio de cultura RPMI 1640 contendo 50 ng/mL de FLT3. Durante o período de diferenciação, o meio foi parcialmente renovado a cada dois dias. A ativação das DCs (controle positivo) foi realizada por tratamento das células com 2  $\mu$ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS) durante 24 e 48 h. Na FIGURA 4.2 está apresentada a representação esquemática do processo de geração e maturação das células dendríticas:

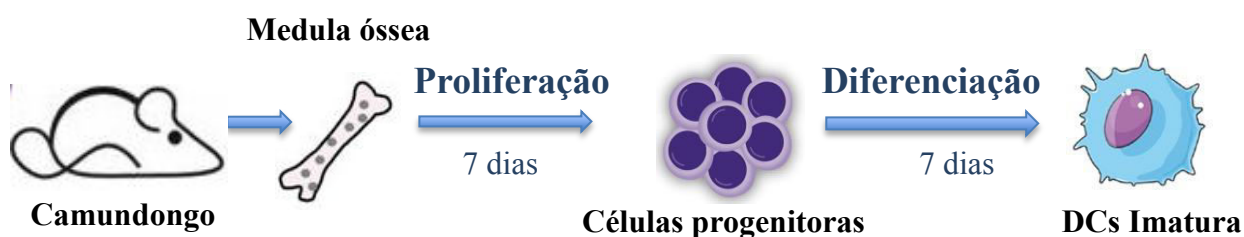


FIGURA 4.2 - Representação esquemática do processo de geração e maturação das células dendríticas.

#### 4.8.2.2 - Determinação da expressão de marcadores de superfície das células dendríticas

Para avaliar a expressão das moléculas de superfície, as células dendríticas imaturas obtidas foram incubadas nas fibras poliméricas a uma concentração de  $5 \times 10^6$ , a 37 °C com atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 e 48 h.

As células dendríticas imaturas incubadas em poços vazios (sem fibras) serviram como controles negativos. Como controle positivo, as células dendríticas imaturas foram estimuladas com 2  $\mu$ g/mL de LPS.

As DCs foram delicadamente removidas da superfície do biomaterial e lavadas com tampão FACS (PBS suplementado com 0,5% de SFC e 2 mM de EDTA). Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células foram ressuspensas em 50  $\mu$ L de tampão FACS e incubadas com os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo (PE-Cy 7 *mouse anti-human*, allophycocyanin (APC),

*phycoythin* (PE), *fluorescein isothiocyanate* (FITC), *peridinin chlorophyll protein* (PerCP – eFluor 710)) específicos, representados na TABELA 2, para as moléculas de superfície de interesse durante 30 min a 4 °C. Após incubação, as células foram lavadas com 2 mL de tampão FACS e ressuspensas em 200 µL de tampão FACS e mantidas em gelo.

A expressão de proteínas de superfície de células dendríticas (MHCII, CD40, CD80 e CD86) foi analisada por citometria de fluxo utilizando um FACS Canto II (BD Bioscience, Germany). A compensação foi feita manualmente ou usando configurações automáticas do instrumento. Os resultados adquiridos foram analisados com software FlowJo (FlowJo, LLC, EUA).

TABELA 2 - Anticorpos monoclonais usados para a detecção dos marcadores de superfícies

| DC     | Fluorocromo                   | Diluição |
|--------|-------------------------------|----------|
| CD11c  | PE-Cy 7                       | 1:200    |
| CD40   | APC/ <small>alexa647</small>  | 1:200    |
| CD80   | PE/ <small>alexa546</small>   | 1:200    |
| CD86   | FITC/ <small>alexa488</small> | 1:200    |
| MHC II | PerCP – eFluor 710            | 1:1000   |

#### 4.8.2.3 - Análise de citocinas pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)

As DCs imaturas ( $1,2-1,6 \times 10^6$ ) foram cultivadas nas fibras poliméricas a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h, em seguida, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS. As células foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C.

A extração do RNA foi realizado utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante e de acordo com Shokouki et al.<sup>66</sup> Resumidamente, as células foram descongeladas e adicionou-se 1 mL de reagente de extração. Os *pellets* contendo as células foram lisados e homogeneizados por pipetagem repetitiva e depois incubadas durante 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 0,2 mL de paraformaldeído 4% durante 10 min em temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C para separar a solução em 3 fases: RNA, DNA e proteína. A fase aquosa superior foi cuidadosamente separada e transferida para tubos de 1,5 mL livres de ribonuclease (RNase) e desoxirribonuclease (DNase). Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de isopropanol 100%, misturou-se completamente e incubou-se durante 10 min em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (12.000 rpm durante 10 min a 4 °C) e os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, foram adicionados 1 mL de etanol 75% e as amostras foram submetidas a vortex e centrifugadas a 7.500 rpm durante 5 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e o etanol restante foi removido. Posteriormente, os RNAs foram novamente suspensos em água livre de RNAase e incubados a 58 °C durante 15 min. As amostras de RNA foram mantidas em gelo e a concentração foi medida com o dispositivo NanoDrop (ND-1000 NanoDrop technologies, EUA). Os RNA purificados foram armazenados em temperatura -80 °C.

A expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p40, TNFa e RANTES foi determinada com PCR (Thermocycler, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Como controle positivo, as células dendríticas imaturas foram tratadas com 1  $\mu$ g/mL de LPS durante 24 h. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 mg de RNA total utilizando iniciadores hexâmeros randômicos (Promega) e o sistema da transcriptase reversa SuperScript II (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. A PCR foi realizada em um volume final de 10

ml, na presença de 1 ml do cDNA, 0,25 mM de dNTP, 0,2 mM de cada iniciador e 1 U de Platinum TaqDNA polimerase (Invitrogen).

A quantificação, a intensidade das bandas no gel de agarose, foi realizada em triplicata em três experimentos independentes, determinada com analisador de imagem de electroforese em gel (1D Gel Analyzer - <http://www.gelanalyzer.com>) usando a detecção por subtração automática e de *background*. O gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como fator quantitativo dos dados, os valores de intensidade para cada banda foram normalizados utilizando os níveis de expressão do GAPDH.

TABELA 3 - Dados dos iniciadores da RT-PCR utilizados para a quantificação de citoquinas.

| Iniciadores  | Sequência (5' a 3')   | Tamanho de produto (pb) | Temperatura de anelamento (°C) |
|--------------|---|-------------------------|--------------------------------|
| IL-1 $\beta$ | Fwd: CCA AAA GAT GAA GGG CTG CT<br>Rev: TCA TCA GGA CAG CCC AGG TC          | 50                      | 60                             |
| IL-6         | Fwd: TCT GGG AAA TCG TGG AAA TGA G<br>Rev: ATT GGA TGG TCT TGG TCC TTA GC   | 399                     | 60                             |
| IL-10        | Fwd: TTT GAA TTC CCT GGG TGA GAA<br>Rev: ACA GGG GAG AAA TCG ATG ACA        | 72                      | 60                             |
| IL-12p40     | Fwd: TTG CTG GTG TCT CCA CTC AT<br>Rev: GGG AGT CCA GTC CAC CTC TA          | 74                      | 60                             |
| TNF $\alpha$ | Fwd: TGC TCC AAT CTT GCA GTC GT<br>Rev: ACA CAC TTG GCG GTT CCT TC          | 307                     | 60                             |
| RANTES       | Fwd: TGC TCC AAT CTT GCA GTC GT<br>Rev: ACA CAC TTG GCG GTT CCT IC          | 51                      | 60                             |
| GAPDH        | Fwd: GGG GTG AGG CCG GTG CTG AGT AT<br>Rev: CAT TGG GGG TAG GAA CAC GGA AGG | 458                     | 60                             |

#### 4.8.2.4 - Imunofluorescência

A microscopia de imunofluorescência foi realizada de acordo com Pust et al.,<sup>92</sup> Maxeiner et al.<sup>93</sup> e Gamper et al.<sup>86</sup> Após 24 horas de semedura das células nas fibras poliméricas, as células dendríticas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos e então lavadas com Triton X-100 em PBS

por 1 minuto em temperatura ambiente, seguida de exposição à solução de faloidina conjugada com *Alexa Fluor 594* para visualização da proteína citoesquelética de actina. As células foram também marcadas com anticorpo anti-vinculina seguido de um anticorpo secundário *Alexa Fluor 488* de cabra conjugado com fragmentos anti-IgG de rato. O núcleo das células dendríticas foi marcado utilizando uma solução de Hoechst. As imagens foram adquiridas por meio de um microscópio Axiovert 200 microscope (Carl Zeiss) equipado com uma objetiva (Plan-Apochromat 100x/1.30). As imagens foram tratadas usando o *software* IPLab Spectrum (Scanalytics, Fairfax, USA).

#### **4.8.2.5 - Microscopia de série temporal (time-lapse)**

Para a formação de imagens de células vivas, as células dendríticas foram semeadas em fibras SBS a uma concentração de  $2 \times 10^4$  células/mL. As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio Axiovert 200 (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com um objectivo Plan-Apochromat 100x/1.30 NA (ou 63x/1.30 NA) e uma câmara CCD (Cascade 512B, Princeton Instruments, Trenton, EUA) por IPLab Spectrum (Scanalytics, Fairfax, EUA). Durante a aquisição de imagem, as células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> utilizando uma fase de aquecimento e um controlador de CO<sub>2</sub>, respectivamente (PeCon GmbH, Alemanha). As imagens de contraste de fase foram adquiridas a cada 7-8 seg. A manipulação digital das imagens foi realizada utilizando IPLab Spectrum, ImageJ e Adobe Photoshop 13.0 (Adobe Systems, Inc., EUA).

#### **4.9 - Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., CA).



A comparação das médias foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's para os experimentos de citotoxicidade e viabilidade celular.

Para os ensaios de FACS e RT-PCR, a significância estatística foi verificada utilizando o *U*-teste não paramétrico de Mann-Whitney e a ANOVA bidirecional, respectivamente. Nos diagramas de caixa, as linhas do meio das caixas indicam as medianas; o quartil superior indica 75% enquanto o quartil inferior das caixas indica 25%. Os *whisker*, ou fio de bigode, representam o percentil 10 (inferior) e 90 (superior). Os pares de amostras foram considerados diferentes quando  $p < 0,5$ .

## **5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados das caracterizações das mantas de fibras poliméricas obtidas com a técnica de fiação por sopro em solução são apresentados, nos itens 5.1 – 5.3. Para a produção com êxito das fibras poliméricas, foi realizado um estudo sistemático sobre as condições do processamento objetivando a produção de fibras homogêneas sem a presença de defeitos. Para isso, foram testados diferentes parâmetros de solução (concentração, viscosidade e solvente) e parâmetros experimentais (taxa de alimentação da solução polimérica, pressão do ar e distância de trabalho). No presente trabalho, serão apresentados os resultados representativos obtidos após estudo preliminar para determinar as melhores condições experimentais. Nos itens 5.4 e 5.5 serão apresentados os estudos de citotoxicidade e as análises da resposta pré-inflamatória *in vitro*.

### **5.1 - Caracterização morfológica das fibras poliméricas obtidas com a técnica de fiação por sopro em solução**

A técnica fiação por sopro em solução foi inicialmente reportada por Medeiros et al.<sup>20</sup> em 2009 como uma alternativa a técnica de eletrofiação<sup>94</sup> para a produção de fibras poliméricas. Tutak et al.<sup>95</sup> em 2013, reportou que dependendo da aplicação, esta técnica apresenta várias vantagens quando comparada com a técnica de eletrofiação. Como citado anteriormente, é uma técnica versátil, e a taxa de produção de fibras pode ser até 30 vezes maior que a da eletrofiação. Visando a aplicação na área médica, a grande vantagem é a não necessidade do uso de um campo elétrico para a produção das fibras, possibilitando a deposição das fibras diretamente sobre qualquer tipo de superfície, incluindo sistemas biológicos.<sup>96</sup> Dessa forma, a técnica utilizada para obtenção de fibras é muito recente e de grande potencial tecnológico. Não existem trabalhos na literatura explorando a influência da estrutura e morfologia

das fibras obtidas por SBS em elementos integradores do sistema imunitário. Neste sentido, os resultados obtidos buscam contribuir tanto no conhecimento para a preparação de fibras de PLA e de blendas PLA/PEG por meio da técnica de SBS, como também na nova vertente do nosso grupo de pesquisa, de se produzir fibras para aplicações na medicina.

Neste trabalho, foram produzidas fibras de PLA puro e fibras das blendas de PLA/PEG. Para a análise morfológica das mantas com a técnica de microscopia eletrônica de varredura, as fibras foram depositadas sobre uma folha de papel alumínio por aproximadamente 5 minutos e as micrografias estão apresentadas na FIGURA 5.1.

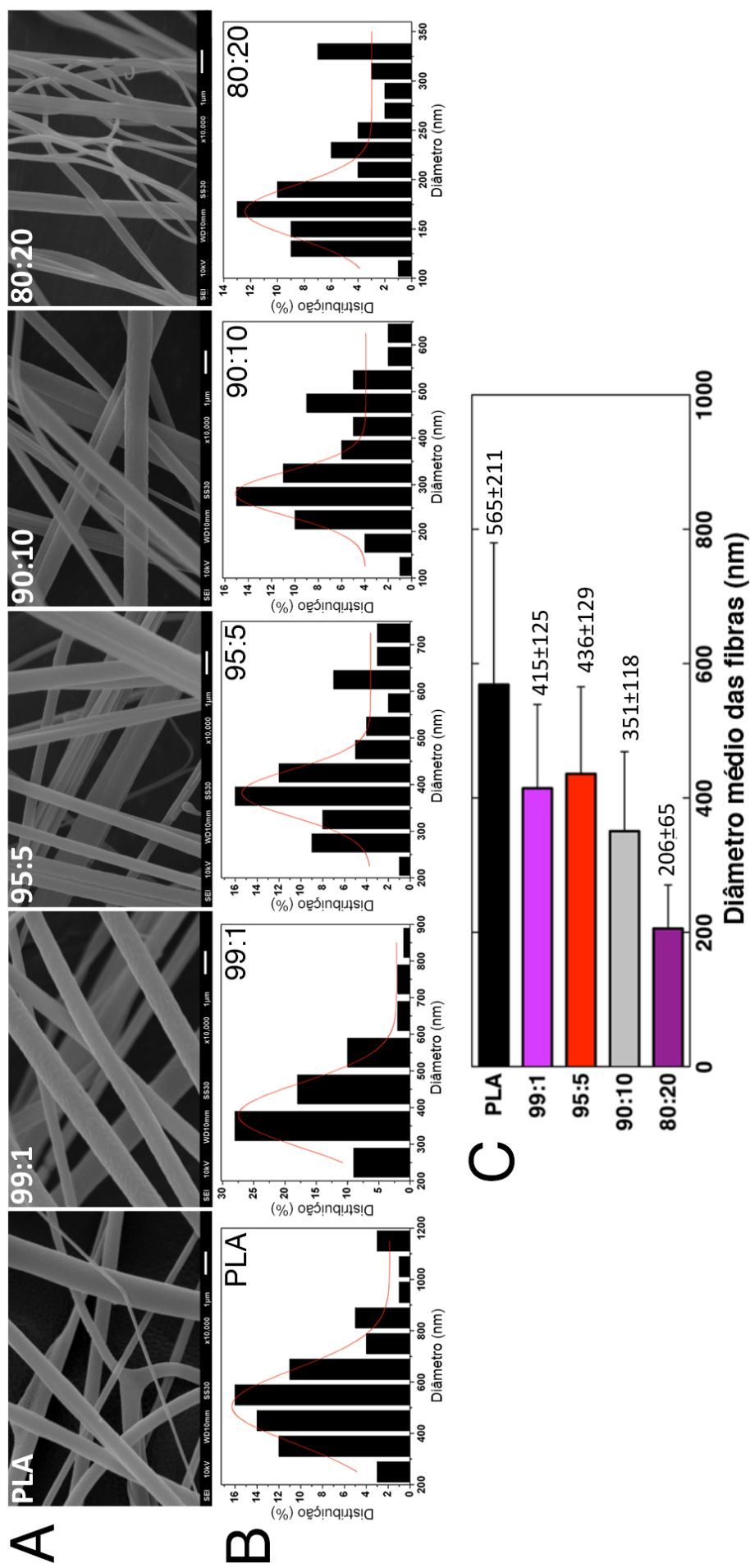


FIGURA 5.1 - (A) Micrografias obtidas por MEV das fibras de PLA e das blends poliméricas; (B) Distribuição do diâmetro das fibras, obtida com o *software* Image J; C) Diâmetro médio das fibras.

Analisando as micrografias foi possível verificar que em todas as composições, as fibras apresentaram morfologia homogênea e sem defeitos superficiais. O diâmetro médio das fibras foram calculados com o *software* Image J e encontram-se entre 200 e 600 nm (FIGURA 5.1 B). Com base nestes resultados, podemos observar que o diâmetro médio foi influenciado com o aumento da concentração de PEG, resultando em uma correlação inversa entre o diâmetro e a concentração de PEG (FIGURA 5.1 C). A redução do diâmetro das fibras pode estar relacionada com as viscosidades mais baixas encontradas em uma variação da taxa de cisalhamento aplicada de 1 a 100 s<sup>-1</sup> das soluções poliméricas contendo PEG antes do processamento (FIGURA 5.2). A viscosidade de uma solução polimérica está relacionada com a concentração e a massa molar do polímero.<sup>97</sup> Neste trabalho, as concentrações dos polímeros em solução foram de 12% (m/v), para todas as composições, PLA puro e blendas. A diminuição do diâmetro médio das fibras, dessa forma, foi atribuída devido à incorporação de um segundo polímero, o PEG-8000 g/mol, de menor massa molar em relação ao PLA-76.000 g/mol, tendo como consequência, a diminuição da viscosidade como apresentado na FIGURA 5.2. Além disso, uma solução com viscosidade mais baixa irá fluir através do bocal interno (agulha) a uma velocidade superior, além disso, baixas viscosidades geram forças viscoelásticas insuficientes para suprir completamente o alongamento da gota, resultando na produção de fibras mais finas.<sup>98</sup>

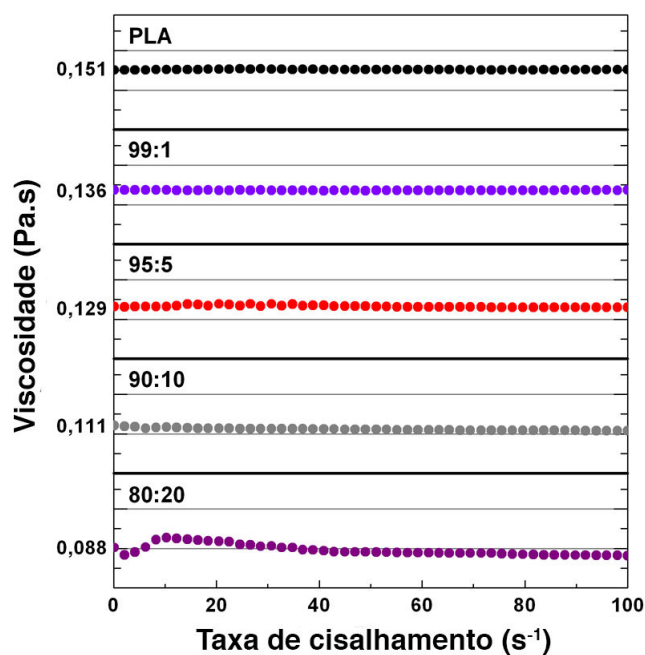


FIGURA 5.2 - Viscosidade das soluções de PLA e das blends PLA/PEG contendo 12% m/v, em função da taxa de cisalhamento a 25 °C, utilizando a mistura de solventes clorofórmio:acetona na proporção 3:1 v/v.

Por meio das micrografias também foi possível analisar a porosidade das mantas nanoestruturadas poliméricas. Diversos trabalhos encontrados na literatura reportam e discutem diferentes metodologias para determinar a porosidade e o tamanho de poros dos biomateriais.<sup>95-100</sup> Neste trabalho considerou-se a porosidade como os espaços entre as fibras, sendo os cálculos baseados no trabalho de Haeri e Haeri.<sup>83</sup> Devido as fibras apresentarem orientação randômica e a deposição das fibras ser controlada pelo tempo de fiação, os valores da porosidade foram interpretados com cautela.

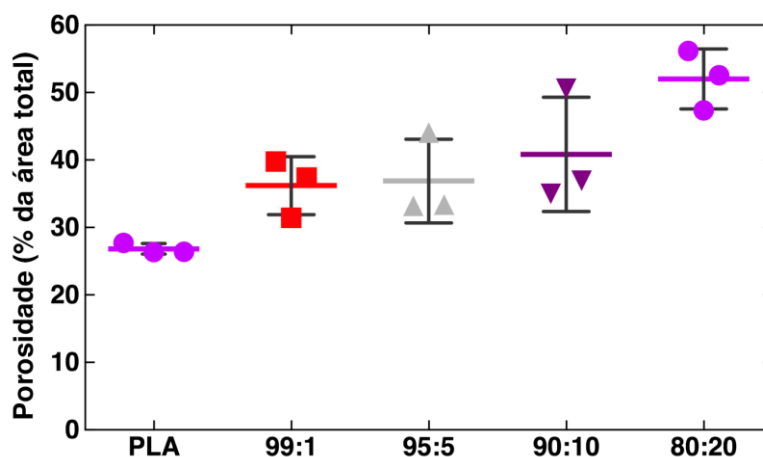


FIGURA 5.3 - A porcentagem da porosidade das mantas de PLA e das blends PLA/PEG.

A porcentagem da porosidade das mantas de PLA puro foi de  $\pm 27\%$ . As mantas nanoestruturadas poliméricas contendo 1, 5 e 10% de PEG, apresentaram porosidades semelhantes a das mantas de PLA puro, enquanto que as mantas contendo 20% de PEG apresentaram uma porcentagem superior em relação as outras composições, com valor de  $\pm 54\%$  (FIGURA 5.3). A diminuição do diâmetro das fibras com a adição do PEG, aumenta a distância entre uma fibra e outra, o que resulta em mantas com maior porosidade.

O valor da porosidade é extremamente importante, pois a presença de poros é essencial para o transporte de moléculas, e também poderá facilitar a migração celular, a remoção de substâncias metabólicas e a vascularização do tecido em crescimento.<sup>77,101</sup> A porosidade e o tamanho do poro influenciam na diferenciação celular, e em outras funções celulares, como observado por Nava et al.,<sup>102</sup> onde a infiltração e a nutrição das células do tecido cartilaginoso foram prejudicadas com tamanho reduzido de poro dos *scaffolds*.

Diversos trabalhos relataram o estudo da porosidade e o diâmetro ideal da superfície do suporte de acordo com cada função celular.<sup>103</sup> Mygind et al.<sup>104</sup> estudaram a proliferação e a diferenciação das células-tronco mesenquimais humanas em *scaffolds* de hidroxiapatita, com tamanhos de poro de 200 e 500  $\mu\text{m}$  e 70% de porosidade. Os *scaffolds* com maior porosidade

exibiram uma taxa de diferenciação osteogénica mais rápida, quando comparado com os de menor porosidade. Em um outro estudo, citado por Rnjak-Kovacina et al.,<sup>105</sup> *scaffolds* produzidos por meio da técnica de eletrofição à uma taxa de alimentação mais alta, apresentaram um aumento no diâmetro das fibras de 2.3 para 3.2  $\mu\text{m}$ , diminuindo o tamanho de poro de 11.7  $\mu\text{m}$  para 8  $\mu\text{m}$  e a porosidade de 34.4 para 15.5 %. Ambos os *scaffolds* forneceram suporte para a adesão e a proliferação celular, mas os fibroblastos da derme foram capazes de migrar e infiltrar apenas nos *scaffolds* com alta porosidade. Tendo em vista os diversos trabalhos encontrados na literatura podemos verificar que os valores ideais do diâmetro das fibras, tamanho de poro, porosidade dos *scaffolds* irá depender da aplicação e de cada tipo e função celular.

## **5.2 - Avaliação da presença do PEG nas mantas de PLA/PEG**

Para confirmar a presença do PEG nas blendas poliméricas de PLA/PEG, os grupamentos químicos foram determinados por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR). Os espectros de reflectância das fibras de PLA e das blendas PLA/PEG estão apresentados na FIGURA 5.4.



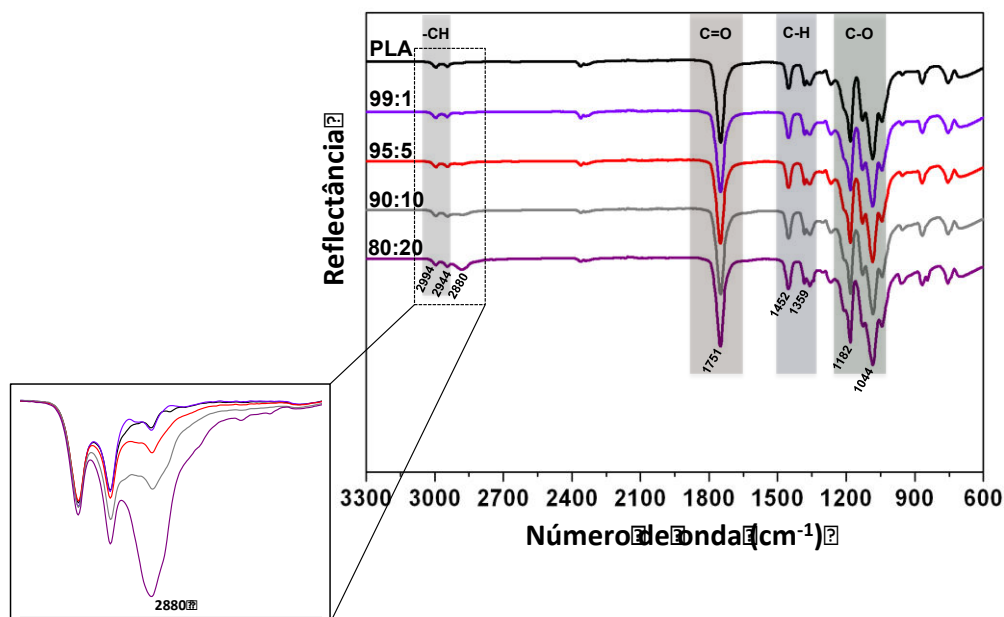


FIGURA 5.4 - Espectro de infravermelho em modo de reflectância total Atenuada – (ATR) das fibras de PLA e das blends PLA/PEG.

No espectro das fibras de PLA e das fibras das blends de PLA/PEG, as bandas de reflectância características do polímero PLA foram identificadas e são mostradas na TABELA 4. Na FIGURA 5.4 estão demonstradas as principais atribuições das fibras de PLA puro. Os números de onda em  $2994$  e  $2944\text{ cm}^{-1}$ , são correspondentes às deformações axiais assimétrica e simétrica da ligação C-H do grupo  $\text{CH}_3$ , respectivamente. A banda mais intensa foi observada em  $1751\text{ cm}^{-1}$ , sendo esta associada ao estiramento do C=O do grupo éster presente na cadeia do PLA. A deformação angular assimétrica da ligação C-H do grupo  $\text{CH}_3$  foi observada em  $1452\text{ cm}^{-1}$ . No PLA e em outros polímeros a região de  $1250\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$  é caracterizada por três grupos ( $1380$ ,  $1360$  e  $1300\text{ cm}^{-1}$ ), sendo este conjunto de bandas associado a deformações axiais simétricas do  $\text{CH}_3$  e as deformações angulares do grupamento C-H. A banda observada em  $1182\text{ cm}^{-1}$  e em  $1044\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento da ligação C-O do C-O-C de poliésteres alifáticos.

Analisando a FIGURA 5.4 foi possível notar que nas blendas poliméricas, com o aumento da proporção em massa do PEG, ocorreu um aumento na intensidade da banda de reflectância na região em  $2880\text{ cm}^{-1}$  associada ao estiramento vibracional da ligação C-H do grupo metileno  $\text{CH}_2$ , confirmando a presença do PEG nas blendas PLA/PEG. Para verificar a mudança nos valores da intensidade dos picos, foi feita a quantificação a partir do método da razão das absorbâncias,<sup>106</sup> sendo os valores apresentados na TABELA 5 e demonstram que, como esperado, o aumento da concentração de PEG, resultou em um aumento do valor da razão entre o pico em  $2880\text{ cm}^{-1}$  das blendas/PLA, confirmando a presença de dois componentes na mistura.

TABELA 4 - Bandas relevantes e os grupos funcionais referente ao espectro de infravermelho das fibras de PLA e das blendas PLA/PEG.

| <b>Banda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b> | <b>Grupos</b>   |
|--|---|
| 710 - 800                                  | COH deformação fora do plano (ácidos carboxílicos, dímeros)                   |
| 956  | $\text{CH}_2$ flexão no plano ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ )          |
| 1150 - 1060                                | C-O-C estiramento   |
| 1268                                       | $\text{CH}_2$ deformação fora do plano ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ) |
| 1359                                       | $\text{CH}_3$ deformações axiais simétricas                                   |
| 1452                                       | C-H deformação angular assimétrica  |
| 1751                                       | C=O estiramento   |
| 2944                                       | $\text{CH}_2$ deformações axiais simétrica                                    |
| 2994                                       | $\text{CH}_3$ deformações axiais assimétrica                                  |
| 3300–2500                                  | O-H estiramento   |

TABELA 5 - Razão entre as absorvâncias do pico do grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) em  $2880 \text{ cm}^{-1}$  das blendas PLA/PEG em relação a banda em  $2880 \text{ cm}^{-1}$  do PLA.

| <b>Nanofibras</b> | <b>Valor da Intensidade<br/>(<math>2880 \text{ cm}^{-1}</math>)</b> |
|-------------------|---|
| Blenda 80:20      | 7   |
| Blenda 90:10      | 3   |
| Blenda 95:5       | 2   |
| Blenda 99:1       | 1   |
| PLA               | 1   |

As propriedades térmicas das fibras de PLA e das fibras das blendas de PLA/PEG foram determinadas com o auxílio da técnica de calorimetria diferencial exploratória (DSC) (FIGURA 5.5). Esta técnica permitiu acompanhar as transições térmicas das fibras poliméricas, tais como, temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) característica da fase amorfa do material, temperatura de cristalização a frio ( $T_{cc}$ ), temperatura de fusão cristalina ( $T_m$ ), entalpia de fusão ( $\Delta H_m$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta H_{cc}$ ) e grau de cristalinidade  $\chi_c$  (%) cujos os valores estão apresentados na TABELA 6. Os valores foram retirados das curvas referentes ao primeiro aquecimento, com o objetivo de observar o efeito do da técnica de preparação – SBS, sobre o comportamento térmico das amostras.

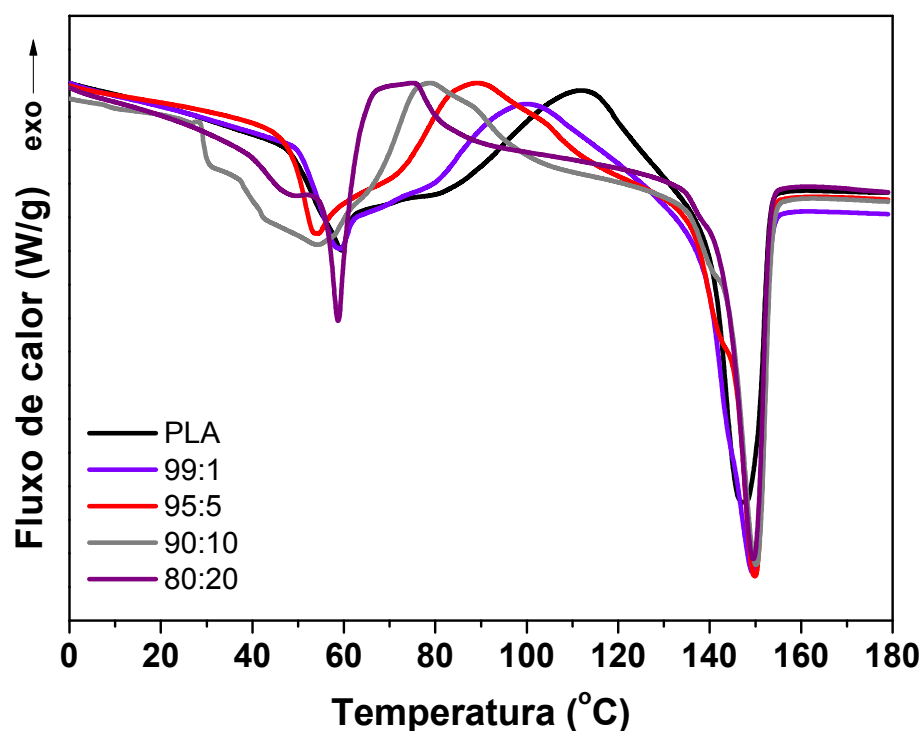


FIGURA 5.5 - Curvas de DSC das fibras de PLA e suas blendas com PEG. Taxa de 10 °C/min.

TABELA 6 - Eventos térmicos\* das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA e das blendas PLA/PEG.

| Mantas poliméricas | $Tg^{**}$<br>(PLA)<br>(°C) | $Tcc$<br>(PLA)<br>(°C) | $\Delta Hcc$<br>(PLA)<br>(J/g) | $Tm$<br>(PLA)<br>(°C) | $\Delta Hm$<br>(PLA)<br>(J/g) | $\chi_c$ (%) |
|--------------------|----------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------|
| PLA puro           | 51                         | 111                    | 24                             | 147                   | 26                            | 2            |
| PLA/PEG 99:1       | -                          | 99                     | 19                             | 149                   | 27                            | 8            |
| PLA/PEG 95:5       | -                          | 89                     | 17                             | 149                   | 26                            | 9            |
| PLA/PEG 90:10      | -                          | 82                     | 14                             | 150                   | 24                            | 11           |
| PLA/PEG 80:20      | -                          | 67                     | 11                             | 150                   | 24                            | 17           |

\* Temperatura de transição vítrea ( $Tg$ ), temperatura de cristalização a frio ( $Tcc$ ), temperatura de fusão cristalina ( $Tm$ ), entalpia de fusão ( $\Delta Hm$ ), entalpia de cristalização ( $\Delta Hcc$ ) e grau de cristalinidade  $\chi_c$  (%).

\*\*Valores da  $Tg$  foram retirados do segundo aquecimento.

Nas fibras de PLA puro, FIGURA 5.5, é possível observar o primeiro evento térmico, representado por um pico endotérmico em 51 °C, referente a temperatura de transição vítrea. Na temperatura 111 °C, é possível

observar a cristalização a frio característica do PLA. Por fim, o terceiro evento térmico, a temperatura de fusão do PLA foi observada em 147 °C.

Para as blendas poliméricas de PLA/PEG, a temperatura de transição vítrea não foi determinada, devido a sobreposição da temperatura de fusão do PEG, que ocorre em 53 °C. Pode-se observar na FIGURA 5.5, a relação do aumento da proporção de PEG nas blendas com o deslocamento do pico exotérmico ( $T_{cc}$ ) para temperaturas mais baixas, ou seja, adicionando somente 1% de PEG, a  $T_{cc}$  foi em 99 °C e, nas fibras, com a maior quantidade de PEG (20%) a  $T_{cc}$  deslocou para 67 °C. Além disso, com aumento da concentração de PEG, o grau de cristalinidade aumentou. A manta de PLA puro apresentou grau de cristalinidade ( $\chi_c$ ) de 2% e, com a adição de 20% de PEG na blenda, o ( $\chi_c$ ) aumentou para 17%. Dessa forma, pode-se afirmar que o PEG influenciou no aumento do grau de cristalinidade durante o processo de fiação por sopro em solução facilitando a movimentação e conseqüentemente facilitando o grau de ordenamento molecular das cadeias do PLA. Em um trabalho citado por Ero-Phillips<sup>107</sup>, foi reportado que em uma solução polimérica, com a diminuição da concentração de um polímero, diminui a viscosidade da solução, sendo assim, as cadeias dos polímeros apresentam maior mobilidade, devido ao menor emaranhamento entre as cadeias. Neste trabalho, as concentrações poliméricas foram as mesmas nas diferentes composições de fibras, mas a viscosidade da solução foi diminuída com a adição do PEG como citado anteriormente. Então, durante o processo de fiação, com a diminuição dos emaranhados das cadeias com a adição do PEG, a solução polimérica percorreu da ponta da agulha até o coletor e a orientação da cadeia polimérica foi induzida pelas forças de arraste do ar. Dessa forma, além do PEG, o processo de fiação por facilitar a orientação do polímero também favoreceu o aumento do grau de cristalinidade. Esses resultados, estão de acordo com os estudos encontrados na literatura e, sugerem que o PEG atuou como nucleante para o PLA.<sup>108,109</sup> Além

disso, foi reportado que o PEG é um excelente modificador devido à sua boa miscibilidade com o PLA.<sup>110-113</sup>

Para verificação da estabilidade térmica, foram realizadas análises termogravimétricas das fibras de PLA, fibras das blendas PLA/PEG e do PEG na forma de pó e, estão apresentadas na FIGURA 5.6.

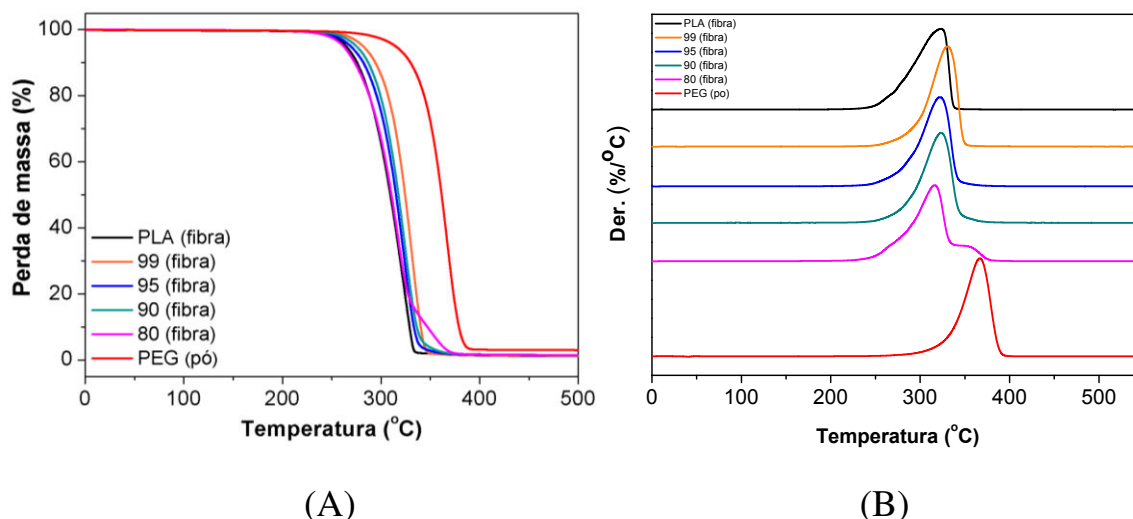


FIGURA 5.6 - (A) Curvas TGA, relacionando a perda de massa em função da temperatura e (B) curvas DTG relacionando a primeira derivada da variação de massa em função da temperatura. Atmosfera: ar sintético e taxa de aquecimento: 10 °C/min.

A temperatura de início de perda de massa ( $T_{início}$  do inglês, “onset”) foi determinada pela extrapolação da curva de perda de massa. A temperatura na qual a taxa de perda de massa é máxima ( $T_{pico}$  do inglês “peak”) foi determinada pela temperatura do pico da curva da primeira derivada da curva de perda de massa (DTG). A partir da análise dos resultados, observa-se que a decomposição térmica da fibra de PLA puro e das blendas 99:1, 95:5, 90:10 ocorre em uma única etapa. O início da perda de massa da fibra de PLA puro ( $T_{início}$ ) e ( $T_{pico}$ ) foi em 272 °C e 303 °C, respectivamente, que pode ser atribuído à cisão das ligações ésteres entre as unidades repetitivas e a rápida redução de sua massa molar média, confirmando resultados encontrados na literatura.<sup>114-116</sup> Estudos sobre a degradação térmica do PLA fornecem diferentes

interpretações que variam entre um modelo de reação de primeira ordem e um processo complexo de decomposição.<sup>117-119</sup>

As blendas 99:1, 95:5, 90:10 apresentaram valores de (*T início*) e (*T pico*) 278 e 330, 284 e 321, 291 e 323 °C, respectivamente, indicando maior estabilidade térmica quando comparado com as fibras de PLA puro. A maior estabilidade térmica pode ser explicada pela mistura do PEG com o PLA nas blendas. Sendo que a temperatura de degradação do PEG puro ocorre em maior temperatura em relação ao PLA puro, pois está associada a natureza química das ligações éteres em relação as ligações ésteres presentes no PLA. As fibras com maior concentração de PEG, PLA/PEG 80:20, apresentaram dois eventos térmicos, o primeiro e mais pronunciado, em torno da temperatura de 270 °C, indicando o início da degradação. Neste estágio, ocorreu uma perda de massa acima de 80%, referente principalmente à degradação do constituinte majoritário, isto é, do PLA. O segundo evento térmico encontrado, com temperatura *início* acima de 317 °C, podendo estar relacionado à degradação do segundo componente da blenda, o PEG, no qual o processo de degradação (*T início*) ocorre em 335 °C. Esta informação pode ser melhor visualizada com os gráficos da DTG.

Visando a aplicação das mantas nanoestruturadas poliméricas na Engenharia de Tecidos, a molhabilidade do material é uma característica que deve ser investigada, pois a interação entre as células com a superfície dos biomateriais é totalmente dependente de características como molhabilidade, composição química, porosidade e rugosidade.<sup>120</sup> Para a determinação do caráter de molhabilidade das fibras poliméricas, o ângulo de contato da água deionizada sobre a superfície das mesmas foi verificado. A média dos ângulos de contato obtidos para cada amostra está apresentada na FIGURA 5.7.

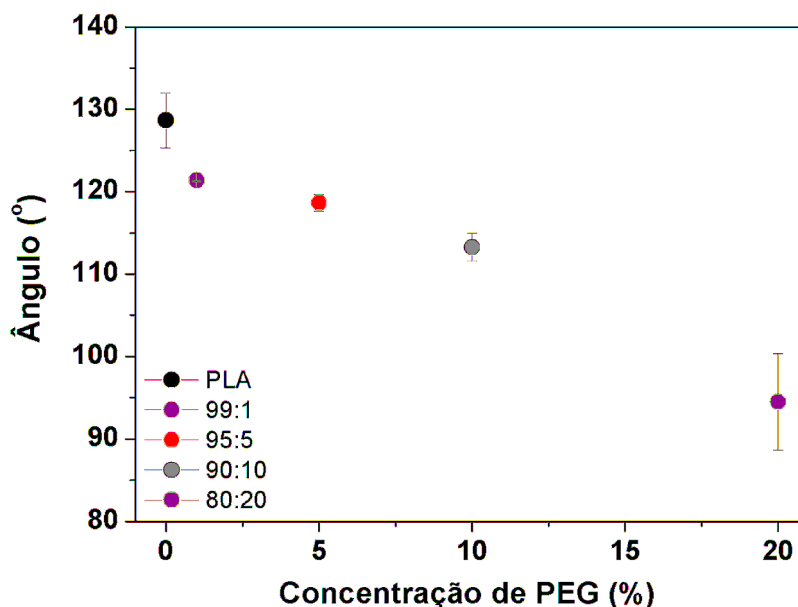


FIGURA 5.7 - Valores do ângulo de contato médio obtido da água deionizada sobre a superfície das fibras de PLA e das blendas de PLA/PEG.

O valor médio do ângulo de contato da água deionizada nas fibras de PLA puro foi de  $\theta=129^{\circ}\pm 3$ , o que indica uma natureza mais hidrofóbica deste polímero. Os valores do ângulo de contato da água deionizada nas fibras das blendas poliméricas de PLA/PEG 99:1, 95:5, 90:10 e 80:20 foram de  $\theta=121^{\circ}\pm 1$ ;  $118^{\circ}\pm 1$ ;  $113^{\circ}\pm 2$ ;  $93^{\circ}\pm 3$ , respectivamente. Com o aumento da adição do PEG nas blendas foi observado uma redução no valor do ângulo de contato, ou seja, redução da hidrofobicidade, fato atribuído à presença do polímero, de natureza hidrofílica, na superfície das fibras.<sup>121,122</sup>

Burkersroda et al.<sup>123</sup> avaliaram a degradação dos polímeros PLA e poli(ácido lactico-co-glicólico) (PLGA) e reportaram que a velocidade da degradação foi favorecida pelo caráter hidrofílico do polímero PLGA, pois esta propriedade permite maior difusão da água na matriz polimérica influenciando na velocidade da degradação do polímero. Dessa forma, o aumento da molhabilidade nas fibras de PLA, devido a hidroflicidade do PEG é muito interessante, pois esta propriedade poderá influenciar na velocidade de degradação e ser controlada com a adição ou redução da quantidade do polímero



hidrofílico. Além disso, como citado anteriormente, a molhabilidade de um material é um dos mais importantes parâmetros que pode afetar a resposta biológica após o implante. Alguns trabalhos reportaram que após o implante, os biomateriais são recobertos, em poucas horas por proteínas presentes do local, principalmente proteínas plasmáticas, predominantemente albumina, fibrinogênio, IgG e fibronectina.<sup>124,125</sup> Muitos trabalhos reportam que a maioria das proteínas se aderem mais facilmente em superfícies hidrofóbicas do que em superfícies hidrofílicas<sup>126-129</sup> e, além disso, retrataram que a força de adesão das proteínas é aumentada quando a molhabilidade de uma superfície apresentando ângulo de contato  $\theta \geq 65^\circ$ .<sup>129,130</sup> Embora a influência da molhabilidade da superfície do material sobre as respostas para a regeneração de tecido ainda não é totalmente compreendida,<sup>131,132</sup> é conhecido que as propriedades de superfície do polímero influencia a quantidade e tipos de proteínas ligadas, bem como a composição e/ou as alterações conformacionais dessas proteínas. Essas mudanças são os principais fatores para iniciar reações adversas, tais como a coagulação e a inflamação.<sup>120,133</sup>

Visto que o PEG proporcionou um aumento da hidrofiliabilidade nas mantas nanoestruturadas poliméricas, torna-se interessante avaliar a molhabilidade das diferentes mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA/PEG, após 12 horas de incubação com PBS e meio de cultura celular. A escolha das soluções de PBS e meio de cultura para esse estudo foram feitas pelo fato do PBS ser representativo de condições isotônicas e, o meio de cultura celular ser similar aos fluidos do tecido extracelular. Os resultados da molhabilidade das mantas nanoestruturadas poliméricas após a exposição de PBS e meio de cultura estão apresentados na FIGURA 5.8.

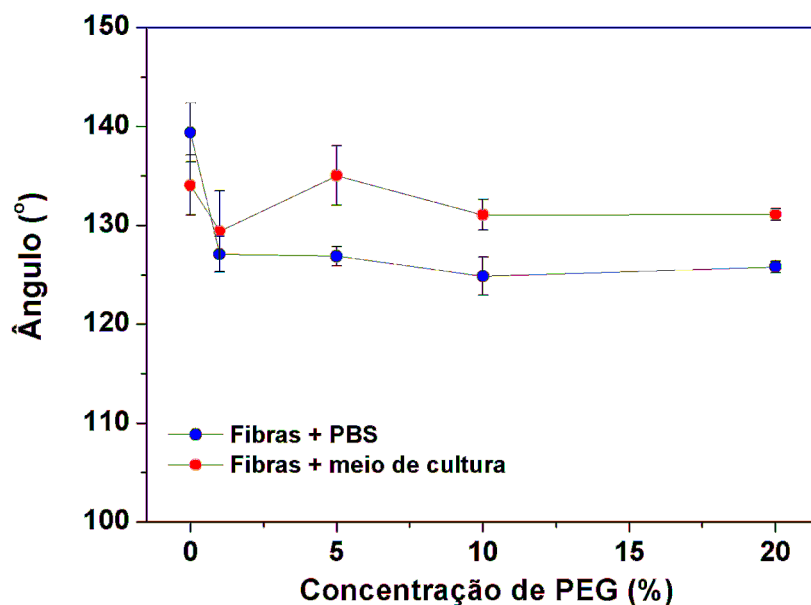


FIGURA 5.8 - Ângulo de contato médio da água deionizada obtido para as mantas de fibras de PLA e das mantas das blendas com PEG após 12 horas de exposição em PBS e meio de cultura celular RPMI 1640 (Gibco).

Após 12 horas de exposição das mantas nanoestruturadas poliméricas em PBS e em meio de cultura, pode-se observar o aumento dos valores do ângulo de contato, significando a redução da hidrofiliicidade nas blendas poliméricas, obtendo-se valores semelhantes aos da fibra de PLA puro. Os resultados obtidos sugerem que parte do PEG sobre a superfície da fibra foi dissolvida possivelmente devido à sua solubilidade em água.<sup>110</sup> Confirmando essa hipótese, por meio da técnica de infravermelho, na FIGURA 5.9 observa-se uma redução da intensidade do pico em  $2880\text{ cm}^{-1}$ , associado ao estiramento vibracional da ligação C-H do grupo metileno  $\text{CH}_2$  do PEG nas diferentes blendas poliméricas.

É possível observar que há uma intensa liberação do PEG nas primeiras 12 horas, atingindo-se um platô em 24 horas.

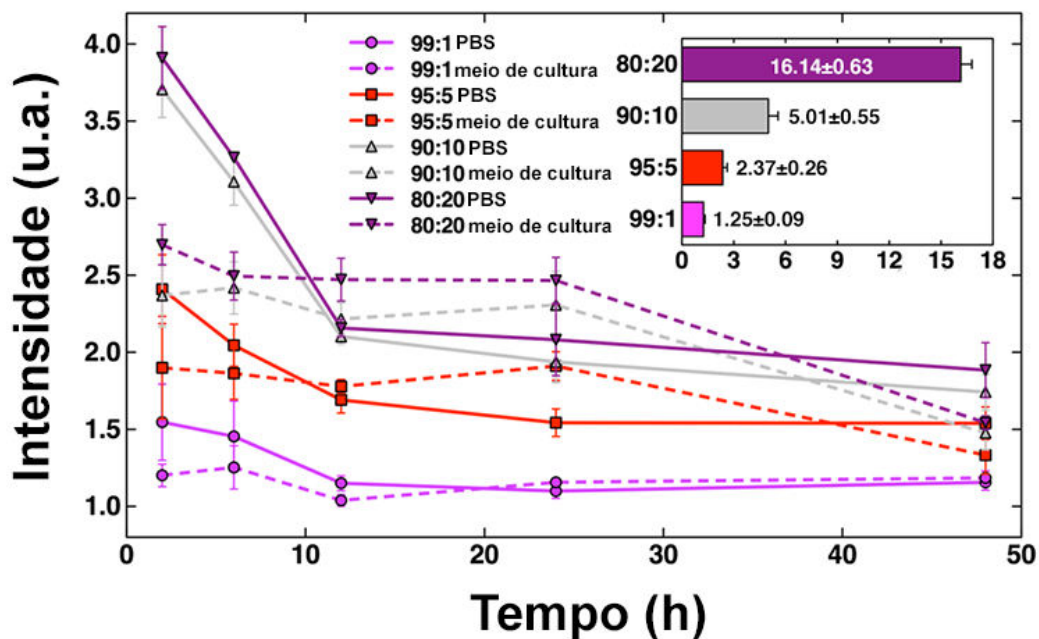


FIGURA 5.9 - Cinética de dissolução do PEG das fibras da blenda PLA/PEG após a incubação com PBS e meio de cultura celular. A razão das intensidades do pico em  $2880\text{ cm}^{-1}$ , foi determinada por espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada. A dissolução do PEG é evidente durante as primeiras 12 horas, seguido por uma menor taxa de dissolução durante as seguintes 36 horas. A inserção mostra as proporções de intensidade das fibras PLA/PEG antes da incubação.

Para uma estimativa da quantidade do PEG que foi liberado, a perda de massa da manta polimérica, assim como, a perda do componente PEG foram avaliados após 4, 8 e 12 horas de incubação com PBS e meio de cultura. Para garantir maior acurácia nos resultados, neste estudo foi utilizada a blenda contendo a maior concentração de PEG, blenda PLA/PEG 80:20.

Foi possível observar, na FIGURA 5.10, a perda de massa, após a incubação da manta 80:20 com PBS e meio de cultura celular.

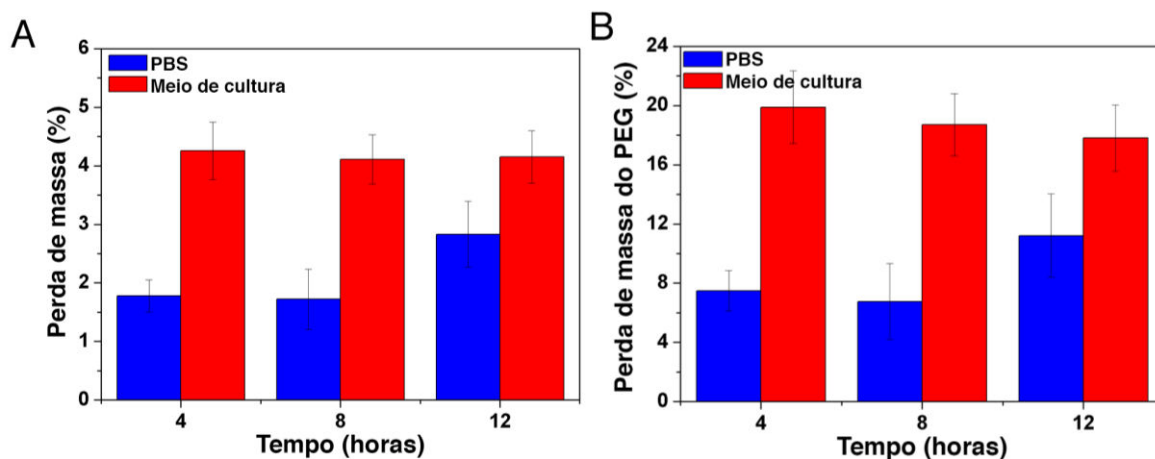


FIGURA 5.10 - Perda de massa (%) das mantas após 12 horas de exposição em PBS e meio de cultura. A) % da perda de massa total (manta PLA/PEG); B) % de perda de massa em relação a massa de PEG presente na blenda.

Nas primeiras 12 horas de incubação em PBS, a perda da massa total da manta 80:20 foi de  $2,83 \pm 0,56$  % e, a perda de massa do PEG foi de  $11,21 \pm 2,80$  %. Já, após a incubação com meio de cultura celular, houve maior perda de massa,  $4,15 \pm 0,44$  % da massa total da manta 80:20 e, de  $17,81 \pm 2,23$  % de PEG. Esse resultados corroboram com os encontrados que uma porção de PEG é liberado nas primeiras 12 horas.

## **5.3 - Degradação das mantas de fibras poliméricas**

### **5.3.1 - Estudo da degradação por meio da ação das bactérias *Staphylococcus aureus* (biodegradação)**

Na literatura, o estudo da biodegradação, realizado segundo Faria e Martins-Franchetti<sup>134</sup> foi feito por plaqueamento em ágar com a inoculação do micro-organismo sob condições favoráveis de crescimento. O agente de degradação foi a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, que além do ambiente hospitalar é tipicamente encontrada na pele humana e nas fossas nasais e frequentemente está associada a infecções adquiridas em pessoas saudáveis.

Em condições similares foram avaliadas as fibras de PLA e a blenda com maior quantidade de PEG 80:20, buscando avaliar a influência do PEG na degradação do PLA. Serão apresentados os resultados obtidos por um período de 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de incubação.

A cada semana as mantas nanoestruturadas poliméricas foram analisadas com microscopia eletrônica de varredura para avaliação das mudanças na morfologia e os resultados estão representados na FIGURA 5.11.

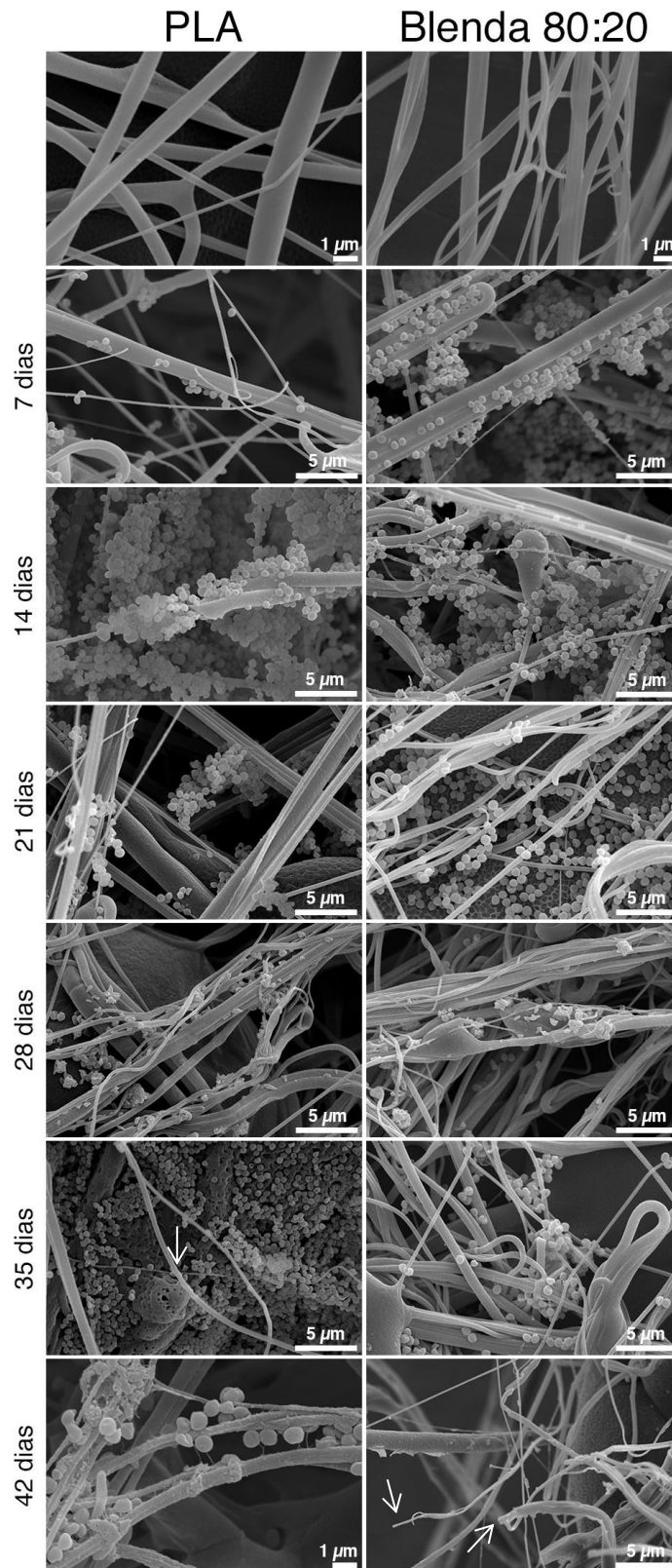


FIGURA 5.11 - Micrografias obtidas por MEV das fibras poliméricas de PLA e das fibras da blenda 80:20 antes e após a incubação com as bactérias *S. aureus*. Incubação a 37 °C, durante 0; 7; 14; 21; 28; 35 e 42 dias, em meio de cultura Ágar Baird-Parker.

Podemos observar na FIGURA 5.11 que as bactérias responderam positivamente à colonização nas superfícies das fibras de PLA puro e das blendas PLA/PEG 80:20 formando um biofilme.

A degradação de um material, primeiramente é identificada por alterações na rugosidade da superfície, o surgimento de poros e mudanças de cor, bem como mudanças de características físicas e químicas dos materiais.<sup>135</sup>

Alguns trabalhos na literatura<sup>61,136-139</sup> reportam que polímeros semi-cristalinos sofrem ataque preferencial em suas regiões amorfas, devido a maior susceptibilidade de penetração da água e oxigênio, proporcionando a hidrólise do mesmo.<sup>137-139</sup>

Após 35 dias de incubação, constataram-se mudanças na morfologia das fibras de PLA, como a presença de poros superficiais (indicado pela seta na FIGURA 5.11– 35 dias). O mesmo comportamento não foi observado na blenda 80:20 após 35 dias. Já após 42 dias de incubação, indicado na seta na FIGURA 5.11, em algumas regiões da blenda, podemos observar que houve a ruptura de algumas fibras. Isso pode ser evidência de que uma fração do PEG dissolveu no meio de cultura, resultando na diminuição do diâmetro das fibras facilitando a ocorrência das rupturas.

As propriedades térmicas das fibras de PLA e das blendas de PLA/PEG 80:20, antes e após a incubação com as bactérias, foram determinadas com o auxílio da técnica de calorimetria diferencial exploratória (DSC) e as curvas de DSC estão apresentadas na FIGURA 5.12.

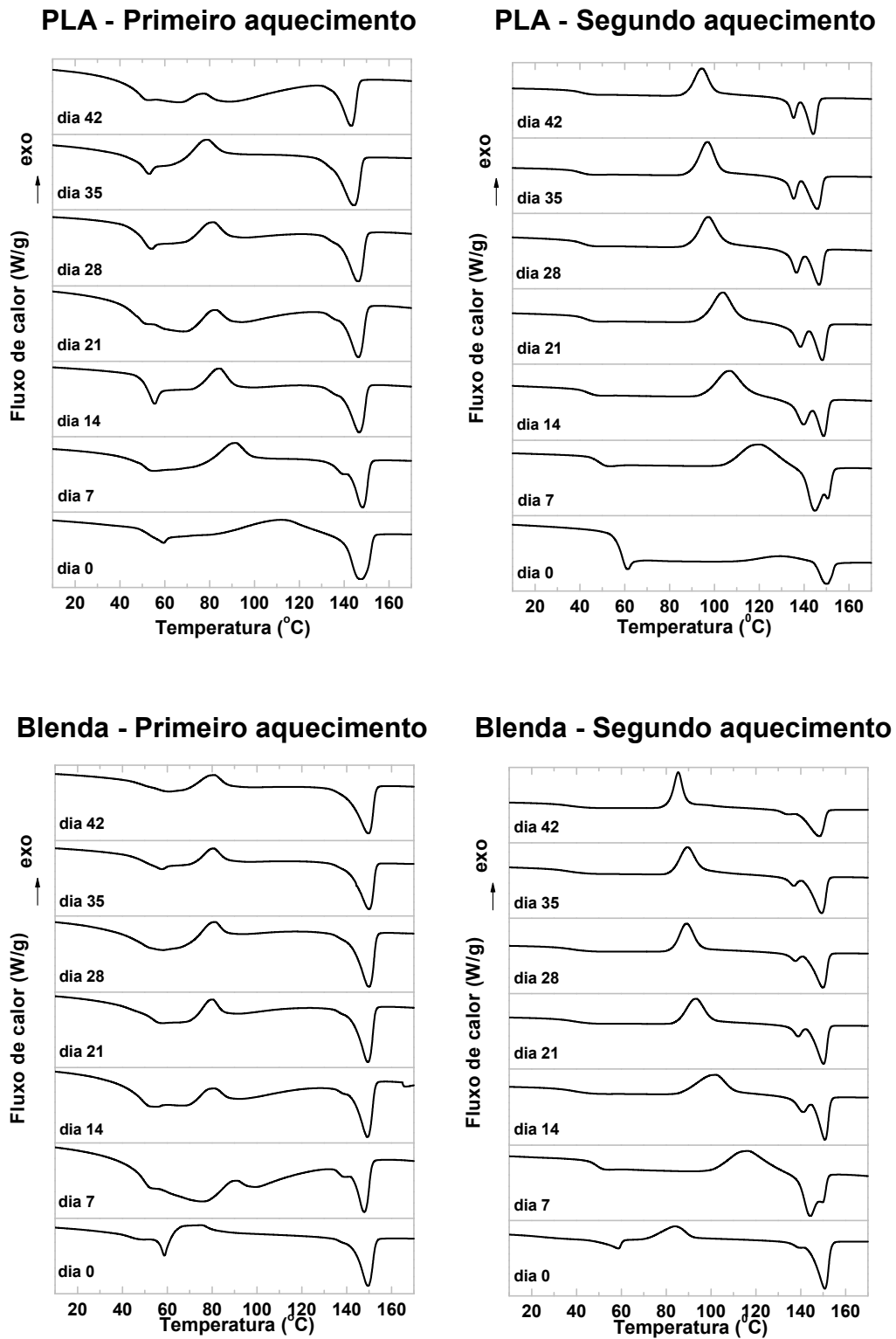


FIGURA 5.12 - Curvas de DSC mostrando a temperatura de transição vítrea, temperatura de cristalização e temperatura de fusão das fibras de PLA e da blendas PLA/PEG após 0; 7; 14; 21; 28; 35 e 42 dias de incubação com as bactérias *S. aureus*.



TABELA 7 - Eventos térmicos das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA e da blenda PLA/PEG 80:20 (m/m). Após a incubação com as bactérias *S. aureus*. Valores referentes ao primeiro aquecimento.

| Mantas                   | Tempo (dias) | Tg (°C)<br>Rampa 2 | Tcc (°C)<br>Rampa 1 | $\Delta H_{cc}$ (J/g)<br>Rampa 1 | Tm (°C)<br>Rampa 1 | $\Delta H_m$ (J/g)<br>Rampa 1 | $\chi_c$ (%)<br>Rampa 1 |
|--------------------------|--------------|--------------------|---------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------|
| <b>PLA</b>               | 0            | 51                 | 111                 | 24                               | 147                | 25                            | 2                       |
|                          | 7            | 46                 | 90                  | 11                               | 146                | 21                            | 10                      |
|                          | 14           | 43                 | 84                  | 10                               | 146                | 19                            | 10                      |
|                          | 21           | 43                 | 81                  | 9                                | 146                | 18                            | 10                      |
|                          | 28           | 41                 | 80                  | 8                                | 146                | 16                            | 9                       |
|                          | 35           | 40                 | 78                  | 5                                | 146                | 16                            | 12                      |
|                          | 42           | 39                 | 77                  | 2                                | 146                | 12                            | 11                      |
| <b>PLA/PEG<br/>80/20</b> | 0            | -                  | 67                  | 11                               | 150                | 24                            | 17                      |
|                          | 7            | -                  | 79                  | 7                                | 150                | 19                            | 16                      |
|                          | 14           | -                  | 89                  | 3                                | 150                | 13                            | 13                      |
|                          | 21           | -                  | 80                  | 7                                | 150                | 19                            | 16                      |
|                          | 28           | -                  | 80                  | 11                               | 150                | 26                            | 20                      |
|                          | 35           | -                  | 80                  | 8                                | 150                | 26                            | 24                      |
|                          | 42           | -                  | 80                  | 7                                | 150                | 24                            | 22                      |

TABELA 8 - Eventos térmicos das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA e da blenda PLA/PEG 80:20 (m/m). Após a incubação com as bactérias *S. aureus*. Valores referentes ao segundo aquecimento.

| Mantas                   | Tempo (dias) | Tcc (°C)<br>Rampa 2 | $\Delta H_{cc}$ (J/g)<br>Rampa 2 | Tm (°C)<br>Rampa 2 | $\Delta H_m$ (J/g)<br>Rampa 2 |
|--------------------------|--------------|---------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| <b>PLA</b>               | 0            | 130                 | 3                                | 147                | 25                            |
|                          | 7            | 120                 | 18                               | 144 e 150          | 19                            |
|                          | 14           | 107                 | 22                               | 139 e 148          | 24                            |
|                          | 21           | 104                 | 23                               | 139 e 148          | 22                            |
|                          | 28           | 97                  | 17                               | 137 e 147          | 19                            |
|                          | 35           | 96                  | 26                               | 136 e 146          | 29                            |
|                          | 42           | 94                  | 12                               | 135 e 144          | 13                            |
| <b>PLA/PEG<br/>80/20</b> | 0            | 81                  | 16                               | 150                | 24                            |
|                          | 7            | 102                 | 21                               | 141 e 147          | 24                            |
|                          | 14           | 116                 | 14                               | 144 e 150          | 15                            |
|                          | 21           | 93                  | 19                               | 139 e 150          | 21                            |
|                          | 28           | 89                  | 22                               | 137 e 150          | 26                            |
|                          | 35           | 88                  | 19                               | 137 e 150          | 24                            |
|                          | 42           | 85                  | 18                               | 133 e 149          | 24                            |

Nas mantas de PLA puro, foi possível observar, no segundo aquecimento, que houve uma diminuição da  $T_g$  com o aumento do tempo de contato com o micro-organismo. Fukushima et al.<sup>140</sup> atribuíram a redução da  $T_g$  ao efeito plastificante de oligômeros de ácido láctico, formados a partir do processo de degradação. Esses produtos de degradação de menor massa molar atuam como espaçadores intermoleculares, levando ao aumento da mobilidade da cadeia principal.

Foi possível observar nas mantas de PLA, no primeiro aquecimento, o deslocamento do pico exotérmico, com os dias de incubação, para temperatura mais baixas,  $T_{cc}$  de 90 °C para 77 °C, após 7 e 42 dias, respectivamente. Já nas blendas PLA/PEG 80:20, no primeiro aquecimento, a  $T_{cc}$  aumentou, de 67 °C para 79 °C, respectivamente de antes da incubação para após 7 dias de tratamento. Isto pode ser explicado ao fato de que uma porção do PEG foi dissolvido na presença de *Ágar Baird-Parker*, fazendo com que as blendas PLA/PEG, após 7 dias de incubação, apresentassem um valor de  $T_{cc}$  próximo ao da manta de PLA puro, resultados esses que corroboram com os encontrados no estudo de dissolução do PEG em PBS e em meio de cultura celular no item (5.2). O decréscimo da  $T_{cc}$  com o tempo de incubação nas fibras de PLA, pode está associado à cisão hidrolítica das cadeias e conseqüentemente, a formação de cadeias poliméricas de menor massa molar, que se ordenam mais facilmente comparadas as de maior massa molar.<sup>141</sup>

Não foi constatado deslocamento na  $T_m$ , no primeiro aquecimento, em função da degradação promovida nas mantas de PLA e na blenda.

A partir de 7 dias de incubação foi possível observar, no segundo aquecimento, a presença de dois picos de fusão cristalina em 144 e 150 °C. É conhecido que a presença de múltiplos picos de fusão em PLA pode estar relacionada à formação de diferentes estruturas cristalinas,<sup>142-144</sup> ou a populações de lamelas com diferentes graus de perfeição.<sup>145-149</sup> A presença de dois picos na fusão, no segundo aquecimento, pode ser um indicativo da formação de

diferentes cristais das cadeias, de menor e maior massa molar, formadas após o processo de degradação. Porém não é possível confirmar que a formação desses novos cristais é resultado da biodegradação, pois no segundo aquecimento o material perdeu seu histórico de térmico.

A FIGURA 5.13 e a TABELA 9 mostram os resultados da degradação térmica das mantas de PLA puro e da blenda de PLA/PEG 80:20 após a incubação com as bactérias.

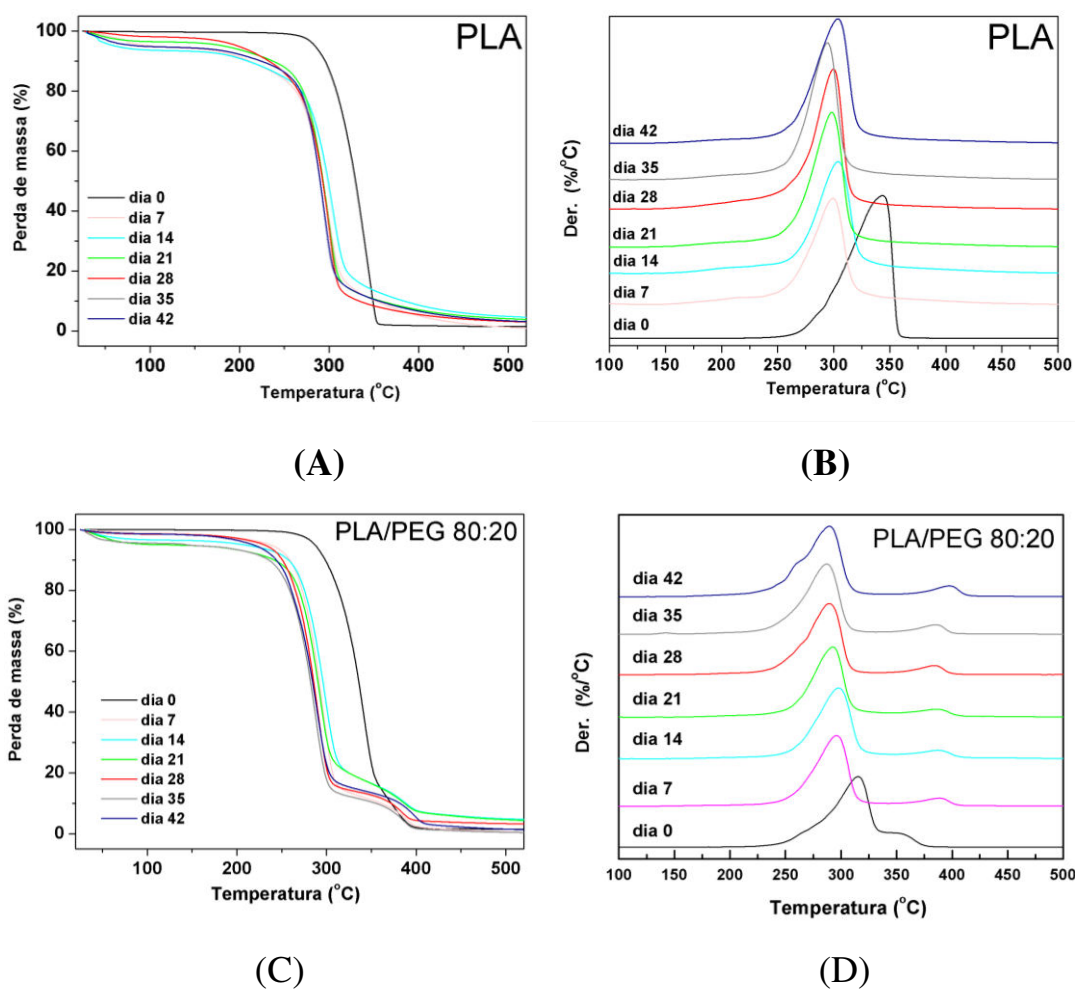


FIGURA 5.13 - Termograma das mantas de PLA e da blenda PLA/PEG 80:20 após a incubação com bactéria. (A,C) Curvas TGA relacionando perda de massa em função da temperatura e (B,D) curvas DTG relacionando a primeira derivada da variação de massa em função da temperatura. Atmosfera: ar sintético e taxa de aquecimento: 10 °C/minuto.

TABELA 9 - Valores do perfil de degradação térmica das mantas nanoestruturadas poliméricas de PLA e da blenda PLA/PEG 80:20 (m/m), após a incubação com as bactérias *S. aureus*.

| Mantas           | Dias | T início (°C) | T pico (°C) | T pico (°C) |
|------------------|------|---------------|-------------|-------------|
|                  |      | PLA           | PLA         | PEG         |
| PLA              | 0    | 295           | 343         | -           |
|                  | 7    | 262           | 299         | -           |
|                  | 14   | 268           | 303         | -           |
|                  | 21   | 268           | 297         | -           |
|                  | 28   | 277           | 298         | -           |
|                  | 35   | 277           | 294         | -           |
|                  | 42   | 270           | 303         | -           |
| PLA/PEG<br>80/20 | 0    | 272           | 316         | 355         |
|                  | 7    | 250           | 295         | 389         |
|                  | 14   | 255           | 296         | 388         |
|                  | 21   | 258           | 292         | 386         |
|                  | 28   | 252           | 289         | 385         |
|                  | 35   | 247           | 286         | 385         |
|                  | 42   | 242           | 289         | 398         |

Foi possível observar que o início de degradação térmica (*T pico*) do PLA e da blenda 80:20, após a incubação com as bactérias ocorreu em menores temperaturas como mostrado na TABELA 7, provavelmente, devido às rupturas das cadeias poliméricas de menor massa molar, formadas após a degradação.<sup>150-152</sup> As blendas 80:20, como descrito no item (5.2), apresentaram dois eventos térmicos. O pico mais evidente é referente ao PLA e segundo pico referente à degradação do segundo componente da blenda, o PEG.

A FIGURA 5.14 apresenta o espectro no infravermelho do PLA antes e após 7; 14; 21; 28; 35 e 42 dias de incubação com as bactérias *S. aureus*.

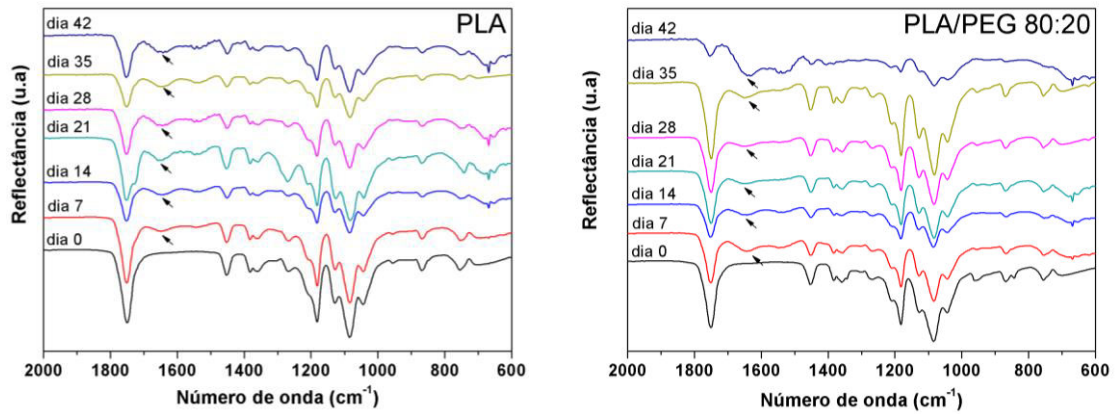


FIGURA 5.14 - Espectro de infravermelho em modo de reflectância total atenuada – (ATR) das fibras de PLA e das blendas PLA/PEG após 7; 14; 21; 28; 35 e 42 dias de incubação com as bactérias *S. aureus*.

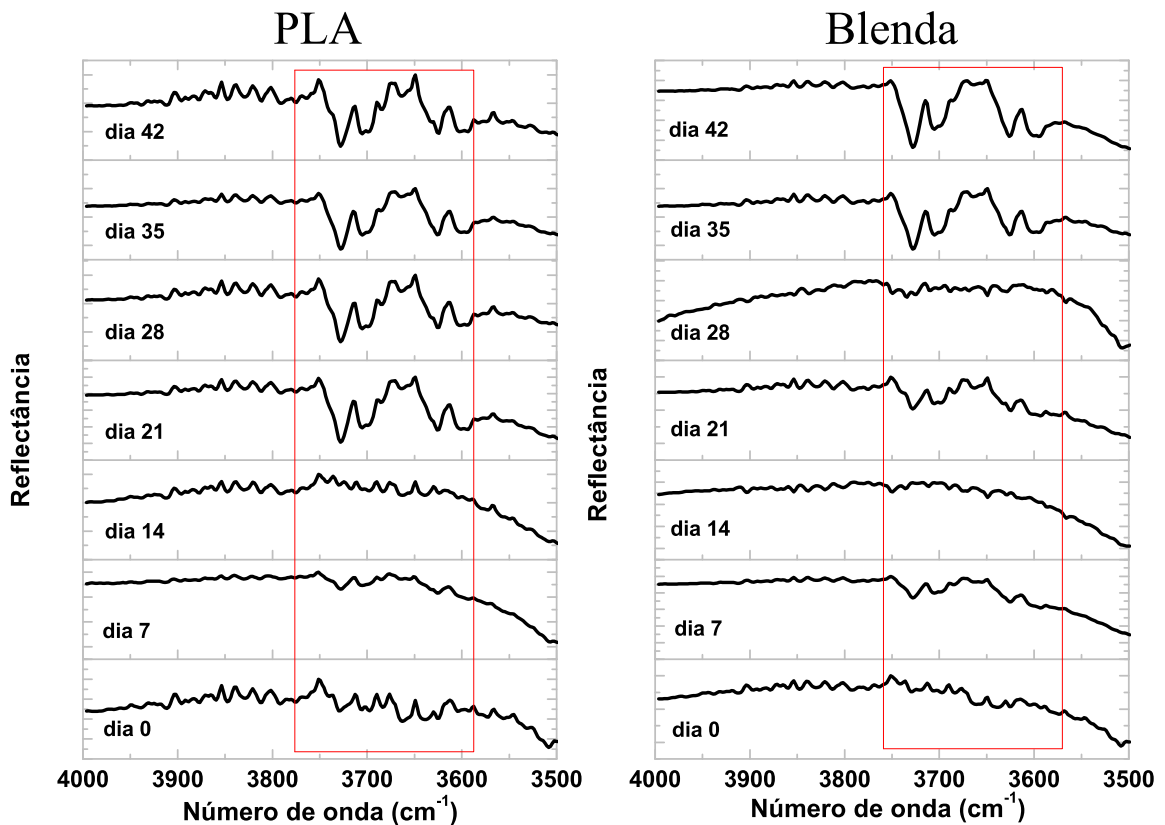


FIGURA 5.15 - Espectro de infravermelho em modo de reflectância total atenuada – (ATR) das fibras de PLA e das blendas PLA/PEG na região de 4000 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ , referente ao grupamento químico OH, após 7; 14; 21; 28; 35 e 42 dias de incubação com as bactérias *S. aureus*.

É possível observar o surgimento de uma banda na região entre 1670 - 1630  $\text{cm}^{-1}$  (indicada na FIGURA 5.14) atribuída a presença do grupo amida, referente aos resíduos de aminoácidos, devido à possível presença de estruturas enzimáticas durante o processo de degradação do polímero.

Na FIGURA 5.15 são apresentados os espectros das mantas de PLA e da blenda PLA/PEG 80:20 na região em 3500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$  referente ao grupo OH. Podemos observar um aumento das bandas, o que pode indicar um aumento da umidade na amostra e início de hidrólise.

Os resultados da biodegradação permitiram observar que houve degradação em função do tempo das fibras poliméricas por meio da ação das bactérias *S. Aureus* e estas consumiram primeiramente as regiões amorfas do PLA.

## **5.4 - Estudo da citotoxicidade *in vitro* das fibras poliméricas**

### **5.4.1 - Avaliação da citotoxicidade celular das células-tronco mesenquimais após a exposição das fibras poliméricas**

Devido ao o grande interesse da aplicação de materiais na medicina é necessário, primeiramente, que as células sejam capazes de interagir e aderir nestes suportes de interesse. Além disso, os novos biomateriais devem ser biocompatíveis, ou seja, não apresentar citotoxicidade.

As considerações éticas e metodológicas que envolvem as pesquisas de materiais para a aplicação na medicina têm reforçado o estudo das relações entre os experimentos *in vivo* e *in vitro*. As rígidas regras desenvolvidas pelas entidades protetoras de animais, em relação ao seu uso em laboratório, foram decisivas para o desenvolvimento de estudos de métodos viáveis de análise *in vitro*. De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), o teste de citotoxicidade *in vitro* é o

primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos.<sup>8</sup> Dessa forma, o primeiro estudo desse trabalho nesta linha foi avaliar a citotoxicidade *in vitro* das fibras poliméricas, mensurada por meio da análise da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH), e realizar a análise da atividade enzimática desidrogenase mitocondrial.

O ensaio de liberação de LDH é baseado na medida da atividade da enzima lactato desidrogenase no meio extracelular. A presença de LDH no meio de cultura é um indicador de morte celular, pois indica o rompimento da membrana celular.

A FIGURA 5.16 apresenta os resultados obtidos por meio do ensaio de liberação de LDH no meio de cultura após o período de 1, 7 e 15 dias de tratamento das células-tronco mesenquimais com as fibras de PLA e com as blendas poliméricas de PLA/PEG. Os resultados obtidos após o tratamento foram comparados com os resultados das células-tronco sem tratamento (controle negativo) como também com as células tratadas com Triton X-100 (controle positivo).

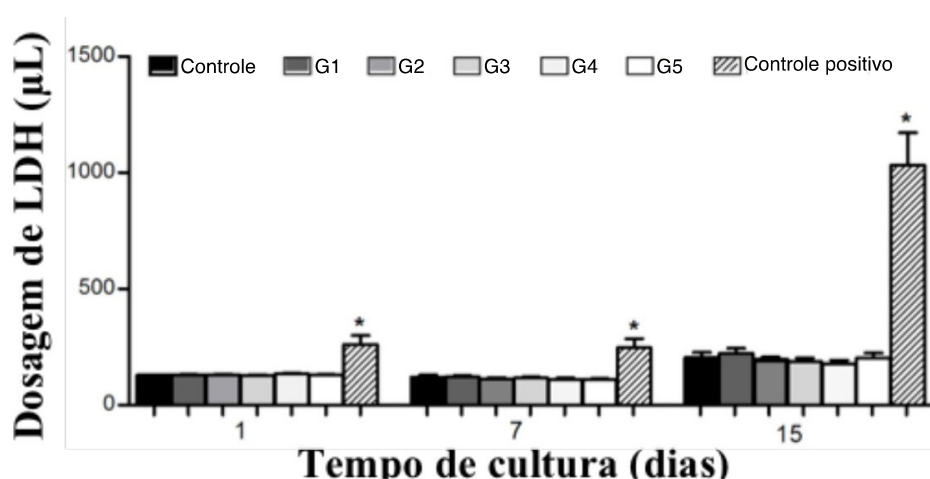


FIGURA 5.16 - Avaliação da citotoxicidade celular por meio do teste da dosagem da enzima citoplasmática LDH após 1, 7 e 15 dias de cultura. Controle negativo; Controle positivo; (G1) PLA; (G2) 99/1; (G3) 95/5; (G4) 90/10; (G5) 80/20. Asterisco indica diferença estatística ( $P < 0.05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's.

A dosagem da enzima LDH no meio de cultura das células-tronco mesenquimais tratadas com as diferentes fibras poliméricas foi comparada com os valores encontrados no meio de cultura do controle negativo e positivo. A média dos valores de LDH após 1 e 7 dias de cultura das células na presença das fibras poliméricas, assim como no controle negativo, foi de 120 U/L. No meio de cultura das células do controle positivo (poço tratado com Triton-X 100) foi encontrado valores de LDH de 250 U/L. Após 15 dias de cultura, a média dos valores de LDH no meio de cultura das células-tronco sobre as fibras poliméricas, bem como o controle negativo foram de 190 U/L. O grupo do controle positivo revelou, como esperado, um aumento significativo de 1032,1 U/L de LDH.

Claramente foi observado que após 1, 7 e 15 dias de cultivo as dosagens da enzima LDH das células-tronco tratadas com as fibras poliméricas tiveram valores similares comparado aos valores do controle negativo e, por meio da análise estatística, não mostraram diferenças significativas, dessa forma, não apresentando morte celular ocasionada pelas fibras.

#### **5.4.2 - Avaliação da viabilidade celular das células-tronco mesenquimais após a exposição das fibras poliméricas**

A viabilidade celular das células-tronco mesenquimais cultivadas com fibras de PLA e com as blendas de PLA/PEG foram analisadas por meio do teste de MTT. O MTT é um teste colorimétrico para medição da atividade enzimática (desidrogenase mitocondrial) por meio da redução do corante MTT a produtos cromogênicos artificiais corados chamados de “cristais de formazan”. Esses cristais foram eluídos e mensurados em um espectrofotômetro.

Os resultados obtidos após 1, 7 ou 15 dias de cultura são apresentados na FIGURA 5.17.



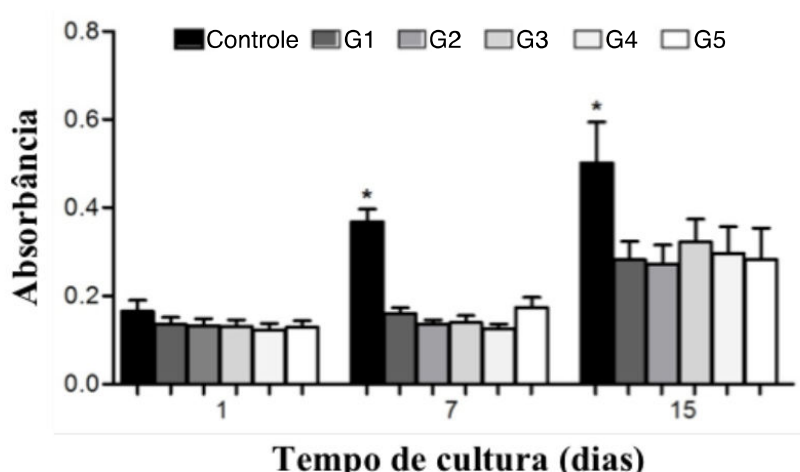


FIGURA 5.17 - Avaliação da viabilidade celular por meio do teste de MTT. Grupo controle; (G1) PLA; (G2) 99/1; (G3) 95/5; (G4) 90/10; (G5) 80/20. Asterisco indica diferença estatística ( $P < 0.05$ ) de acordo com o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's.

Foi possível observar que as células-tronco mesenquimais foram capazes de proliferar quando cultivadas nas fibras poliméricas de PLA e nas blendas de PLA/PEG. Todas as composições de fibras permitiram o crescimento celular não apresentando diferenças significativas entre as fibras de PLA puro e as blendas poliméricas.

As células-tronco mesenquimais cultivadas nas fibras poliméricas apresentaram menor viabilidade quando comparadas ao grupo controle e, além disso, após 15 dias de cultura, apresentaram diferenças significativas nos valores de absorbância, indicando que as fibras poliméricas não induziram a proliferação celular. Esse comportamento do grupo controle era esperado, uma vez que as superfícies das placas de cultura são desenvolvidas para que as células sejam capazes de se aderir e realizar suas funções.

## **5.5 - Análise da resposta pré-inflamatória *in vitro***

Os resultados obtidos com o estudo das células-tronco mesenquimais mostraram a não citotoxicidade das fibras poliméricas. Sendo assim, foi levantada a hipótese de que apesar das fibras poliméricas não serem tóxicas, elas poderiam provocar inicialmente reações no comportamento celular e, poderiam conseqüentemente promover estímulos celulares acarretando respostas inflamatórias. Dessa forma, surgiu a necessidade de avaliar a resposta da interação das células do sistema imunológico inato, como por exemplo, as células dendríticas (DCs), com as fibras poliméricas.

### **5.5.1 - Interação das células dendríticas com as fibras poliméricas**

A interação das células com as superfícies dos biomateriais é de extrema importância na efetividade da engenharia de tecido, podendo definir a presença de reações de incompatibilidade que podem resultar na rejeição do biomaterial. Para o sucesso da Engenharia de Tecidos, é necessário que haja uma forte interação entre o biomaterial e o meio que o rodeia.<sup>153</sup> A resposta celular depende inicialmente da interação de receptores de adesão de membrana com a superfície do biomaterial. Essas respostas celulares como adesão, mudança morfológica são principalmente determinadas por meio das características de superfície do substrato. Dessa forma, foi analisado a resposta das células dendríticas após 24 e 48 horas de cultura nas fibras poliméricas de PLA e das blendas PLA/PEG. Os resultados foram analisados por meio da microscopia eletrônica de varredura e microscopia de fluorescência e, estão mostrados na FIGURA 5.18, FIGURA 5.19, FIGURA 5.20.

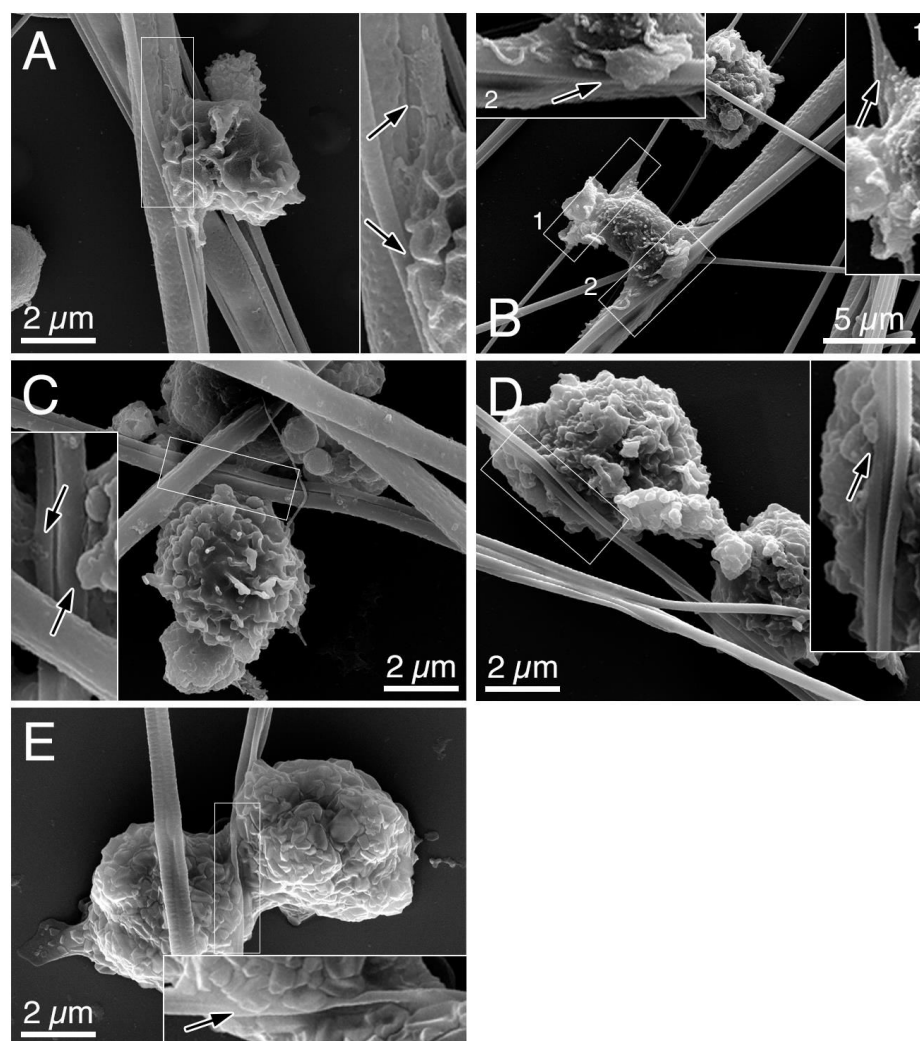


FIGURA 5.18 - Micrografias obtidas por MEV das fibras poliméricas após 24 horas de cultura com as células dendríticas imaturas. (A) PLA; (B) 99:1; (C) 95:5; (D) 90:10 e (E) 80:20. As inserções mostram as interações das DCs com as fibras poliméricas por meio da extensão celular.

Por meio das micrografias apresentadas, foi possível observar que as células dendríticas estão em contato com uma única fibra como também em múltiplas fibras adjacentes de PLA e com as blendas de PLA/PEG. Foi possível observar claramente, nas setas indicadas na FIGURA 5.18 que a interação é realizada por meio de extensões da membrana plasmática (FIGURA 5.18 A-E), essas observações indicam que as células interagiram rapidamente (24 horas de cultura) e responderam a topografia das diferentes composições de fibras

poliméricas. A interação ocorre por meio de um processo complexo que envolve modificações na morfologia celular, em consequência de alterações no citoesqueleto, criando assim uma melhor interação com o substrato.

Uma vez que ocorreu a interação das fibras poliméricas com as células, é importante elucidar quais mecanismos moleculares estão envolvidos nessas interações. Uma variedade de mecanismos de adesão celular são responsáveis pela união das células, juntamente com suas conexões com o citoesqueleto interno.<sup>81</sup> O remodelamento do citoesqueleto de actina desempenha um papel crucial na adesão e motilidade de várias células imunitárias. Para caracterizar as interações das células dendríticas imaturas (iDCs) com as fibras poliméricas, foram investigados, por meio da microscopia de fluorescência, a presença das proteínas de membrana, a actina e a vinculina e são apresentados na FIGURA 5.19.

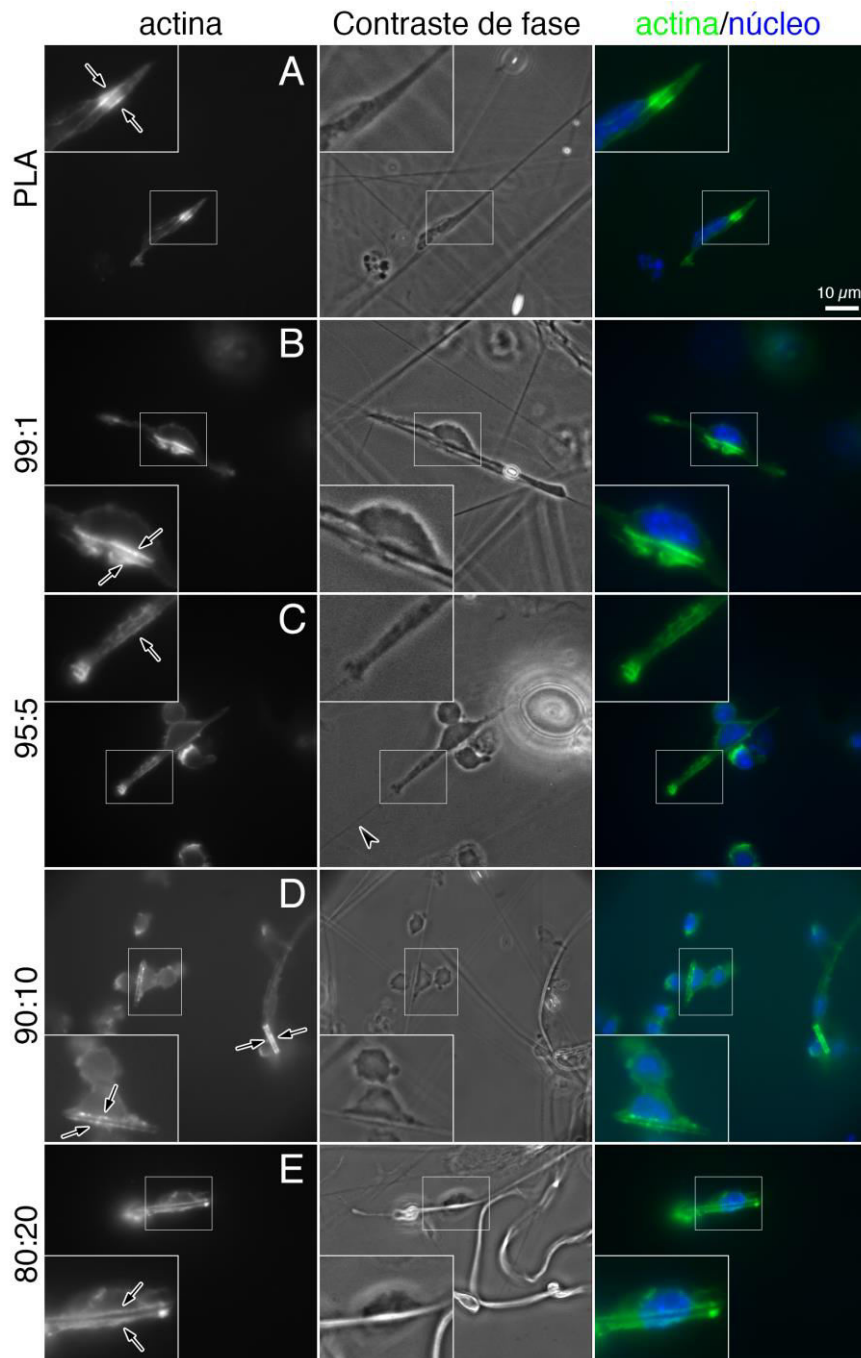


FIGURA 5.19 - Micrografias obtidas com microscopia de fluorescência mostrando a distribuição dos microfilamentos de actina das células dendríticas em contato com as fibras poliméricas. As DCs foram cultivadas nas fibras durante 24 horas, fixadas e marcadas com faloidina, para corar a actina e Hoechst para corar o núcleo. A inserção mostra os filamentos de actina nos locais de contato entre células e as fibras (indicado pelas setas).

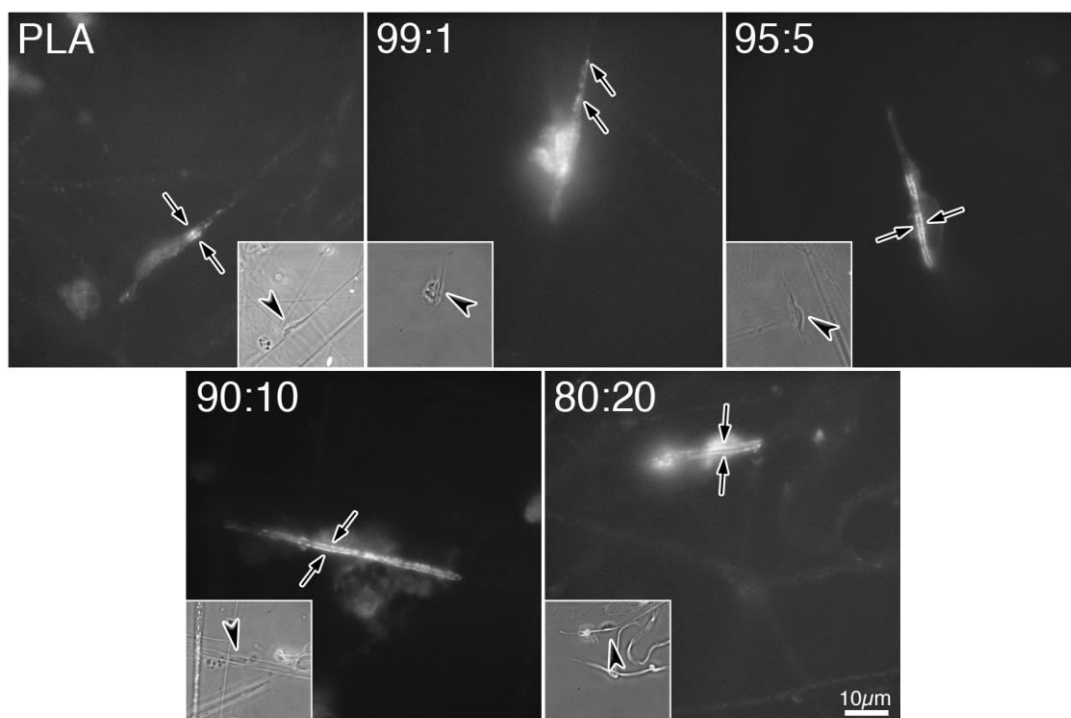


FIGURA 5.20 - Micrografias obtidas com microscopia de fluorescência mostrando a distribuição de vinculina das células dendríticas em contato com as fibras poliméricas. As DCs foram cultivadas nas fibras durante 24 horas, fixadas e marcadas com anticorpo anti-vinculina, para corar a vinculina. A inserção mostra os filamentos nos locais de contato entre células e as fibras (indicado pelas setas).

A FIGURA 5.19 e FIGURA 5.20 mostram claramente que as células estão interagindo por meio das proteínas actina e vinculina nas fibras de PLA e nas blendas de PLA/PEG. Na FIGURA 5.19, foi possível observar, uma acumulação de pequenos fragmentos de actina organizados no sítio de interação entre as DCs e as fibras poliméricas. Na primeira coluna está representado a expressão dos pontos de actina. As setas estão indicando os pontos de actina formados por meio da interação das células com as fibras poliméricas. A segunda coluna representa a microscopia de contraste de fase onde é possível observar as DCs nas fibras poliméricas. Na terceira coluna podemos observar o núcleo das células em azul e os pequenos fragmentos de actina em verde. Corroborando com essa observação, foi observado também, na FIGURA 5.20

pontos de expressão da vinculina na interface das células e das fibras poliméricas.

A adesão das células na matriz extracelular é crucial em uma ampla gama de fenômenos biológicos, os quais são fundamentais para a regeneração dos tecidos, nas respostas imunológicas e para a migração.<sup>154,155</sup> A adesão das células é realizada por meio da organização e a montagem de diversas proteínas. O início desse processo é denominado *clustering* de integrinas, que é associado a um complexo sinalizador que promove a organização dos filamentos de actina.<sup>156,157</sup> As integrinas estão ligadas aos filamentos de actina no citoesqueleto por meio de diversas proteínas, as quais são a talina,  $\alpha$ -actinina, vinculina e paxilin.<sup>155,158,159</sup>

Estes resultados foram particularmente importantes para confirmar que as células dendríticas tiveram contato com as diferentes fibras poliméricas por meio da distribuição de extensões celulares.

### **5.5.2 - Motilidade das células dendríticas nas fibras poliméricas**

As DCs são células apresentadoras de antígenos (APC), a sua principal função é a capacidade de migrar para os órgãos periféricos a procura de antígenos. Dessa forma, é de particular interesse compreender os efeitos na migração das DCs na presença dos materiais estudados. Neste contexto, foi avaliado o comportamento da motilidade das células dendríticas quando cultivadas com as fibras poliméricas. As análises da motilidades celular foram obtidas por meio da microscopia de contraste de fase e são mostradas na FIGURA 5.21.

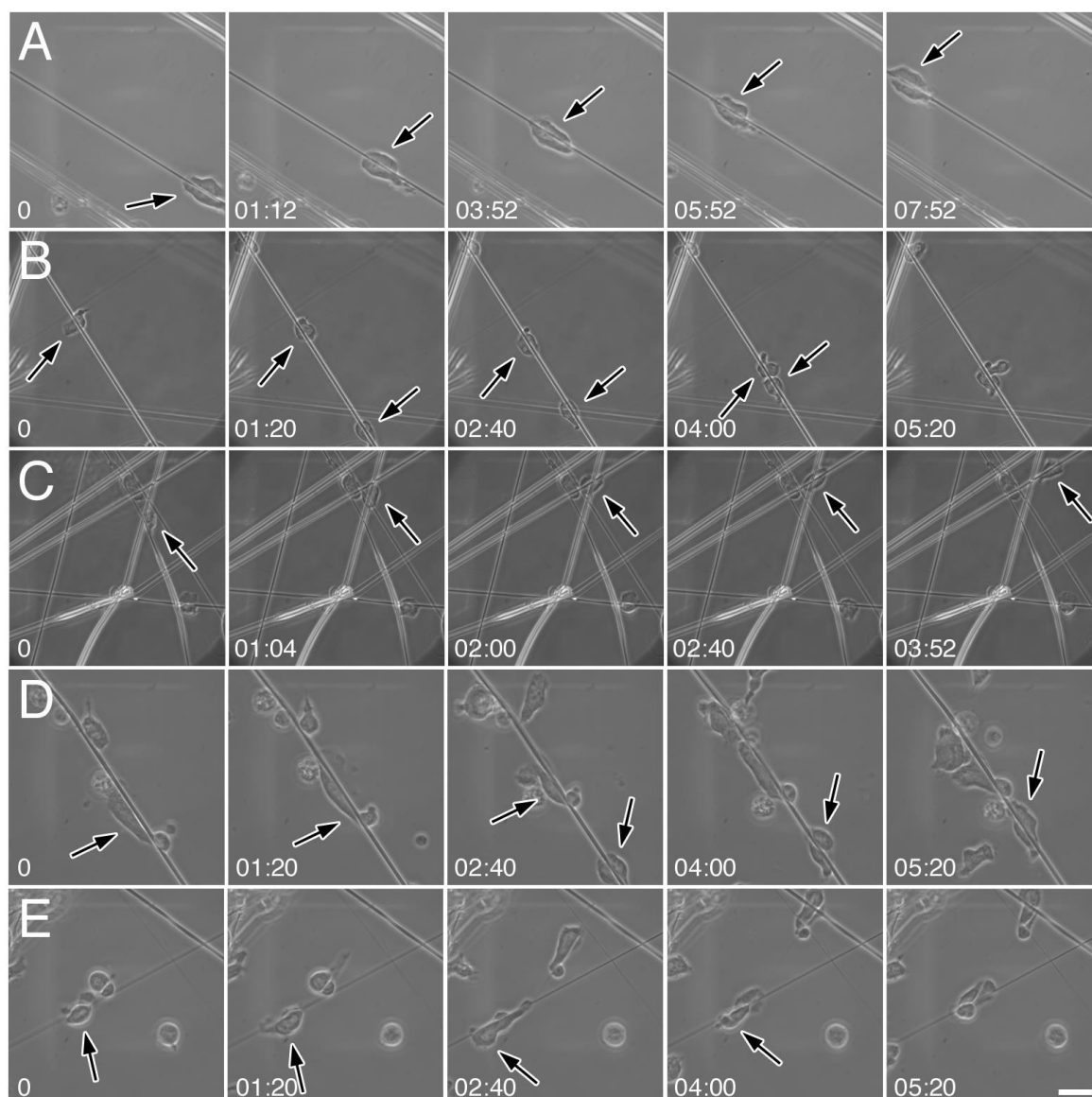


FIGURA 5.21 - Micrografias obtidas por microscopia de contraste de fase mostrando a motilidade das células dendríticas nas fibras poliméricas produzidas por meio da técnica de SBS (A) PLA; (B) 99: 1; (C) 95: 5; (D) 90:10 e (E) 80:20. As DCs foram cultivadas nas fibras poliméricas durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em meio de cultura. As imagens foram adquiridas a cada 7 segundos. Escala 10 μm.

A motilidade celular ocorre por meio da organização de algumas proteínas do citoesqueleto como também por meio da dinâmica dos filamentos de actina do córtex celular. Na dinâmica de polimerização/despolimerização dos filamentos de actina, a célula pode estender sua membrana sobre o substrato em



que se encontra, formando estruturas conhecidas como lamelipódios. A protusão dos lamelipódios, seguida da adesão da membrana celular ao substrato, associada ao deslocamento e retração ao lado oposto da célula, constituem o mecanismo básico da motilidade celular.

Para o sucesso da regeneração de tecidos vários tipos de células devem migrar para o local lesionado de uma maneira altamente coordenada. Neste contexto, o desenvolvimento de materiais capazes de guiar e orientar as células aumentaria consideravelmente a eficiência e a velocidade do processo de cicatrização.

Os resultados de adesão celular apresentados no item (5.5.1) indicaram que ocorreu uma re-modelação do citoesqueleto da actina, que é um pré-requisito essencial para a motilidade celular. Foi possível observar que as células dendríticas apresentaram motilidade nas fibras de PLA e nas blendas PLA/PEG apresentadas na FIGURA 5.21. As DCs se moveram nas fibras independentemente do diâmetro, movendo-se ao longo de uma única fibra como também movendo-se para as fibra adjacentes por um processo dinâmico. Dessa forma, os resultados indicam que as fibras poderão ser utilizadas como ferramentas para suportar e orientar a motilidade celular.

### **5.5.3 - Reconhecimento do biomaterial por meio da determinação de moléculas co-estimulatórias presentes na membrana das células dendríticas**

A principal função das células dendríticas é reconhecer e processar o antígenos, devolvê-lo à sua superfície e apresentá-lo às outras células do sistema imunitário. Essa habilidade está associada com o estado de “maturação” desta célula. Perante os estímulo externos, as DCs sofrem um processo de maturação, onde há alteração do fenótipo que se traduz pela produção de

citocinas, quimiocinas e pela expressão aumentada de moléculas co-estimuladoras, CD40, CD80 e CD86, e as moléculas do *complexo major de histocompatibilidade* (MHC) II.<sup>160</sup> As moléculas CD (*cluster of differentiation*) se referem a uma coleção de anticorpos monoclonais que são específicos para os diferentes marcadores linfocitários. O sistema CD fornece uma maneira uniforme de identificar as moléculas nas superfícies dos linfócitos, das APCs e outros tipos de células do sistema imunológico.

Para determinar se as fibras de PLA e as blendas de PLA/PEG promoveram a maturação fenotípica das DCs após 24 e 48 horas de cultura, a presença das moléculas de superfície foi analisada por meio da técnica de citometria de fluxo. A fluorescência dos marcadores de superfícies, após a cultura das DCs com as fibras, foram comparadas com os valores obtidos no controle negativo, ou seja, as células cultivadas somente na placa de cultura (DCs imaturas) como também, com valores obtidos no controle positivo, as células estimuladas com LPS (DCs maduras). Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 5.22.

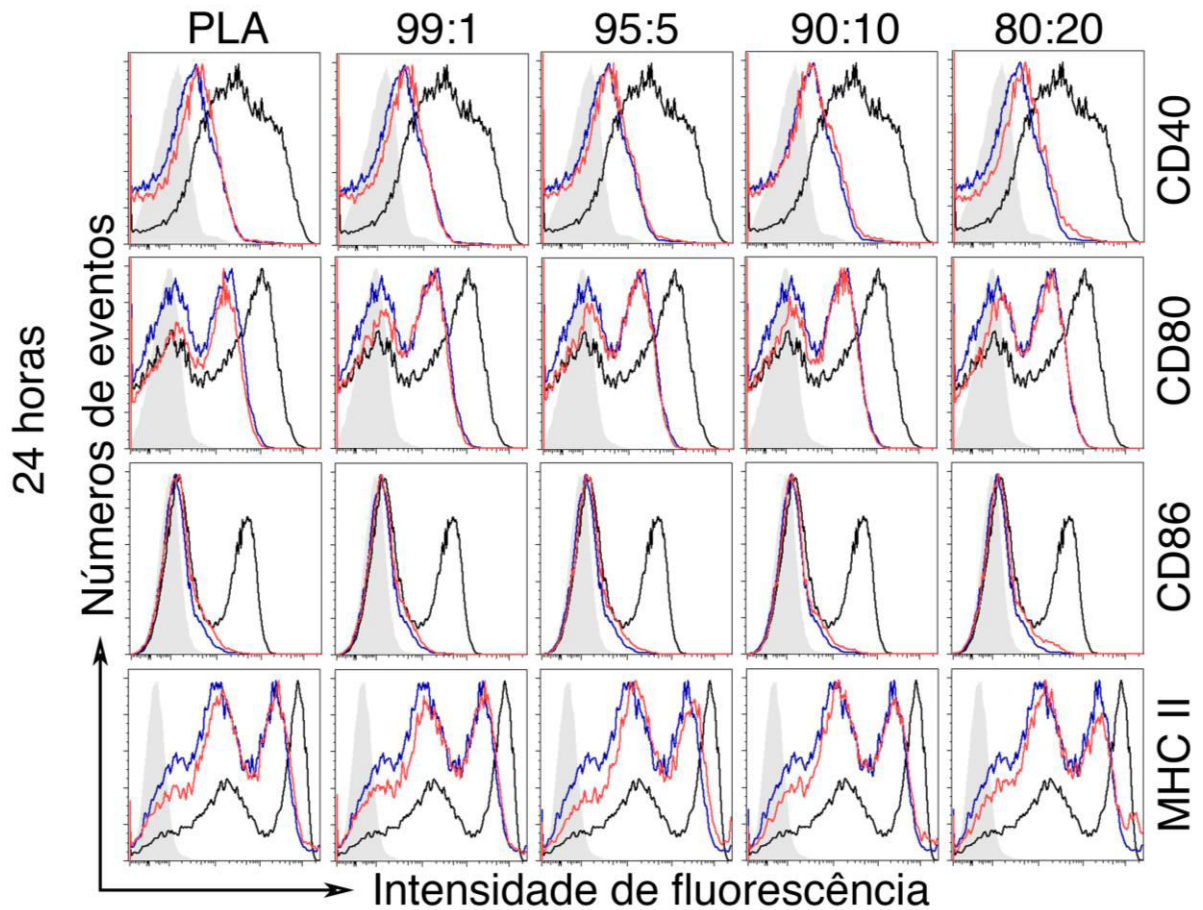


FIGURA 5.22 - Histograma representativo dos resultados obtidos por meio da citometria de fluxo da expressão das moléculas co-estimuladoras, CD40, CD80, CD86 e da molécula MHC classe II. Foram realizados três experimentos independentes e, cada experimento, foi realizado em triplicata. Os resultados obtidos foram semelhantes em todos os experimentos. Os histogramas preenchidos em cinza representam as amostras não marcadas, os histogramas vermelhos representam as DCs maduras, estimuladas com LPS, (grupo controle positivo), os histogramas em preto representam as DC imaturas (grupo controle negativo) e os azuis são as DCs cultivadas com as fibras poliméricas.

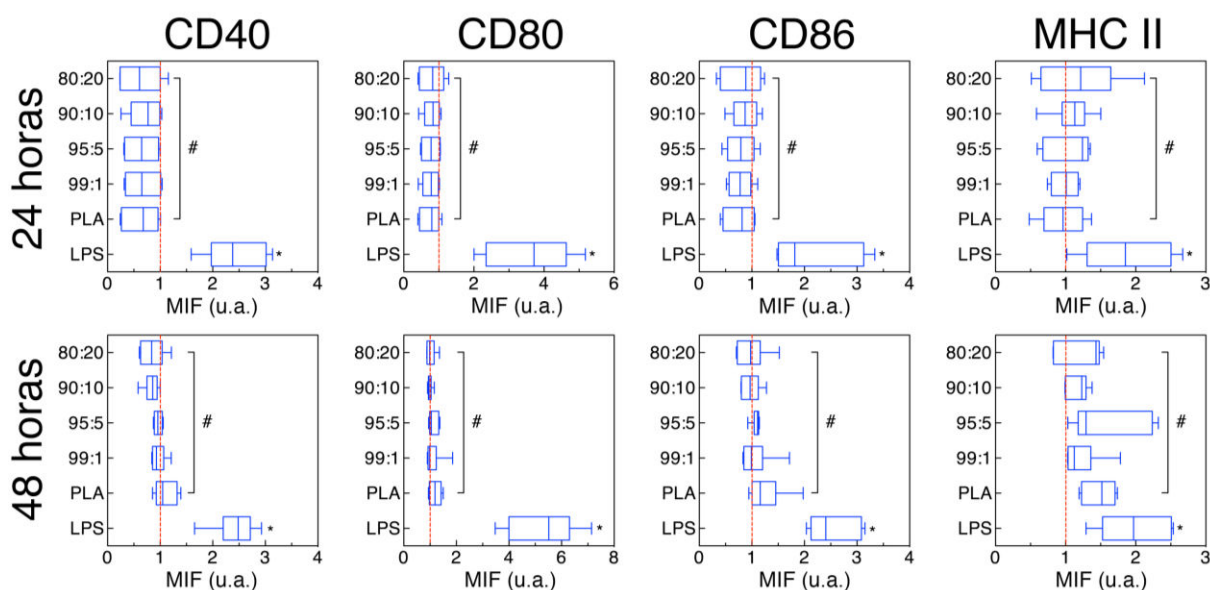


FIGURA 5.23 - Média geométrica da intensidade de fluorescência (MIF) da análise de citometria de fluxo das moléculas co-estimulatórias e do MHC de classe II das DCs tratadas com fibras poliméricas. O controle negativo foi utilizado para normalização (linha cinza). A linha no meio da caixa indica a mediana, o topo da caixa indica o 75° quartil, enquanto o fundo da caixa indica o 25° quartil. Os *whiskers* representam o percentil 10 (inferior) e 90 (superior), respectivamente. Asteriscos indicam o aumento significativo na expressão dos marcadores de superfície ( $p < 0,05$ ).

Conforme observado nos histogramas representativos obtidos por meio da técnica de citometria de fluxo (FIGURA 5.23), as DCs imaturas do grupo controle negativo expressaram baixos níveis de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias. Após a estimulação das células com LPS, um componente da parede celular de bactérias, resultou em um aumento acentuado na expressão de MHC de classe II e das moléculas co-estimulatórias, indicando a maturação das células dendríticas. Foi possível observar que as DCs tratadas com as fibras de PLA e com as blendas poliméricas apresentaram comportamento semelhante aos valores do grupo controle negativo, baixos níveis de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias. Dessa forma, foi possível concluir que as fibras poliméricas não induziram a maturação das

células dendríticas. O que indica que as fibras são imunologicamente inertes, pois as DCs não reconheceram as fibras como antígenos. Dessa forma, não recrutariam as outras células do sistema imunológico resultando em um processo inflamatório.

#### **5.5.4 - Análise da produção de citocinas inflamatórias em resposta as fibras poliméricas**

Como mencionado anteriormente, a maturação das células dendríticas, está relacionada com a expressão de moléculas de superfície, como também a produção de citocinas pré-inflamatórias. As diferentes citocinas produzidas e secretadas nas células dendríticas maduras (DCm) são as IL-6, IL-10, IL-12p70, Rantes, IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  e estas desempenham um papel crucial na regulação da resposta imune.

Os resultados mostram que as iDCs tratadas com fibras poliméricas secretaram quantidades mais baixas de citocinas, quando comparadas com as secretadas pelas DCs tratadas com LPS (FIGURA 5.24). Em geral, as tendências do perfil das citocinas das DCs tratadas com as fibras foram semelhantes quando comparadas com as liberadas por iDCs (controle negativo), corroborando com os resultados obtidos com a análise das moléculas co-estimulatórias.

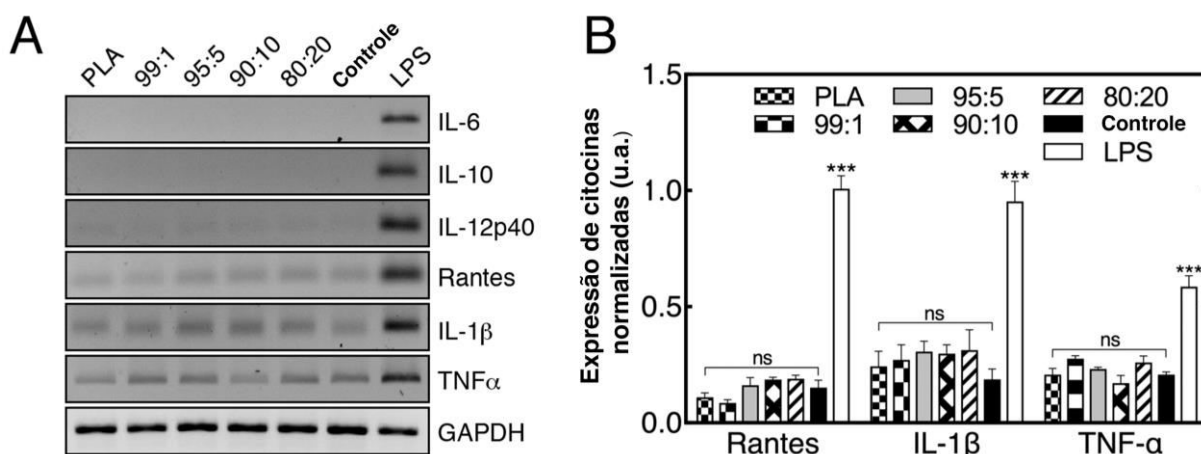


FIGURA 5.24 - Análise da expressão das citocinas liberadas pelas DCs em resposta as fibras poliméricas. (A) Gel de agarose da RT-PCR representativo que mostra a expressão de IL-6, IL-10, IL-12p40, RANTES, IL-1b e TNF $\alpha$  das DCs incubadas com fibras poliméricas. O gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi empregado como controle endógeno na análise. O controle negativo representa as DCs sem tratamento (iDCs), enquanto o controle positivo representa as DCs tratadas com LPS (mDCs). (B) Quantificação da expressão de citoquinas foi realizada três RT-PCR independentes. Os valores foram normalizados para os níveis de expressão de GAPDH. Os asteriscos (\*\*\*) indicam  $p < 0,0001$  e o (ns): indica não significativo.

Alguns trabalhos reportados na literatura,<sup>68,69,161-163</sup> avaliaram a resposta das células do sistema imunológico após o tratamento com filmes ou partículas de poli(ácido lactico-co-glicólico) (PLGA). Os autores reportaram que as células do sistema imunológico foram ativadas quando cultivadas com o PLGA. Yoshida e Babensee,<sup>68</sup> reportaram que os níveis de moléculas co-estimulatórias secretadas por DCs derivadas de humanos apresentaram níveis mais elevados quando expostas à nanopartícula de PLGA, quando comparadas com o tratamento com filmes de PLGA. Este aumento dos níveis de molécula de superfície pode ser explicado devido ao fato das DCs serem capazes de fagocitar e, dessa forma, reconhecer as nanopartículas como um corpo estranho. Noutro

estudo,<sup>72</sup> os autores concluíram que as DCs derivadas de animais fagocitam as nanopartículas, mas não foram capazes de distinguir as duas formas, filme ou partícula, sendo que ambas as superfícies ativaram as DCs imaturas.

Podemos observar nestes estudos que os trabalhos na literatura reportam que materiais constituídos por poli (ácido lático) podem ativar a maturação das DCs ou a estimulação dos macrófagos, podendo assim, desencadear a resposta inflamatória. Neste trabalho de doutorado, foi possível observar que o PLA não ativou a maturação das DCs, dessa forma, indicando que a morfologia e a nanoestrutura do substrato podem ser determinantes na biocompatibilidade de um material.

## 6 - CONCLUSÕES

Nesta tese de doutorado foram desenvolvidas com êxito mantas de fibras poliméricas de PLA e de blendas de PLA/PEG utilizando a nova técnica de fiação de sopro em solução.

Neste trabalho foi demonstrado que as blendas de PLA/PEG, apresentaram diferentes propriedades quando comparadas com fibras de PLA puro. Foi observado a diminuição do diâmetro das fibras e maior porosidade das mantas, com a adição de um polímero de menor massa molar.

O espectro de infravermelho das blendas de PLA/PEG permitiram observar o aumento da intensidade em  $2880\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao alongamento CH, confirmando a presença de PEG nas blendas poliméricas. Além disso, o aumento da proporção de PEG nas blendas PLA/PEG resultou em fibras mais hidrofílicas.

O PEG foi essencial para melhorar as características do material PLA como biomaterial. Dessa forma, a capacidade de controlar as propriedades das fibras poliméricas poderá ser uma abordagem importante para o desenvolvimento de biomateriais adaptáveis às diversas aplicações clínicas.

As fibras de PLA e as fibras das blendas de PLA/PEG não apresentaram citotoxicidade para as células-tronco mesenquimais. Um grande desafio associado com o uso de materiais em aplicações clínicas é que induzem reação imune no local de implantação. Devido a função das células dendríticas na regulação da resposta imune, não é surpreendente que estas células reagem aos biomateriais. Diversos estudos, com diferentes materiais poliméricos demonstraram que as células dendríticas induziram a resposta inflamatória. Neste trabalho, mostrou-se que as fibras de PLA e de PLA/PEG não induziram a maturação das células dendríticas. As fibras não alteraram a maturação das células dendríticas, que manteve seu fenótipo imaturo após interação com fibras. Os ensaios *in vitro*, demonstraram que as fibras suportaram a adesão e motilidade de células dendríticas. Assim, com base nos resultados obtidos, as fibras



poderão servir como suportes adaptáveis e flexíveis, imunologicamente inertes, para aplicações clínicas como na regeneração de tecidos os quais requerem a regulação precisa da adesão celular e da migração. Assim, o desenvolvimento de materiais capazes de coordenar a migração celular poderá melhorar a eficiência da regeneração tecidual. Dessa forma, podemos concluir que as fibras podem servir no desenvolvimento de dispositivos biomédicos. Do ponto de vista da compreensão da adesão celular e motilidade, a topografia e o arranjo geométrico em três dimensões podem ser explorados para regular a adesão celular e a motilidade.

Acreditasse que esses estudos tenham contribuído no conhecimento do desenvolvimento de novos materiais com o objetivo de ajustar as respostas biológicas como a compreensão das complexas interações célula/material. Acreditamos que as fibras produzidas por SBS são altamente adaptáveis e que podem ser facilmente projetadas, ajustando suas propriedades físico-químicas para mimetizar microambientes nativos necessário para a regulação da função celular no destino desejado.

## REFERÊNCIAS

- (1) Nakamura, S.; Ijima, H. Solubilized Matrix Derived from Decellularized Liver as a Growth Factor-Immobilizable Scaffold for Hepatocyte Culture. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *116*, 746–753.
- (2) Organization, W. H.; others. A WHO Plan for Burn Prevention and Care. **2008**.
- (3) 2017 U.S. Organ and Tissue Transplant Cost Estimates and Discussion. [www.milliman.com/insight/2017/2017-U\\_S\\_-organ-and-tissue-transplant-cost-estimates-and-discussion/](http://www.milliman.com/insight/2017/2017-U_S_-organ-and-tissue-transplant-cost-estimates-and-discussion/), acessado em Setembro, 2017.
- (4) Fuchs, J. R.; Nasserri, B. A.; Vacanti, J. P. Tissue Engineering: A 21st Century Solution to Surgical Reconstruction. *Ann. Thorac. Surg.* **2001**, *72* (2), 577–591.
- (5) Salatin, S.; Barar, J.; Barzegar-Jalali, M.; Adibkia, K.; Jelvehgari, M. Thermosensitive in Situ Nanocomposite as an Intranasal Delivery System of Rivastigmine Hydrogen Tartrate: Development, Characterization, Ex Vivo Permeation and Cellular Studies. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**.
- (6) Kluin, J.; Talacua, H.; Smits, A. I. P. M.; Emmert, M. Y.; Brugmans, M. C. P.; Fioretta, E. S.; Dijkman, P. E.; Söntjens, S. H. M.; Duijvelshoff, R.; Dekker, S.; et al. In Situ Heart Valve Tissue Engineering Using a Bioresorbable Elastomeric Implant – From Material Design to 12 Months Follow-up in Sheep. *Biomaterials* **2017**, *125*, 101–117.
- (7) Raeisdasteh Hokmabad, V.; Davaran, S.; Ramazani, A.; Salehi, R. Design and Fabrication of Porous Biodegradable Scaffolds: A Strategy for Tissue Engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2017**, *28* (16), 1797–1825.
- (8) Cao, Y.; Croll, T. I.; Lees, J. G.; Tuch, B. E.; Cooper-White, J. J. Scaffolds, Stem Cells, and Tissue Engineering: A Potent Combination! *Aust. J. Chem.* **2005**, *58*, 691.
- (9) Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; Maekawa, T.; Kumar, D. S. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, *2011*, 1–19.
- (10) Alaribe, F. N.; Manoto, S. L.; Motaung, S. C. K. M. Scaffolds from Biomaterials: Advantages and Limitations in Bone and Tissue Engineering. *Biologia (Bratisl.)* **2016**, *71* (4).
- (11) Chan, B. P.; Leong, K. W. Scaffolding in Tissue Engineering: General Approaches and Tissue-Specific Considerations. *Eur. Spine J.* **2008**, *17* (S4), 467–479.

- (12) Jiang, T.; Carbone, E. J.; Lo, K. W.-H.; Laurencin, C. T. Electrospinning of Polymer Nanofibers for Tissue Regeneration. *Prog. Polym. Sci.* **2015**, *46*, 1–24.
- (13) Kim, D.-H.; Provenzano, P. P.; Smith, C. L.; Levchenko, A. Matrix Nanotopography as a Regulator of Cell Function. *J. Cell Biol.* **2012**, *197* (3), 351–360.
- (14) Bettinger, C. J.; Langer, R.; Borenstein, J. T. Engineering Substrate Topography at the Micro- and Nanoscale to Control Cell Function. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5406–5415.
- (15) Li, J.-R.; Shi, L.; Deng, Z.; Lo, S. H.; Liu, G. Nanostructures of Designed Geometry and Functionality Enable Regulation of Cellular Signaling Processes. *Biochemistry (Mosc.)* **2012**, *51* (30), 5876–5893.
- (16) Behrens, A. M.; Kim, J.; Hotaling, N.; Seppala, J. E.; Kofinas, P.; Tutak, W. Rapid Fabrication of poly(DL-Lactide) Nanofiber Scaffolds with Tunable Degradation for Tissue Engineering Applications by Air-Brushing. *Biomed. Mater.* **2016**, *11*, 35001.
- (17) Xu, C.; Inai, R.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. Electrospun Nanofiber Fabrication as Synthetic Extracellular Matrix and Its Potential for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Eng.* **2004**, *10*, 1160–1168.
- (18) Pham, Q. P.; Sharma, U.; Mikos, A. G. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 1197–1211.
- (19) Schindler, M.; Ahmed, I.; Kamal, J.; Nur-E-Kamal, A.; Grafe, T. H.; Young Chung, H.; Meiners, S. A Synthetic Nanofibrillar Matrix Promotes in Vivo-like Organization and Morphogenesis for Cells in Culture. *Biomaterials* **2005**, *26*, 5624–5631.
- (20) Medeiros, E. S.; Glenn, G. M.; Klamczynski, A. P.; Orts, W. J.; Mattoso, L. H. C. Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *113*, 2322–2330.
- (21) Tutak, W.; Sarkar, S.; Lin-Gibson, S.; Farooque, T. M.; Jyotsnendu, G.; Wang, D.; Kohn, J.; Bolikal, D.; Simon, C. G. The Support of Bone Marrow Stromal Cell Differentiation by Airbrushed Nanofiber Scaffolds. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2389–2398.
- (22) Oliveira, J. E.; Mattoso, L. H. C.; Orts, W. J.; Medeiros, E. S. Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2013**, *2013*, 1–14.

- (23) Thompson, C. J.; Chase, G. G.; Yarin, A. L.; Reneker, D. H. Effects of Parameters on Nanofiber Diameter Determined from Electrospinning Model. *Polymer* **2007**, *48*, 6913–6922.
- (24) Mercante, L. A.; Pavinatto, A.; Iwaki, L. E. O.; Scagion, V. P.; Zucolotto, V.; Oliveira, O. N.; Mattoso, L. H. C.; Correa, D. S. Electrospun Polyamide 6/Poly(allylamine Hydrochloride) Nanofibers Functionalized with Carbon Nanotubes for Electrochemical Detection of Dopamine. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 4784–4790.
- (25) Shi, Y.; Li, Y.; Wu, J.; Wang, W.; Dong, A.; Zhang, J. A Novel Transdermal Drug Delivery System Based on Self-Adhesive Janus Nanofibrous Film with High Breathability and Monodirectional Water-Penetration. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2014**, *25*, 713–728.
- (26) Definition of Terms Related to Polymer Blends, Composites, and Multiphase Polymeric Materials (IUPAC Recommendations 2004). *Chem. Int. Newsmag.* IUPAC 2005, 27.
- (27) Karal, O.; Elif Hamurcu, E.; Baysal, B. M. Blends of Polycaprolactone-Poly(dimethylsiloxane)-Polycaprolactone Triblock Copolymer with Poly(vinyl Chloride): Preparation and Characterization. *Polymer* **1997**, *38*, 6071–6078.
- (28) Pospíšil, J.; Horák, Z.; Kruliš, Z.; Nešpůrek, S.; Kuroda, S. Degradation and Aging of Polymer Blends I. Thermomechanical and Thermal Degradation. *Polym. Degrad. Stab.* **1999**, *65*, 405–414.
- (29) *Polymer Blends Handbook*; Utracki, L. A., Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht ; Boston, 2002.
- (30) Amass, W.; Amass, A.; Tighe, B. A Review of Biodegradable Polymers: Uses, Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters, Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradation Studies. *Polym. Int.* **1998**, *47*, 89–144.
- (31) Kenawy, E.-R.; Bowlin, G. L.; Mansfield, K.; Layman, J.; Simpson, D. G.; Sanders, E. H.; Wnek, G. E. Release of Tetracycline Hydrochloride from Electrospun Poly(ethylene-Co-Vinylacetate), Poly(lactic Acid), and a Blend. *J. Controlled Release* **2002**, *81*, 57–64.
- (32) Ali, F.; Chang, Y.-W.; Kang, S. C.; Yoon, J. Y. Thermal, Mechanical and Rheological Properties of Poly (Lactic Acid)/Epoxidized Soybean Oil Blends. *Polym. Bull.* **2009**, *62*, 91–98.
- (33) He, Y.; Zhu, B.; Inoue, Y. Hydrogen Bonds in Polymer Blends. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 1021–1051.
- (34) Koning, C. Strategies for Compatibilization of Polymer Blends. *Prog. Polym. Sci.* **1998**, *23*, 707–757.

- (35) Pang, X.; Zhuang, X.; Tang, Z.; Chen, X. Polylactic Acid (PLA): Research, Development and Industrialization. *Biotechnol. J.* **2010**, *5*, 1125–1136.
- (36) Sabir, M. I.; Xu, X.; Li, L. A Review on Biodegradable Polymeric Materials for Bone Tissue Engineering Applications. *J. Mater. Sci.* **2009**, *44*, 5713–5724.
- (37) Uskokovic, D.; Stevanovic, M. Poly(lactide-Co-Glycolide)-Based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. *Curr. Nanosci.* **2009**, *5*, 1–14.
- (38) Auras, R.; Harte, B.; Selke, S. An Overview of Polylactides as Packaging Materials. *Macromol. Biosci.* **2004**, *4*, 835–864.
- (39) Janorkar, A. V.; Metters, A. T.; Hirt, D. E. Modification of Poly(lactic Acid) Films: Enhanced Wettability from Surface-Confined Photografting and Increased Degradation Rate Due to an Artifact of the Photografting Process. *Macromolecules* **2004**, *37*, 9151–9159.
- (40) Tokiwa, Y.; Calabia, B. P. Biodegradability and Biodegradation of Poly(lactide). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 244–251.
- (41) Rasal, R. M.; Janorkar, A. V.; Hirt, D. E. Poly(lactic Acid) Modifications. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 338–356.
- (42) Burg, K. J. L.; Holder, W. D.; Culberson, C. R.; Beiler, R. J.; Greene, K. G.; Loeb sack, A. B.; Roland, W. D.; Mooney, D. J.; Halberstadt, C. R. Parameters Affecting Cellular Adhesion to Polylactide Films. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, *10*, 147–161.
- (43) Gupta, B.; Revagade, N.; Hilborn, J. Poly(lactic Acid) Fiber: An Overview. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 455–482.
- (44) Nishida, H.; Tokiwa, Y. Effects of Higher-Order Structure of poly(3-Hydroxybutyrate) on Its Biodegradation. II. Effects of Crystal Structure on Microbial Degradation. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1993**, *1*, 65–80.
- (45) Ho, K.-L. G.; Pometto, A. L.; Gadea-Rivas, A.; Briceño, J. A.; Rojas, A. Degradation of Polylactic Acid (PLA) Plastic in Costa Rican Soil and Iowa State University Compost Rows. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1999**, *7*, 173–177.
- (46) Kale, G.; Auras, R.; Singh, S. P. Comparison of the Degradability of Poly(lactide) Packages in Composting and Ambient Exposure Conditions. *Packag. Technol. Sci.* **2007**, *20*, 49–70.
- (47) Reeve, M. S.; McCarthy, S. P.; Downey, M. J.; Gross, R. A. Polylactide Stereochemistry: Effect on Enzymic Degradability. *Macromolecules* **1994**, *27*, 825–831.

- (48) Tsuji, H.; Ikada, Y. Properties and Morphology of poly(L-Lactide). II. Hydrolysis in Alkaline Solution. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1998**, *36*, 59–66.
- (49) Tsuji, H.; Miyauchi, S. Poly(l-Lactide): VI Effects of Crystallinity on Enzymatic Hydrolysis of Poly(l-Lactide) without Free Amorphous Region. *Polym. Degrad. Stab.* **2001**, *71*, 415–424.
- (50) Höglund, A.; Odelius, K.; Albertsson, A.-C. Crucial Differences in the Hydrolytic Degradation between Industrial Polylactide and Laboratory-Scale Poly( l-Lactide). *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4*, 2788–2793.
- (51) Tsuji, H.; Ikada, Y. Crystallization from the Melt of Poly(lactide)s with Different Optical Purities and Their Blends. *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*, 3483–3499.
- (52) Kucharczyk, P.; Pavelková, A.; Stloukal, P.; Sedlarík, V. Degradation Behaviour of PLA-Based Polyesterurethanes under Abiotic and Biotic Environments. *Polym. Degrad. Stab.* **2016**, *129*, 222–230.
- (53) Agarwal, M.; Koelling, K. W.; Chalmers, J. J. Characterization of the Degradation of Polylactic Acid Polymer in a Solid Substrate Environment. *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 517–526.
- (54) Ho, K.-L. G.; Pometto, A. L.; Hinz, P. N. Effects of Temperature and Relative Humidity on Polylactic Acid Plastic Degradation. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1999**, *7*, 83–92.
- (55) Lunt, J. Large-Scale Production, Properties and Commercial Applications of Polylactic Acid Polymers. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 145–152.
- (56) Itävaara, M.; Karjomaa, S.; Selin, J.-F. Biodegradation of Polylactide in Aerobic and Anaerobic Thermophilic Conditions. *Chemosphere* **2002**, *46*, 879–885.
- (57) Torres, A.; Li, S. M.; Roussos, S.; Vert, M. Poly(lactic Acid) Degradation in Soil or under Controlled Conditions. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *62*, 2295–2302.
- (58) Saadi, Z.; Rasmont, A.; Cesar, G.; Bewa, H.; Benguigui, L. Fungal Degradation of Poly(l-Lactide) in Soil and in Compost. *J. Polym. Environ.* **2012**, *20*, 273–282.
- (59) Jarerat, A.; Tokiwa, Y. Degradation of Poly(L-Lactide) by a Fungus. *Macromol. Biosci.* **2001**, *1*, 136–140.
- (60) Watanabe, M.; Kawai, F.; Tsuboi, S.; Nakatsu, S.; Ohara, H. Study on Enzymatic Hydrolysis of Polylactic Acid by Endogenous Depolymerization Model. *Macromol. Theory Simul.* **2007**, *16*, 619–626.

- (61) Sudhakar, M.; Doble, M.; Murthy, P. S.; Venkatesan, R. Marine Microbe-Mediated Biodegradation of Low- and High-Density Polyethylenes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2008**, *61*, 203–213.
- (62) Říhová, B. Biocompatibility of Biomaterials: Hemocompatibility, Immunocompatibility and Biocompatibility of Solid Polymeric Materials and Soluble Targetable Polymeric Carriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *21*, 157–176.
- (63) Guess, W. L.; Rosenbluth, S. A.; Schmidt, B.; Autian, J. Agar Diffusion Method for Toxicity Screening of Plastics on Cultured Cell Monolayers. *J. Pharm. Sci.* **1965**, *54*, 1545–1547.
- (64) Rogero, S. O.; Lugão, A. B.; Ikeda, T. I.; Cruz, Á. S. Teste in Vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo Entre Duas Metodologias. *Mater. Res.* **2003**, *6*, 317–320.
- (65) Sechi, A. S.; Shokouhi, B. Dendritic Cell–Biomaterial Interactions: Implications for the Onset and Development of the Foreign Body Response. In *Biomaterials Associated Infection*; Moriarty, T. F.; Zaat, S. A. J.; Busscher, H. J., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2013; pp. 151–173.
- (66) Shokouhi, B.; Coban, C.; Hasirci, V.; Aydin, E.; Dhanasingh, A.; Shi, N.; Koyama, S.; Akira, S.; Zenke, M.; Sechi, A. S. The Role of Multiple Toll-like Receptor Signalling Cascades on Interactions between Biomedical Polymers and Dendritic Cells. *Biomaterials* **2010**, *31*, 5759–5771.
- (67) Zhang, C.; Wang, L.; Zhai, T.; Wang, X.; Dan, Y.; Turng, L.-S. The Surface Grafting of Graphene Oxide with Poly(ethylene Glycol) as a Reinforcement for Poly(lactic Acid) Nanocomposite Scaffolds for Potential Tissue Engineering Applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, *53*, 403–413.
- (68) Yoshida, M.; Babensee, J. E. Poly(lactic-Co-Glycolic Acid) Enhances Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *71A*, 45–54.
- (69) Babensee, J. E.; Paranjpe, A. Differential Levels of Dendritic Cell Maturation on Different Biomaterials Used in Combination Products. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *74A*, 503–510.
- (70) Rietscher, R.; Schröder, M.; Janke, J.; Czaplewska, J.; Gottschaldt, M.; Scherließ, R.; Hanefeld, A.; Schubert, U. S.; Schneider, M.; Knolle, P. A.; et al. Antigen Delivery via Hydrophilic PEG- B -PAGE- B -PLGA Nanoparticles Boosts Vaccination Induced T Cell Immunity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2016**, *102*, 20–31.
- (71) Walters, A. A.; Somavarapu, S.; Riitho, V.; Stewart, G. R.; Charleston, B.; Steinbach, F.; Graham, S. P. Assessment of the Enhancement of PLGA

- Nanoparticle Uptake by Dendritic Cells through the Addition of Natural Receptor Ligands and Monoclonal Antibody. *Vaccine* **2015**, *33*, 6588–6595.
- (72) Elamanchili, P.; Diwan, M.; Cao, M.; Samuel, J. Characterization of Poly(d,l-Lactic-Co-Glycolic Acid) Based Nanoparticulate System for Enhanced Delivery of Antigens to Dendritic Cells. *Vaccine* **2004**, *22*, 2406–2412.
- (73) Elamanchili, P.; Lutsiak, C. M. E.; Hamdy, S.; Diwan, M.; Samuel, J. Pathogen-Mimicking Nanoparticles for Vaccine Delivery to Dendritic Cells. *J. Immunother.* **2007**, *30*, 378–395.
- (74) Waeckerle-Men, Y.; Scandella, E.; Uetz-von Allmen, E.; Ludewig, B.; Gillessen, S.; Merkle, H. P.; Gander, B.; Groettrup, M. Phenotype and Functional Analysis of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Loaded with Biodegradable Poly(lactide-Co-Glycolide) Microspheres for Immunotherapy. *J. Immunol. Methods* **2004**, *287*, 109–124.
- (75) Hong, H.; Stegemann, J. P. 2D and 3D Collagen and Fibrin Biopolymers Promote Specific ECM and Integrin Gene Expression by Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2008**, *19*, 1279–1293.
- (76) Grafahrend, D.; Heffels, K.-H.; Beer, M. V.; Gasteier, P.; Möller, M.; Boehm, G.; Dalton, P. D.; Groll, J. Degradable Polyester Scaffolds with Controlled Surface Chemistry Combining Minimal Protein Adsorption with Specific Bioactivation. *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 67–73.
- (77) Khalili, A.; Ahmad, M. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18149–18184.
- (78) Guetta-Terrier, C.; Monzo, P.; Zhu, J.; Long, H.; Venkatraman, L.; Zhou, Y.; Wang, P.; Chew, S. Y.; Mogilner, A.; Ladoux, B.; et al. Protrusive Waves Guide 3D Cell Migration along Nanofibers. *J. Cell Biol.* **2015**, *211*, 683–701.
- (79) AO Research Institute, Clavadelerstrasse, CH7270, Davos, Switzerland; Baxter, L. C.; Frauchiger, V.; Textor, M.; ap Gwynn, I.; Richards, R. Fibroblast and Osteoblast Adhesion and Morphology on Calcium Phosphate Surfaces. *Eur. Cell. Mater.* **2002**, *4*, 1–17.
- (80) Anselme, K. Osteoblast Adhesion on Biomaterials. *Biomaterials* **2000**, *21*, 667–681.
- (81) Gumbiner, B. M. Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. *Cell* **1996**, *84*, 345–357.
- (82) Aramwit, P. Introduction to Biomaterials for Wound Healing. In *Wound Healing Biomaterials*; Elsevier, 2016; pp 3–38.



- (83) Haeri, M.; Haeri, M. ImageJ Plugin for Analysis of Porous Scaffolds Used in Tissue Engineering. *J. Open Res. Softw.* **2015**, *3*.
- (84) Estudo Comparativo Com Diversos Fixadores Para Aplicação Em Microscopia Eletrônica de Transmissão. [www.saudepublica.bvs.br/pesquisa/resource/pt/lil-404808](http://www.saudepublica.bvs.br/pesquisa/resource/pt/lil-404808), /, acessado em Setembro, 2017.
- (85) Mohanty, A. K.; Misra, M.; Drzal, L. T. *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*; CRC press, 2005.
- (86) Gamper, I.; Fleck, D.; Barlin, M.; Spehr, M.; El Sayad, S.; Kleine, H.; Maxeiner, S.; Schalla, C.; Aydin, G.; Hoss, M.; et al. GAR22 $\beta$  Regulates Cell Migration, Sperm Motility, and Axoneme Structure. *Mol. Biol. Cell* **2016**, *27*, 277–294.
- (87) Lee, T. H.; Boey, F. Y. C.; Khor, K. A. On the Determination of Polymer Crystallinity for a Thermoplastic PPS Composite by Thermal Analysis. *Compos. Sci. Technol.* **1995**, *53*, 259–274.
- (88) Bonan, R. F.; Bonan, P. R. F.; Batista, A. U. D.; Perez, D. E. C.; Castellano, L. R. C.; Oliveira, J. E.; Medeiros, E. S. Poly(lactic Acid)/Poly(vinyl Pyrrolidone) Membranes Produced by Solution Blow Spinning: Structure, Thermal, Spectroscopic, and Microbial Barrier Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2017**, *134*.
- (89) Paschoalin, R. T.; Traldi, B.; Aydin, G.; Oliveira, J. E.; Rütten, S.; Mattoso, L. H. C.; Zenke, M.; Sechi, A. Solution Blow Spinning Fibres: New Immunologically Inert Substrates for the Analysis of Cell Adhesion and Motility. *Acta Biomater.* **2017**, *51*, 161–174.
- (90) Henton, D.; Gruber, P.; Lunt, J.; Randall, J. Polylactic Acid Technology. In *Natural Fibers, Biopolymers, and Biocomposites*; Mohanty, A., Misra, M., Drzal, L., Eds.; CRC Press, 2005.
- (91) Bernardi, L.; Luisi, S. B.; Fernandes, R.; Dalberto, T. P.; Valentim, L.; Bogo Chies, J. A.; Medeiros Fossati, A. C.; Pranke, P. The Isolation of Stem Cells from Human Deciduous Teeth Pulp Is Related to the Physiological Process of Resorption. *J. Endod.* **2011**, *37*, 973–979.
- (92) Pust, S.; Morrison, H.; Wehland, J.; Sechi, A. S.; Herrlich, P. *Listeria Monocytogenes* Exploits ERM Protein Functions to Efficiently Spread from Cell to Cell. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1287–1300.
- (93) Maxeiner, S.; Shi, N.; Schalla, C.; Aydin, G.; Hoss, M.; Vogel, S.; Zenke, M.; Sechi, A. S. Crucial Role for the LSP1-myosin1e Bimolecular Complex in the Regulation of Fc Receptor-Driven Phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 1652–1664.
- (94) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 325–347.

- (95) Tutak, W.; Sarkar, S.; Lin-Gibson, S.; Farooque, T. M.; Jyotsnendu, G.; Wang, D.; Kohn, J.; Bolikal, D.; Simon, C. G. The Support of Bone Marrow Stromal Cell Differentiation by Airbrushed Nanofiber Scaffolds. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2389–2398.
- (96) Behrens, A. M.; Kim, J.; Hotaling, N.; Seppala, J. E.; Kofinas, P.; Tutak, W. Rapid Fabrication of poly(DL-Lactide) Nanofiber Scaffolds with Tunable Degradation for Tissue Engineering Applications by Air-Brushing. *Biomed. Mater.* **2016**, *11*, 35001.
- (97) McKee, M. G.; Wilkes, G. L.; Colby, R. H.; Long, T. E. Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters. *Macromolecules* **2004**, *37*, 1760–1767.
- (98) Nezarati, R. M.; Eifert, M. B.; Cosgriff-Hernandez, E. Effects of Humidity and Solution Viscosity on Electrospun Fiber Morphology. *Tissue Eng. Part C Methods* **2013**, *19*, 810–819.
- (99) Choong, L. T.; Yi, P.; Rutledge, G. C. Three-Dimensional Imaging of Electrospun Fiber Mats Using Confocal Laser Scanning Microscopy and Digital Image Analysis. *J. Mater. Sci.* **2015**, *50*, 3014–3030.
- (100) Ziabari, M.; Mottaghitlab, V.; Haghi, A. K. Evaluation of Electrospun Nanofiber Pore Structure Parameters. *Korean J. Chem. Eng.* **2008**, *25*, 923–932.
- (101) Nava, M. M.; Draghi, L.; Giordano, C.; Pietrabissa, R. The Effect of Scaffold Pore Size in Cartilage Tissue Engineering. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2016**, *14*, 0–0.
- (102) Li, W.-J.; Jiang, Y. J.; Tuan, R. S. Cell–Nanofiber-Based Cartilage Tissue Engineering Using Improved Cell Seeding, Growth Factor, and Bioreactor Technologies. *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14*, 639–648.
- (103) Treglia, G.; Giovanella, L.; Bertagna, F.; Di Franco, D.; Salvatori, M. A Pooled Analysis to Calculate the Prevalence and Risk of Malignancy of Thyroid Incidentalomas Detected by Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography. *Thyroid* **2012**, 2012–216.
- (104) Mygind, T.; Stiehler, M.; Baatrup, A.; Li, H.; Zou, X.; Flyvbjerg, A.; Kassem, M.; Bünger, C. Mesenchymal Stem Cell Ingrowth and Differentiation on Coralline Hydroxyapatite Scaffolds. *Biomaterials* **2007**, *28*, 1036–1047.
- (105) Rnjak-Kovacina, J.; Wise, S. G.; Li, Z.; Maitz, P. K. M.; Young, C. J.; Wang, Y.; Weiss, A. S. Tailoring the Porosity and Pore Size of Electrospun Synthetic Human Elastin Scaffolds for Dermal Tissue Engineering. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6729–6736.
- (106) Forato, L. A.; Bernardes-Filho, R.; Colnago, L. A. Protein Structure in KBr Pellets by Infrared Spectroscopy. *Anal. Biochem.* **1998**, *259*, 136–141.

- (107) Ero-Phillips, O.; Jenkins, M.; Stamboulis, A. Tailoring Crystallinity of Electrospun PLLA Fibres by Control of Electrospinning Parameters. *Polymers* **2012**, *4*, 1331–1348.
- (108) Wang, B.-Y.; Fu, S.-Z.; Ni, P.-Y.; Peng, J.-R.; Zheng, L.; Luo, F.; Liu, H.; Qian, Z.-Y. Electrospun Polylactide/Poly(ethylene Glycol) Hybrid Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100A*, 441–449.
- (109) Nazari, T.; Garmabi, H. Polylactic Acid/Polyethylene Glycol Blend Fibres Prepared via Melt Electrospinning: Effect of Polyethylene Glycol Content. *Micro Amp Nano Lett.* **2014**, *9*, 686–690.
- (110) Sheth, M.; Kumar, R. A.; Davé, V.; Gross, R. A.; McCarthy, S. P. Biodegradable Polymer Blends of Poly (Lactic Acid) and Poly (Ethylene Glycol). *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *66*, 1495–1505.
- (111) Toncheva, A.; Mincheva, R.; Kancheva, M.; Manolova, N.; Rashkov, I.; Dubois, P.; Markova, N. Antibacterial PLA/PEG Electrospun Fibers: Comparative Study between Grafting and Blending PEG. *Eur. Polym. J.* **2016**, *75*, 223–233.
- (112) Jacobsen, S.; Fritz, H.-G. Plasticizing Polylactide—the Effect of Different Plasticizers on the Mechanical Properties. *Polym. Eng. Sci.* **1999**, *39*, 1303–1310.
- (113) Kulinski, Z.; Piorkowska, E. Crystallization, Structure and Properties of Plasticized Poly(l-Lactide). *Polymer* **2005**, *46*, 10290–10300.
- (114) de Paula, E. L.; Mano, V. Preparação, Caracterização E Estudos de Biodegradação de Blendas À Base de PDLLA E PVP. *Quim Nova* **2012**, *35*, S1.
- (115) Drumond, W.; Mothé, C.; Wang, S. Quantitative Analysis of Biodegradable Amphiphilic Poly (L-Lactide)-Block-Poly (Ethyleneglycol)-Blockpoly (L-Lactide) by Using TG, FTIR and NMR. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2006**, *85*, 173–177.
- (116) Kopinke, F.-D.; Remmler, M.; Mackenzie, K.; Möder, M.; Wachsen, O. Thermal Decomposition of Biodegradable polyesters—II. Poly (Lactic Acid). *Polym. Degrad. Stab.* **1996**, *53*, 329–342.
- (117) Zou, H.; Yi, C.; Wang, L.; Liu, H.; Xu, W. Thermal Degradation of Poly(lactic Acid) Measured by Thermogravimetry Coupled to Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2009**, *97*, 929–935.
- (118) Zhou, Q.; Xanthos, M. Nanosize and Microsize Clay Effects on the Kinetics of the Thermal Degradation of Polylactides. *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94*, 327–338.

- (119) Chrissafis, K. Detail Kinetic Analysis of the Thermal Decomposition of PLA with Oxidized Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Thermochim. Acta* **2010**, *511*, 163–167.
- (120) Vandrovcová, M.; Bacakova, L. Adhesion, Growth and Differentiation of Osteoblasts on Surface-Modified Materials Developed for Bone Implants. *Physiol. Res.* **2011**, *60*, 403.
- (121) Oliveira, J. E.; Moraes, E. A.; Marconcini, J. M.; C. Mattoso, L. H.; Glenn, G. M.; Medeiros, E. S. Properties of Poly(lactic Acid) and Poly(ethylene Oxide) Solvent Polymer Mixtures and Nanofibers Made by Solution Blow Spinning. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *129*, 3672–3681.
- (122) Toncheva, A.; Paneva, D.; Manolova, N.; Rashkov, I. Electrospun poly(L-Lactide) Membranes Containing a Single Drug or Multiple Drug System for Antimicrobial Wound Dressings. *Macromol. Res.* **2011**, *19*, 1310–1319.
- (123) von Burkersroda, F.; Schedl, L.; Göpferich, A. Why Degradable Polymers Undergo Surface Erosion or Bulk Erosion. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4221–4231.
- (124) Tang, L.; Ugarova, T. P.; Plow, E. F.; Eaton, J. W. Molecular Determinants of Acute Inflammatory Responses to Biomaterials. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 1329.
- (125) Bonfield, T. L.; Colton, E.; Anderson, J. M. Protein Adsorption of Biomedical Polymers Influences Activated Monocytes to Produce Fibroblast Stimulating Factors. *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26*, 457–465.
- (126) Tang, L.; Hu, W. Molecular Determinants of Biocompatibility. *Expert Rev. Med. Devices* **2005**, *2*, 493–500.
- (127) Wilson, C. J.; Clegg, R. E.; Leavesley, D. I.; Percy, M. J. Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. *Tissue Eng.* **2005**, *11*, 1–18.
- (128) Hu, W.-J.; Eaton, J. W.; Ugarova, T. P.; Tang, L. Molecular Basis of Biomaterial-Mediated Foreign Body Reactions. *Blood* **2001**, *98*, 1231–1238.
- (129) Wang, Y.-X.; Robertson, J. L.; Spillman, Jr., W. B.; Claus, R. O. Effects of the Chemical Structure and the Surface Properties of Polymeric Biomaterials on Their Biocompatibility. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1362–1373.
- (130) Themistou, E.; Battaglia, G.; Armes, S. P. Facile Synthesis of Thiol-Functionalized Amphiphilic Polylactide–methacrylic Diblock Copolymers. *Polym Chem* **2014**, *5*, 1405–1417.

- (131) Israelachvili, J.; Wennerström, H. Role of Hydration and Water Structure in Biological and Colloidal Interactions. *Nature* **1996**, *379*, 219–225.
- (132) Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Holmlin, R. E.; Takayama, S.; Whitesides, G. M. A Survey of Structure–Property Relationships of Surfaces That Resist the Adsorption of Protein. *Langmuir* **2001**, *17*, 5605–5620.
- (133) Tang, L.; Thevenot, P.; Hu, W. Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 270–280.
- (134) Faria, A. U. de; Martins-Franchetti, S. M. Biodegradação de Filmes de Polipropileno (PP), Poli (3-hidroxibutirato)(PHB) E Blenda de PP/PHB Por Microrganismos Das Águas Do Rio Atibaia. *Polímeros* **2010**, *20*, 141–147.
- (135) Shah, A. A.; Hasan, F.; Hameed, A.; Ahmed, S. Biological Degradation of Plastics: A Comprehensive Review. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 246–265.
- (136) Raghavan, D.; Torma, A. E. DSC and FTIR Characterization of Biodegradation of Polyethylene. *Polym. Eng. Sci.* **1992**, *32*, 438–442.
- (137) Albertsson, A.-C.; Barenstedt, C.; Karlsson, S.; Lindberg, T. Degradation Product Pattern and Morphology Changes as Means to Differentiate Abiotically and Biotically Aged Degradable Polyethylene. *Polymer* **1995**, *36*, 3075–3083.
- (138) Manzur, A.; Cuamatzi, F.; Favela, E. Effect of the Growth of *Phanerochaete Chrysosporium* in a Blend of Low Density Polyethylene and Sugar Cane Bagasse. *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *66*, 105–111.
- (139) Volke-Sepúlveda, T.; Saucedo-Castañeda, G.; Gutiérrez-Rojas, M.; Manzur, A.; Favela-Torres, E. Thermally Treated Low Density Polyethylene Biodegradation by *Penicillium Pinophilum* and *Aspergillus Niger*: Low Density Polyethylene Biodegradation. *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, *83*, 305–314.
- (140) Fukushima, K.; Abbate, C.; Tabuani, D.; Gennari, M.; Camino, G. Biodegradation of Poly(lactic Acid) and Its Nanocomposites. *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94*, 1646–1655.
- (141) Qin, L.; Qiu, J.; Liu, M.; Ding, S.; Shao, L.; Lü, S.; Zhang, G.; Zhao, Y.; Fu, X. Mechanical and Thermal Properties of Poly(lactic Acid) Composites with Rice Straw Fiber Modified by Poly(butyl Acrylate). *Chem. Eng. J.* **2011**, *166*, 772–778.
- (142) Fukushima, K.; Tabuani, D.; Camino, G. Nanocomposites of PLA and PCL Based on Montmorillonite and Sepiolite. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29*, 1433–1441.

- (143) Zhou, H.; Green, T. B.; Joo, Y. L. The Thermal Effects on Electrospinning of Polylactic Acid Melts. *Polymer* **2006**, *47*, 7497–7505.
- (144) Yasuniwa, M.; Tsubakihara, S.; Iura, K.; Ono, Y.; Dan, Y.; Takahashi, K. Crystallization Behavior of Poly(l-Lactic Acid). *Polymer* **2006**, *47*, 7554–7563.
- (145) Zhou, Q.; Xanthos, M. Nanoclay and Crystallinity Effects on the Hydrolytic Degradation of Polylactides. *Polym. Degrad. Stab.* **2008**, *93*, 1450–1459.
- (146) Kong, Y.; Hay, J. N. The Measurement of the Crystallinity of Polymers by DSC. *Polymer* **2002**, *43*, 3873–3878.
- (147) Pandey, J. K.; Raghunatha Reddy, K.; Pratheep Kumar, A.; Singh, R. P. An Overview on the Degradability of Polymer Nanocomposites. *Polym. Degrad. Stab.* **2005**, *88*, 234–250.
- (148) Kong, Y.; Hay, J. . Multiple Melting Behaviour of Poly(ethylene Terephthalate). *Polymer* **2003**, *44*, 623–633.
- (149) Liu, T.; Petermann, J. Multiple Melting Behavior in Isothermally Cold-Crystallized Isotactic Polystyrene. *Polymer* **2001**, *42*, 6453–6461.
- (150) Al-Itry, R.; Lamnawar, K.; Maazouz, A. Improvement of Thermal Stability, Rheological and Mechanical Properties of PLA, PBAT and Their Blends by Reactive Extrusion with Functionalized Epoxy. *Polym. Degrad. Stab.* **2012**, *97*, 1898–1914.
- (151) Teramoto, N.; Urata, K.; Ozawa, K.; Shibata, M. Biodegradation of Aliphatic Polyester Composites Reinforced by Abaca Fiber. *Polym. Degrad. Stab.* **2004**, *86*, 401–409.
- (152) Solarski, S.; Ferreira, M.; Devaux, E. Characterization of the Thermal Properties of PLA Fibers by Modulated Differential Scanning Calorimetry. *Polymer* **2005**, *46*, 11187–11192.
- (153) Viswanathan, P.; Themistou, E.; Ngamkham, K.; Reilly, G. C.; Armes, S. P.; Battaglia, G. Controlling Surface Topology and Functionality of Electrospun Fibers on the Nanoscale Using Amphiphilic Block Copolymers To Direct Mesenchymal Progenitor Cell Adhesion. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 66–75.
- (154) Case, L. B.; Baird, M. A.; Shtengel, G.; Campbell, S. L.; Hess, H. F.; Davidson, M. W.; Waterman, C. M. Molecular Mechanism of Vinculin Activation and Nanoscale Spatial Organization in Focal Adhesions. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 880–892.

- (155) Selhuber-Unkel, C.; Erdmann, T.; López-García, M.; Kessler, H.; Schwarz, U. S.; Spatz, J. P. Cell Adhesion Strength Is Controlled by Intermolecular Spacing of Adhesion Receptors. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 543–551.
- (156) Discher, D. E.; Janmey, P.; Wang, Y. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science* **2005**, *310*, 1139–1143.
- (157) Vogel, V.; Sheetz, M. Local Force and Geometry Sensing Regulate Cell Functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 265–275.
- (158) Zamir, E.; Geiger, B. Molecular Complexity and Dynamics of Cell-Matrix Adhesions. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 3583–3590.
- (159) Abbey, C. A.; Bayless, K. J. Matrix Density Alters Zyxin Phosphorylation, Which Limits Peripheral Process Formation and Extension in Endothelial Cells Invading 3D Collagen Matrices. *Matrix Biol.* **2014**, *38*, 36–47.
- (160) Schuler, G.; Steinman, R. M. Murine Epidermal Langerhans Cells Mature into Potent Immunostimulatory Dendritic Cells in Vitro. *J. Exp. Med.* **1985**, *161*, 526–546.
- (161) Liu, Q.; Jia, J.; Yang, T.; Fan, Q.; Wang, L.; Ma, G. Pathogen-Mimicking Polymeric Nanoparticles Based on Dopamine Polymerization as Vaccines Adjuvants Induce Robust Humoral and Cellular Immune Responses. *Small* **2016**, *12*, 1744–1757.
- (162) Yoshida, M.; Babensee, J. E. Differential Effects of Agarose and Poly(lactic-Co-Glycolic Acid) on Dendritic Cell Maturation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *79A*, 393–408.
- (163) Yoshida, M.; Mata, J.; Babensee, J. E. Effect of Poly(lactic-Co-Glycolic Acid) Contact on Maturation of Murine Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2007**, *80A*, 7–12.