



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Ana Carolina Bueno Benatti

“Estudo comparativo *in vitro* da biocompatibilidade entre nanofibras de Poli (L-ácido láctico) (PLLA) e PLDL PURAC® para uso na Engenharia Tecidual”

“Comparative in vitro analysis of biocompatibility between Poly (L-lactic acid) (PLLA) and PLDL Purac® nanofibers for use in Tissue Engineering”

CAMPINAS

2017

Ana Carolina Bueno Benatti

“Estudo comparativo *in vitro* da biocompatibilidade entre nanofibras de Poli (L-ácido láctico) (PLLA) e PLDL PURAC® para uso na Engenharia Tecidual”

“Comparative in vitro analysis of biocompatibility between Poly (L-lactic acid) (PLLA) and PLDL Purac® nanofibers for use in Tissue Engineering”

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Paulo Kharmandayan

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ANA CAROLINA BUENO BENATTI,
E ORIENTADA PELO
PROF. DR. PAULO KHARMANDAYAN

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-1744/2016

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3510-8439>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

B431e Benatti, Ana Carolina Bueno, 1987-
Estudo comparativo *in vitro* da biocompatibilidade entre nanofibras de Poli(L-ácido láctico) (PLLA) e PLDL PURAC® para uso na engenharia tecidual / Ana Carolina Bueno Benatti. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Paulo Kharmandayan.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biomateriais. 2. Implantes absorvíveis. 3. Ácido láctico. 4. Biocompatibilidade. I. Kharmandayan, Paulo, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparative *in vitro* analysis of biocompatibility between Poly(L-lactic acid) (PLLA) and PLDL PURAC® nanofibers for use in tissue engineering

Palavras-chave em inglês:

biomaterials

Absorbable implants

Lactic acid

Biocompatibility

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Paulo Kharmandayan [Orientador]

Davi Reis Calderoni

Flávio Mendes

Data de defesa: 21-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ANA CAROLINA BUENO BENATTI

ORIENTADOR: PAULO KHARMANDAYAN

MEMBROS:

1. PROF. DR. PAULO KHARMANDAYAN

2. PROF. DR. DAVI REIS CALDERONI

3. PROF.DR. FLÁVIO HENRIQUE MENDES

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 21/02/2017

PÁGINA DE DEDICATÓRIA

Aos meus pais e ao meu irmão. Por terem me apoiado nessa jornada.

“ Quando o servidor está pronto, o serviço aparece. ”

Nosso Lar - Genésio, cap. 26, pág. 143

AGRADECIMENTOS

A jornada que vivi nos últimos dois anos foi intensa, e não teria conseguido sem o apoio e a ajuda de todos.

Aos meus pais, obrigada por me ensinarem a nunca desistir.

Ao meu irmão, obrigada por me fazer rir quando eu mais precisava.

Aos meus colegas de trabalho, por me fazerem uma pessoa e uma pesquisadora melhor. Não teria aprendido tanto sem a ajuda e a presença de vocês.

À Dra. Ana Amélia Rodrigues, por ter sido não só uma Professora, mas também uma amiga.

À Mariana Vitelo que mesmo de longe, sempre foi e sempre será a minha eterna parceira.

Ao Dr. André Jardini, que sempre me acalmou, me guiou e me fez crescer. Por ter acreditado em mim e, acima de tudo, me fazer acreditar, também.

Ao Prof. Dr. Paulo Kharmandayan, meu orientador, que me guiou e me fez buscar sempre o melhor. Muito obrigada.

Minha eterna gratidão a todos que participaram dessa jornada comigo.

RESUMO

Introdução: O poliácido absorvível, poli (L-ácido láctico) (PLLA) é um dos materiais mais utilizados e estudados em engenharia de tecidos, devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. O uso de *scaffolds* (arcabouços) de PLLA tem sido de grande valia para a engenharia de tecidos, pois estes auxiliam na proliferação, migração e diferenciação celular, permitindo uma regeneração tecidual mais eficiente. **Métodos:** Nesse estudo foi utilizado PLLA sintetizado pelo Instituto Nacional de Biofabricação, a partir da polimerização de abertura do anel lactato. Este PLLA foi utilizado para a manufatura de *scaffolds* na forma de membranas de nanofibras obtidas pelo processo de eletrofição. As membranas de nanofibras de PLLA foram então comparadas com membranas eletrofiadas de PLDL ®Purac. A citotoxicidade do material foi avaliada através dos ensaios propostos na norma ISO 10993-5: MTT (Sigma), Live/Dead® (Molecular Probes), Ensaios de Eluição, Contato Direto e Difusão em Ágar. Os ensaios de MTT e Eluição foram analisados por meio de análise estatística ANOVA. **Resultados:** O teste de MTT após o período de 24 horas de exposição indicou que as células do tipo fibroblasto em contato com o PLLA apresentaram uma taxa de proliferação maior do que o PLDL Purac®, sendo significativamente diferentes ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre o controle negativo, PLLA e o PLDL Purac® após 48h e 72h de exposição ($p > 0,05$). O teste de Eluição não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre o controle negativo, PLLA, o PLDL Purac®, após 24h, 48h e 72h da cultura ($p > 0,05$). O ensaio de Live/Dead® indicou que após 24h, 48h e 72h de exposição dos biomateriais à cultura de fibroblastos, estes não causaram efeito tóxico às células. Os ensaios de Contato Direto e Difusão em Ágar indicaram que a presença dos biomateriais não afetou a morfologia celular, que foi considerada normal, não mostrando sinais de citotoxicidade. **Conclusão:** Os resultados dos ensaios indicaram que a presença dos biomateriais PLLA e PLDL Purac® não causou efeitos tóxicos à cultura de fibroblastos a que foram expostos. Os resultados dos ensaios também demonstraram que o PLLA é um material biocompatível, com resultados semelhantes ao PLDL Purac®. Assim, o PLLA sintetizado no Instituto Nacional de Biofabricação é um biomaterial biocompatível que pode ser utilizado na manufatura de nanofibras que podem ser adaptadas para diferentes aplicações biomédicas.

Palavras-chave: *Implantes Absorvíveis, Materiais Biocompatíveis, Teste de Materiais, Bioengenharia.*

ABSTRACT

Introduction: The absorbable polyacid, poly (L-lactic acid) (PLLA) is one of the most widely used and studied material in tissue engineering, due to its biocompatibility and biodegradability. The use of the PLLA scaffolds has been of great value for tissue engineering, since it supports cell proliferation, migration and differentiation, allowing a more efficient tissue regeneration.

Methods: In this study PLLA was synthesized by the National Institute of Biofabrication, using ring-opening polymerization. PLLA was used for the manufacture of scaffolds in the form of nanofiber membranes obtained by the electrospinning process. PLLA nanofibers membranes were then compared to PLDL® Purac nanofiber membranes. The cytotoxicity of the materials were evaluated through the tests proposed by ISO 10993-5: MTT (Sigma), Live/Dead® (Molecular Assays), Elution, Direct Contact and Agar Diffusion Assays. The MTT and Elution statistical analysis were obtained by ANOVA test. **Results:** The MTT test after 24 hours of exposure indicated that fibroblast cells in contact with PLLA had a higher proliferation rate than PLDL® Purac, being significantly different ($p < 0.05$). Yet there were no statistically significant differences between the negative control, PLLA and PLDL® Purac after 48h and 72h of exposure ($p > 0.05$). The Elution test did not show statistically significant differences between the negative control, PLLA and PLDL® Purac, after 24h, 48h and 72h of the culture ($p > 0.05$). The Live/Dead® assay indicated that in 24h, 48h, and 72h of exposure of the biomaterials to the fibroblast culture, they did not cause toxic effect to the cells. The Direct Contact and Agar Diffusion assays indicated that the presence of biomaterials did not affect the cellular morphology, which was considered normal, showing no signs of cytotoxicity. **Conclusion:** The results of the tests indicate that the presence of PLLA and PLDL® Purac did not cause toxic effects to the culture of fibroblasts. Test results also demonstrate that PLLA is a biocompatible material, with similar results to PLDL® Purac. Thus, the PLLA synthesized at the National Institute of Biofabrication is a biocompatible biomaterial that can be used in the manufacture of nanofibers that can be adapted for different biomedical applications.

Key-words: *Absorbable Implants, Biocompatible Materials, Material Testing, Bioengineering*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Três-dimensões
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Materials
AT	Azul de Toluidina
CO ₂	Gás Carbônico
CT (-)	Grupo Controle de Toxicidade (-)
CT (+)	Grupo Controle de Toxicidade (+)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Sulfóxido de Dimetilo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECM	Matriz Extracelular
EthD-1	Homodímero de Etídio-1
FBS	Soro Bovino Fetal
Formazan	{E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}
ISO	International Standards Organization
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	{brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
PBS	Solução salina fosfato
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PDLA	Poli (D-ácido láctico)
PDLLA	Poli (D, L-ácido láctico)
PDO	Poli(p-dioxanona)
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido-láctico)
PLDL	Poli (L-co-D,L-ácido láctico)
PLGA	Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico)
PLLA	Poli (L-ácido láctico)
SUS	Sistema Único de Saúde
XP	Xilidina Ponceau

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	Centímetro
cm ²	Centímetro(s) Quadrado(s)
cm ³	Centímetro(s) Cúbicos (s)
°C	Graus Celcius
g	Gramas(s)
h	Hora(s)
kV	KiloVolts
pA	Pico-ampere
mg	Miligramas
ml	Mililitro(s)
mm	Milímetro (s)
Mw	Massa Molar
nm	Nanômetro(s)
pH	Potencial Hidrogeniônico
V	Volume
μL	Microlitro
λ	Comprimento de Onda

SUMÁRIO

Introdução 12

Objetivos 24

Metodologia 25

Resultados 29

Artigo “Comparative analysis of biocompatibility between Poly (L-lactic acid) (PLLA) and PLDL Purac® nanofibers for use in Tissue Engineering”

Discussão Geral 41

Conclusão 48

Referências 49

Anexo - Copyright 55

Introdução

1. Engenharia de Tecidos

Uma das maiores adversidades da saúde humana é a perda de função de um tecido ou órgão, podendo ocasionar diminuição da qualidade de vida e debilidades em graus variáveis.

A engenharia tecidual é uma área emergente, com o objetivo de restaurar a função de um tecido ou órgão que tenha sofrido lesão, esta, devida às doenças ou traumas, utilizando combinações de técnicas de biologia celular, química e engenharia de materiais.

A engenharia de tecidos visa à união do cultivo *in vitro* de células apropriadas para o tecido, juntamente com uma estrutura tridimensional, uma matriz de suporte (*scaffold*) biocompatível e biodegradável, a fim de prover uma estrutura física que, também, irá agir como base para o desenvolvimento celular do tecido, auxiliando o processo de proliferação, diferenciação e migração celular, além do desenvolvimento dos componentes da matriz extracelular (ECM), necessários para a criação e manutenção do tecido (1).

O esquema da Figura 1 identifica as principais etapas da engenharia de tecidos.

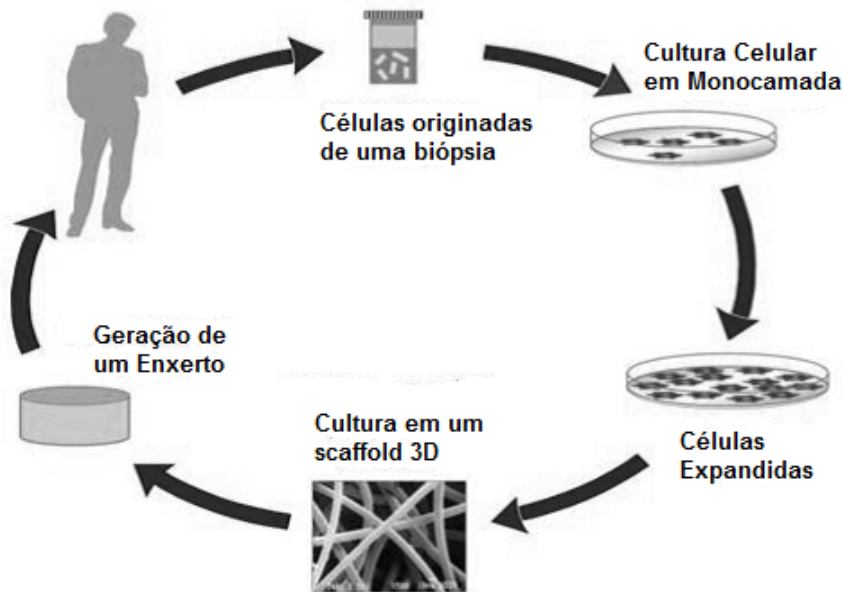


Figura 1. Etapas da engenharia de tecidos (modificado de (2)).

Existem algumas etapas para a Engenharia de Tecidos (3):

- Seleção e manufatura do suporte (*scaffold*);
- Inoculação da população celular sobre o suporte;
- Crescimento do tecido prematuro;
- Crescimento do tecido maturado em sistema fisiológico (biorreator);
- Assimilação do produto.

A combinação de diferentes técnicas de engenharia e medicina, juntamente com o uso de biomateriais para a biofabricação, proporcionou as condições necessárias para a manufatura de implantes, com conformidades anatômica e funcional, a qual pode ser personalizada ao paciente (4-6). Este implante (*scaffold*) possuiria uma microestrutura porosa tridimensional, a qual iria contribuir para o crescimento, migração e diferenciação celular. Após um período de tempo, o implante seria degradado e reabsorvido, enquanto o tecido em si já estaria recuperado (6,7).

O sucesso das técnicas da engenharia de tecidos ao serem aplicadas à Medicina, pode levar a uma melhora na qualidade de vida do paciente, diminuindo a necessidade eventual de tecidos e órgãos.

2. Biomateriais

Os biomateriais são considerados substâncias de origem natural ou sintética, as quais são toleradas de forma breve ou permanente pelos tecidos, que constituem um ser vivo. Estes podem ser empregados como unidades individuais ou parte de um sistema mais complexo, o qual trata, repara ou substitui um tecido, órgão ou função (8).

Os biomateriais podem ser polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais. Estes são produzidos para auxiliar na recuperação ou substituição de um tecido ou uma função, de forma a adequarem-se ao local onde serão implantados, à função que irão exercer e ao tecido com que entrarão em contato. A Tabela 1 contém alguns exemplos de polímeros sintéticos e naturais utilizados na Engenharia de Tecidos.

Tipo	Polímeros
Sintético	Poli(ácido láctico) Poli(etileno glicol) Poli(ácido glicólico)
Natural	Agarose Alginato Colágeno Ácido Hialurônico

Tabela 1. Exemplos de polímeros sintéticos e naturais utilizados na Engenharia de Tecidos.

Os biomateriais também podem ser utilizados como dispositivos médicos (9), como, por exemplo, suturas, placas e parafusos ósseos, próteses articulares, válvulas cardíacas, implantes dentários, lentes intraoculares, etc., assim como aparatos médicos, como, por exemplo, marca-passos, corações artificiais etc., visando a melhora da qualidade de vida do paciente (10-12).

Os biomateriais devem apresentar biocompatibilidade com o organismo, portanto, não devem apresentar toxicidade, assim como não devem ser carcinogênicos, não devem ser antigênicos e nem mutagênicos. Em aplicações vasculares, devem ser não-trombogênicos (13). Devem também apresentar propriedades mecânicas adequadas ao tecido que este será implantado, a fim de exercer efetivamente suas funções.

Os biomateriais podem ser classificados segundo seu comportamento fisiológico como: biotoleráveis, bioinertes, bioativos e absorvíveis (14).

Os biomateriais biotoleráveis são isolados do tecido adjacente por formação de tecido fibroso. No qual, quanto maior a espessura do tecido fibroso formado ao entorno do biomaterial, menor é a tolerância dos tecidos ao material. Este é o caso da maioria dos polímeros sintéticos e metais (14).

Os materiais bioinertes são aqueles que determinam a formação mínima do envoltório fibroso em torno do material, devido a uma liberação mínima de substâncias do material no tecido. Este é o caso de materiais como o titânio, zircônio, ligas de titânio e carbono (15).

Os bioativos são aqueles que interagem com o tecido, criando uma ligação química entre eles, devido à sua similaridade química, como no caso dos vidros e vidro-cerâmicas com os ossos, por causa de sua composição de fosfato de cálcio e hidroxiapatita (15).

Já os biomateriais absorvíveis, são aqueles que após um certo período de tempo acabam por serem degradados ou absorvidos pelo organismo, formando compostos atóxicos que são eliminados por rotas metabólicas naturais, como por exemplo o Ciclo de Krebs ou na excreção da urina (16). Esse é o caso do fosfato tricálcico (TCP) e do poli (L-ácido láctico) (PLLA).

3. *Scaffolds*

Os *scaffolds* ou arcabouços são estruturas tridimensionais, vitais para uma regeneração tecidual de sucesso, os quais possuem diversas funções (17):

- Funcionam como espaçadores, a fim de evitar o crescimento do tecido na área vizinha ao local afetado;
- Fornecem uma estrutura de suporte temporário para o tecido o qual ira auxiliar na regeneração;
- Base para o crescimento, proliferação, migração e diferenciação de células;
- Auxiliam a detenção e distribuição de células na região a qual é desejada a regeneração;
- Permitem a existência de espaços para a vascularização do tecido, assim como remodelação e formação de novos tecidos;
- Comportam o transporte eficiente de nutrientes, fatores de crescimento, vasos sanguíneos e remoção de materiais;

A Figura 2 apresenta imagens exemplificando *scaffolds* usados na Engenharia de Tecidos.

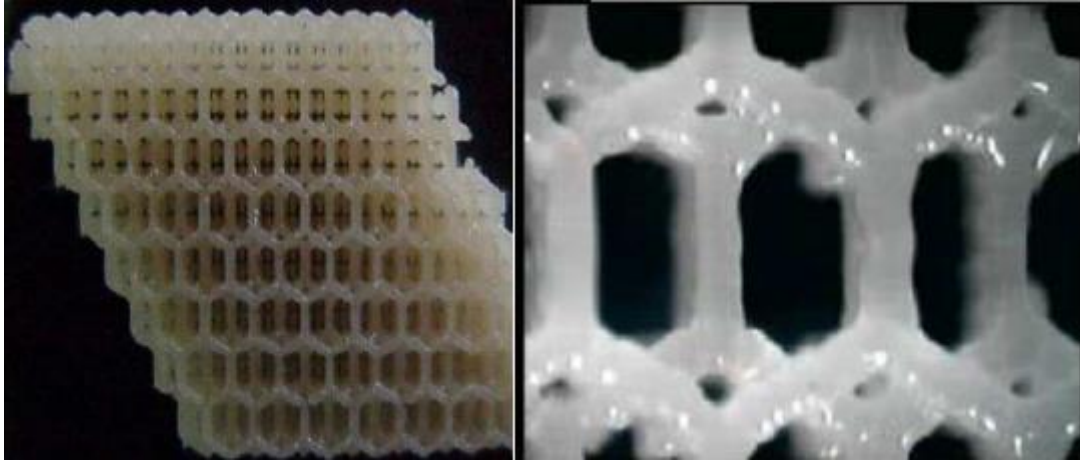


Figura 2. Imagens de *scaffolds* usados na Engenharia de Tecidos (18).

4. *Biopolímeros na Engenharia Tecidual*

Os materiais poliméricos são macromoléculas formadas a partir de estruturas menores fundamentais (monômeros) repetidas, que originam longas cadeias, formadas a partir das reações de polimerização. Dentre estes existem os biopolímeros, polímeros produzidos a partir de matéria-prima de fontes renováveis, como a cana-de-açúcar, o milho e a celulose, por exemplo, (19).

A utilização de biopolímeros em organismos para acelerar a recuperação tecidual, tem sido estudada por diversos grupos utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*, o primeiro sendo uma pré-avaliação do segundo (20). O êxito do desenvolvimento do tecido baseia-se em três fatores: a seleção adequada do tipo celular que deverá ser utilizado e implantado; a seleção de um material com propriedades estruturais e físico-químicas adequadas ao local do implante, assim como sua função de suporte (*scaffold*); e a interação entre o material e as células do tecido (21,22).

Na área médica, implantes bioabsorvíveis temporários vêm sendo usados desde a década de 1960, na forma de suturas cirúrgicas formadas de ácido láctico e ácido glicólico (23), dispositivos ortopédicos, stents e mais recentemente como sistema de liberação controlada de drogas (*drug-delivery*). Na atualidade, o desejo da engenharia tecidual de poder reconstruir tecidos e órgãos, devolvendo a qualidade de vida ao paciente, sem riscos de rejeição é uma ideia que vem sendo trabalhada em diversos centros de pesquisa pelo mundo (24).

Uma característica fundamental que um biopolímero deve apresentar para ser utilizado como dispositivo biomédico e na engenharia tecidual é a biocompatibilidade. Esta se resume a ausência de toxicidade, ou seja, não apresentar efeito prejudicial à célula e/ou tecido o qual o material esteja em contato. Uma outra característica, a qual é de extrema importância, é a biodegradabilidade. Esta representa a capacidade do biomaterial de se degradar *in vitro* e *in vivo*, formando substâncias atóxicas, sem a necessidade de uma cirurgia para a remoção do material após a recuperação do tecido.

Dentre os biomateriais biocompatíveis mais promissores estão o grupo dos poli (α -hidróxi ácidos). Os principais polímeros desse grupo são: o Poli (ácido láctico) (PLA), a Poli(ϵ -caprolactona) (PCL), o Poli(ácido glicólico) (PGA) e a Poli(p-dioxanona) (PDO) (25). Entretanto, estes polímeros apresentam algumas deficiências como baixa flexibilidade, biodegradação lenta e alta cristalinidade, que pode levar a uma reação inflamatória.

5. Poli Ácido Lácticos

- **PLA - Poli (ácido-láctico)**

O Poli (ácido-láctico) (PLA) é um dos mais promissores e utilizados biopolímeros. Possui sua origem orgânica, o ácido láctico, a partir de material renovável obtido através da fermentação de açúcares adquiridos de fontes naturais como a cana-de-açúcar ou o milho (26-28).

O PLA é conhecido como um material biocompatível e biodegradável, com aplicações diversificadas, já que pequenas alterações em sua estrutura molecular levam a diferentes características físico-químicas. O material pode ser utilizado como plástico biodegradável para diversas finalidades e também como material biomédico, devido a sua característica de ser altamente hidrolisável no corpo humano, sem apresentar toxicidade. (25,28-30)

As diferentes características do PLA como ponto de fusão, resistência mecânica e cristalinidade, são delimitadas pela própria estrutura do polímero (devido às diferentes proporções de L, de D, ou de meso-lactide) e, também, pela massa molar (28). O PLA é um polímero semi-cristalino, com temperatura de transição vítrea de 57°C e ponto de fusão de 174 – 184 °C, o grupo metil do PLA faz com que ele seja hidrofóbico e mais resistente a hidrólise.

Os altos valores de massa molar é um dos parâmetros que tem influência direta na qualidade dos dispositivos poliméricos produzidos, já que valores maiores de massa molar

garantirão dispositivos com melhores propriedades mecânicas, fator imprescindível na busca de um biomaterial de alta qualidade (31).

O Poli (ácido-láctico) origina o Poli (L-ácido láctico) (PLLA) e o Poli (D- ácido láctico) (PDLA), e sua mistura forma o Poli (D,L- ácido láctico) (PDLLA) (32).

O PLLA possui excelentes características físicas, como resistência mecânica e plasticidade térmica, além de apresentar boa processabilidade e sua hidrólise resulta na quebra das cadeias poliméricas. Estas resultam em oligômeros, e então unidades monoméricas de ácido láctico, que podem sofrer ataques enzimáticos sendo completamente reabsorvíveis, e, então, naturalmente eliminadas do corpo humano através de vias metabólicas (33). Inicialmente, a hidrólise do polímero leva a queda da massa molar, particularmente nas regiões amorfas, de forma que a água se difunde por ele e o fragmenta, promovendo a queda da resistência mecânica e eventual redução da massa (34).

Devido às estas características, o PLLA tem sido alvo de diversos estudos, especialmente na área da engenharia de tecidos. Este biomaterial tem sido colocado como eventual substituto aos dispositivos metálicos, devido à sua capacidade de biorreabsorção, tornando uma segunda cirurgia para a remoção do material desnecessária após a recuperação do tecido afetado. Tal fato diminuiria os custos de cirurgias, o tempo de recuperação do paciente, assim como reduziria os riscos de complicações cirúrgicas. A Figura 3 demonstra alguns usos médicos do PLLA (13).

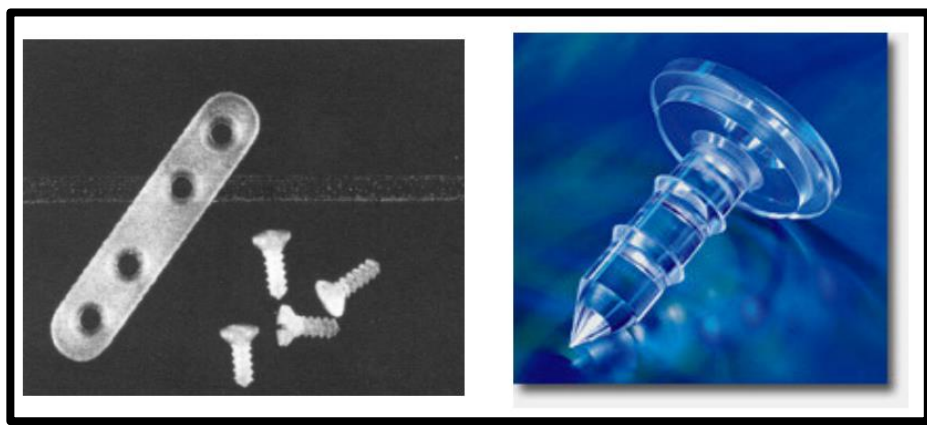


Figura 3. Pinos, parafusos e placas de PLLA (13).

- **PLDL – Poli (L-co-D,L-ácido láctico)**

O Poli (L-co-D,L-ácido láctico), é um copolímero da combinação dos monômeros L-láctico e D, L láctico, sendo o primeiro altamente cristalino e o segundo completamente amorfo, usado como blendas para reforçar outros materiais e manter as características de biodegradabilidade e biocompatibilidade.

O PLDL foi sintetizado com o objetivo de reduzir a cristalinidade apresentada pelo PLLA, conferir boas propriedades mecânicas ao material, e com tempo de degradação menor, de 2 a 6 meses, sendo adequado a recuperação do tecido ou a função exercida (35,36).

O PLDL é usado numa proporção de monômeros 70:30 de L:DL, sendo 70% L- ácido láctico e 30% D,L- ácido láctico, em uma copolimerização amorfa, no qual gera então um copolímero Poli (L-co-D,L-ácido láctico). Por se mostrar completamente amorfo, apresenta como consequência dessa ausência de cristalinidade, uma biocompatibilidade maior do que a apresentada pelo PLLA, além de uma excelente processabilidade (37). As unidades D,L-ácido láctico na sequência da cadeia do copolímero previnem a cristalização da parte L-ácido láctico, enquanto que a resistência do material é mantida durante o período necessário para a recuperação do tecido tratado (38).

O PLDL assim como o PLLA, quando em contato com os fluídos biológicos, sofre fragmentação gradativa de suas cadeias por hidrólise, até a liberação de moléculas de ácido láctico para o organismo, sendo então eliminado pelas vias metabólicas naturais. A taxa de degradação do copolímero é intermediária entre o poli (L-ácido láctico) e o poli (D,L- ácido láctico), característica muito interessante para o uso do material em diferentes aplicações médicas (39).

O PLDL é um material comercializado internacionalmente e de uso consolidado, especialmente como placas e parafusos para uso cirúrgico. A Figura 4 demonstra parafusos produzidos a partir do PLDL.



Figura 4. Parafusos Bioabsorvíveis PLLDL - SINFIX® PLLDL(40).

6. Eletrofição

Eletrofição (*electrospinning*) é uma técnica comumente usada na Engenharia de Tecidos para a manufatura de produtos de origem micrométrica e nanométrica. As nanofibras são consideradas fibras com diâmetros que variam de 10-2000 nm, nas quais diferentes alinhamentos das fibras eletrofiadas levam a formação de estruturas funcionais únicas, como, por exemplo, nanotubos e nanofios, assim como mantas com alta porosidade e conectividade para uso como *scaffold* (41-45).

O princípio do processo é, relativamente, simples, no qual uma solução polimérica é conectada a uma fonte de alta tensão, de forma que ela adquira carga eletrostática e polaridade, sendo então injetada através de um capilar, formando uma gota a qual é induzida em um campo eletrostático de polaridade oposta. Esta ao superar a tensão superficial da gota, leva a formação de um jato (cone de Taylor) no qual ao se mover pelo ar, leva a evaporação do solvente, e ao atingir um alvo metálico forma as nanofibras, as quais possuem diâmetro ajustável (46).

Essa técnica é, extremamente, interessante para uso na Engenharia de Tecidos, sendo que as nanofibras possuem uma alta relação entre área e volume, uma rede de poros altamente interconectada e fibras com diâmetros que mimetizam as dimensões de proteínas da matriz

extracelular, como o colágeno, por exemplo, levando a uma maior proliferação, migração e diferenciação celular.

O controle do diâmetro da nanofibras é feita principalmente pela variação da concentração do polímero dissolvido, assim como a carga aplicada entre o capilar e a placa coletora metálica.

Para o processo de Eletrofiação é utilizado um aparato como demonstrado na Figura 5 abaixo.

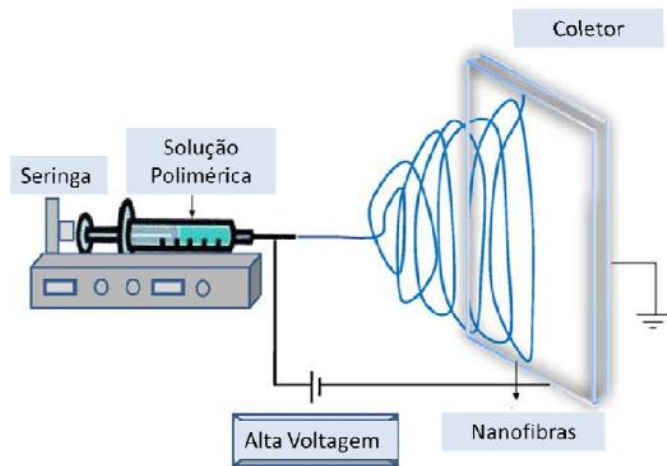


Figura 5. Esquema do processo de Eletrofiação (modificado de (56)).

7. Estudos *in vitro* e *in vivo*

O aumento da produção de materiais para o uso no ser humano, seja para uso cirúrgicos ou *drug-delivery*, determinou uma intensificação nas normas de teste e segurança destes. Sendo assim, todo material com a finalidade para uso médico deve passar por estudos prévios, inicialmente *in vitro*, e a seguir *in vivo*.

O uso de animais em testes biológicos é um assunto delicado e amplamente discutido na sociedade, havendo normas e leis que regem sua utilização, sendo esta, restrita em muitos países. Sendo assim, nos últimos 30 anos houve um aumento na busca de testes *in vitro* mais eficientes, visando à redução de testes em animais. Diversas normas foram publicadas como referências aos testes de cultura celular, de forma a determinar a citotoxicidade *in vitro* dos

materiais para uso médico (47-49). Agências regulatórias como a International Standards Organization (ISO) e American Society for Testing and Materials (ASTM) são as entidades internacionais que estabelecem as regras e os testes que devem ser realizados para a análise biológica de dispositivos médicos. Segundo as normas, dependendo do tipo de material, sua função e local de implantação, diferentes testes devem ser aplicados para averiguar se o material apresenta efeito tóxico nas células ou tecido em questão.

Experimentos controlados com células são importantes pois tem alta sensibilidade, permitem caracterizar eventos celulares fora do normal, assim como as bases genéticas e os processos fenotípicos envolvidos na transformação celular. É possível também comparar os comportamentos de linhagens celulares normais e anormais, além da possibilidade de análise de toxicidade aguda e crônica, que são muito mais expressivas em condições *in vitro* do que *in vivo* (50,51).

Com o avanço da biologia celular, novas técnicas para avaliar a biocompatibilidade de um material *in vitro* têm sido propostas (52). Estes promissores avanços podem auxiliar na diminuição do uso de experimentação animal e facilitar o processo de análise.

A norma ISO 10993-5(48,49), descreve os princípios gerais que regem as avaliações biológicas de dispositivos médicos. Esta tem como base de categorização, a natureza do material, seu local e tempo de aplicação no corpo, assim como a seleção dos testes adequados. A norma é dividida em 20 partes, no qual há diretrizes de caracterização, seleção de ensaios e requisitos técnicos a serem cumpridos. A parte 5 é a responsável pela avaliação inicial da biocompatibilidade, através da avaliação citotóxica. Os procedimentos para esta finalidade são descritos em padronização internacional, e possuem atualizações periódicas, sendo que a primeira versão foi publicada em 1993 e a última em 2009 (48,49).

Dentre os testes de biocompatibilidade existem os testes *in vitro* gerais e os específicos. O primeiro, utiliza linhagens celulares já estabelecidas, as quais são facilmente cultivadas e reproduzidas, como, por exemplo, fibroblastos (ex. L929 fibroblasto de rato, células VERO oriundas de rim de macaco-verde africano, BALB 3T3 clone 31), no qual os resultados representam uma triagem inicial dos materiais. Já nos testes específicos, utiliza-se a linhagem celular primária. Como, por exemplo, o uso de osteoblastos para averiguar a toxicidade de um material que irá entrar em contato com um osso. Esses resultados levam a uma melhor compreensão do desempenho *in vivo* do material em questão.

A citotoxicidade causada por substâncias/materiais tóxicos pode causar danos nas membranas celulares; diminuição da atividade metabólica; e dano no material genético

(genotoxicidade). Esses efeitos tóxicos podem levar a um decréscimo na produção de energia e síntese proteica, acarretando em alterações no transporte ativo via membranas celulares, proliferação celular reduzida e consequente morte celular.

Sendo assim, os métodos de avaliação *in vitro* da citotoxicidade celular envolvem a análise de mudanças do comportamento celular, como: redução da adesão celular; proliferação celular reduzida; alteração na morfologia celular; e morte celular, indicada pelo arredondamento e descolamento das células do substrato, assim como ausência ou mudança da atividade metabólicas e finalmente lise celular (53).

Para que um teste *in vitro* seja eficiente, faz-se necessário que este simule a situação *in vivo*, de forma que exista o transporte de nutrientes, uma coordenação entre os processos multicelulares, estabilidade e um microambiente que preserve a condição fenotípica das células. Para tal, o fenótipo e a função celular são, extremamente, dependentes das interações com as proteínas da matriz extracelular e com suas células vizinhas, que se organizam de forma tridimensional. Com essas condições em mente, o uso de cultura celular tridimensional tem se tornado mais frequente, de forma a usar um *scaffold* (arcabouço) com arquitetura tridimensional definida, a fim de promover o sucesso biológico do tecido (54).

Entretanto, a maioria dos ensaios *in vitro* realizados utiliza linhagem celular simples, as quais não refletem a interação real entre os diferentes tipos celulares que compõem um tecido *in vivo*, sendo então imprescindível a utilização do estudo *in vivo* para a avaliação de segurança dos diferentes materiais.

Nos testes *in vivo* é possível analisar a interação de diferentes tipos celulares, os efeitos de fatores hormonais, as interações com a matriz extracelular, assim como proteínas e moléculas. Os testes de cultura celular apresentam, de fato, informações importantes sobre o contato destas com os dispositivos médicos, entretanto para uma avaliação completa, faz-se necessário o uso complementar da experimentação animal (47).

Objetivos

Avaliar e comparar a biocompatibilidade do polímero Poli (L – Ácido Lático) (PLLA) desenvolvido e manufaturado no Instituto Nacional de Biofabricação (BIOFABRIS) e PLDL® PURAC - Purasorb 7038 já estabelecido no mercado, através de ensaios propostos na norma ISO 10.993-5.

Metodologia

- **Poli (L-ácido láctico) (PLLA)**

O Poli (L-ácido láctico) (PLLA) foi sintetizado no Instituto Nacional de Biofabricação (BIOFABRIS), como descrito no trabalho de Lopes (2014) (55).

- ***PLDL*®*PURAC***

O Poli (L-co-D,L-ácido láctico) PLDL® PURAC - Purasorb 7038, foi obtido da empresa Corbion Purac Biomaterials, produzido na Holanda.

- **Eletrofição**

Foram produzidas nanofibras de Poli (L- Ácido láctico) (PLLA) e PLDL Purac® por meio de Eletrofição. O PLLA foi dissolvido em Acetona e Clorofórmio, e o PLDL em Acetona.

A solução polimérica foi então carregada em uma seringa de 10 ml, conectada a um cilindro de poliamida, acoplada a uma agulha hipodérmica de 0,7 mm. O fluxo do jato (8ml/h) foi controlado utilizando uma seringa conectada a uma bomba controlável. Uma fonte de energia de 15kV foi usada para carregar a solução. A distância entre a agulha e a placa coletora foi de 17cm e o tempo de Eletrofição de 2hs. Para tal foi utilizado um aparato padrão como na Figura 5.

- ***Cultura Celular***

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biomateriais em Ortopedia (LABIMO) no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Para os ensaios *in vitro* em monocamada foram usadas linhagens celulares de fibroblastos de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

- **Cultura em Monocamada**

O meio de cultura celular utilizado foi composto de meio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM) GIBCO, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) GIBCO e 1% de penicilina e estreptomicina (PS, Gibco).

As células foram cultivadas em garrafas de 75cm³ e mantidas em incubadora de CO₂ (Sanyo Scientific, USA) à 37°C com 5% de CO₂ na atmosfera até alcançar confluência celular. As garrafas foram lavadas com solução salina fosfato (PBS, pH 7.4), e a seguir foi aplicada uma solução de 0.25% de tripsina-EDTA (1x) Gibco. Após este procedimento, as células em suspensão foram contadas por meio da Câmara de Neubauer.

Uma suspensão celular (3x10⁶ células por mililitro de meio) foi transferida em triplicata para placas de 96 poços, onde cada poço recebeu um volume de 200uL. Foram utilizadas três placas de 96 poços para os testes de MTT em que, após 24 horas de ambientação, cada poço recebeu as nanofibras de PLLA e PLDL e as células foram cultivadas em contato com as amostras por 24h, 48h e 72h. Para os ensaios de Eluição e Live/Dead® foi utilizado o mesmo procedimento e concentração celular. Para os ensaios de Contato Direto e Difusão em Ágar a suspensão celular foi inoculada em placas de 24 e 6 poços, respectivamente.

Avaliação da Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada através de testes de viabilidade celular: MTT, Eluição, Live/Dead®, Contato Direto e Difusão em Ágar.

- ***MTT* {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}**

Uma variação do método MTT de Mosmann (1983)(57) foi usado nesse estudo, no qual após os períodos de incubação dos polímeros PLLA e PLDL a cultura de fibroblastos, a solução de MTT (0.5 mg/mL Sigma) foi adicionada a cultura celular. Após um período de 4hs de incubação, esta foi removida e 200 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO) foi adicionado para determinar os valores de absorbância, a um comprimento de onda de $\lambda = 595$ nm, feito em um leitor de Microplacas (Microplate Reader F5, Molecular Probes).

Foram utilizados como controle positivo de toxicidade (CT+) uma solução de meio de cultura com 10% de fenol e como controle negativo de toxicidade (CT-) apenas meio de cultura.

Os valores de absorbância foram expressos como densidade ótica (OD) (valor \pm desvio-padrão).

- ***Eluição***

Para este teste, os polímeros PLLA e PLDL foram incubados em meio de cultura por 48hs. Após este período, o extrato obtido da incubação dos materiais foi removido e inoculado em uma cultura de células do tipo fibroblasto. Após diferentes períodos de incubação do extrato com os fibroblastos (24h, 48h e 72hs), o extrato foi removido e um teste colorimétrico foi realizado, como descrito no item MTT.

- ***Live/Dead®***

O kit de ensaio qualitativo de fluorescência Live/Dead® (Molecular Probes) foi usado, no qual os fibroblastos foram incubados com os polímeros PLLA, PLDL e seus respectivos controles positivos e negativos, em placas de 96 poços por 24h, 48h e 72h.

Após o período de incubação, as células foram lavadas com 200uL de PBS e tratadas com uma solução de calceína AM e homodímero de etídio-1 (EthD-1) de acordo com as instruções do fabricante (Kit Live/Dead® Viability cytotoxicity Molecular Probes TM). As células foram incubadas a 37°C durante 30 minutos e, em seguida, lavadas com PBS. Para a obtenção de imagens por microscopia óptica as células foram analisadas em microscópio óptico invertido equipado com lâmpada de fluorescência. (Nikon E800) com um programa de imagem específico (software Image Pro-Plus). As imagens apresentam as células verdes como vivas e as células vermelhas como mortas.

- ***Contato Direto***

Para a realização do teste de contato direto, fibroblastos foram cultivados em placas de 24 poços até atingirem uma alta confluência. O meio de cultura foi removido e trocado por meio fresco. As amostras de nanofibras de PLLA e PLDL foram então colocadas em contato com a cultura de fibroblastos e incubados por 24h, com 5% de CO₂ a uma temperatura de 37°C. Após esse período, os materiais e o meio de cultura foram removidos dos poços. As células foram então fixadas com álcool 70% e tingidas com os corantes Azul de Toluidina (AT) e Xilidina Ponceau (XP).

- ***Difusão em Ágar***

Uma camada confluenta de fibroblastos foi preparada em uma placa de cultura de 6 poços. O meio de cultura foi então removido e as células cobertas com uma solução de 2% de Ágar, no qual continha o corante vermelho neutro (*vital stain*).

As nanofibras de PLLA e PLDL foram colocadas no topo da superfície do Ágar, e incubadas por 24hs a uma temperatura de 37°C e 5% CO₂. Foram escolhidos como controles o Látex como controle positivo de toxicidade CT (+) e o Teflon como controle negativo de toxicidade CT (-).

Após o período de incubação, o material foi removido e as amostras observadas e fotografadas.

- ***Análise Estatística***

Para a averiguação dos dados gerados pelos ensaios quantitativos de MTT e Eluição, foi utilizado o software StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

Para a análise de dados paramétrico, foi utilizado o teste estatístico ANOVA (one-way), no qual análises com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Sendo os experimentos realizados em triplicatas.

Resultados

Artigo: Comparative analysis of biocompatibility between Poly (L-lactic acid) (PLLA) and PLDL Purac® nanofibers for use in Tissue Engineering.

Chemical Engineering Transactions; 2016: 49:199-204. DOI: 10.3303/CET1649034

CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS

VOL. 49, 2016

Guest Editors: Enrico Bardone, Marco Bravi, Tajalli Keshavarz
Copyright © 2016, AIDIC Servizi S.r.l.,
ISBN 978-88-95608-40-2; ISSN 2283-9216

A publication of



The Italian Association
of Chemical Engineering
Online at www.aidic.it/cet

Comparative analysis of biocompatibility between Poly (L-lactic acid) (PLLA) and PLDL Purac® nanofibers for use in Tissue Engineering

Ana Carolina B. Benatti^{a,b*}, Mariana V. Xavier^a, Milton F. Macedo^a, Ana Amélia Rodrigues^a, André L. Jardim^a, Rubens M. Filho^a, Paulo Kharmandayan^{a,b}

^a Institute of Biofabrication - School of Chemical Engineering, University of Campinas, CEP 13081-970, Campinas-SP, Brazil

^b School of Medical Sciences, Surgery Department, University of Campinas, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brazil

carol_benatti@hotmail.com

The absorbable polyacid, poly (L-Lactide) (PLLA) is one of the most commonly used and studied materials in tissue engineering, for its biocompatibility and biodegradability. This work will show that the PLLA synthesized at our laboratory has the same biocompatibility as the PLDL Purac®. The PLLA was synthesized through ring-opening polymerization and manufactured into nanofibers through the electrospinning process. The cytotoxicity of the material was evaluated by the calorimetric MTT assay (Sigma), Live/Dead (Molecular Probes), Direct Contact, Elution and Agar Diffusion. The assays were performed using nanofibers membranes made with PLLA and with PLDL Purac®, where the biomaterials were in contact with the fibroblast cell culture, in the sense to compare the results between them. For the MTT, Live/Dead and Elution assays the nanofiber membranes were incubated with the fibroblast cell culture for 24h, 48h and 72h. For the Direct Contact and Agar Diffusion the nanofiber membranes were maintained in contact with the cells for 24h. For the assay controls we used

DMEM-LG containing 0.5% phenol as the positive control of toxicity CT(+) and for negative control of toxicity CT(-) DMEM-LG containing 10% FBS. The ANOVA test was used to measure the MTT assay results, and within 24h of exposure, the cells in contact with the PLLA showed a higher proliferation rate than CT(-) and PLDL Purac®, being significantly different ($p < 0,05$). Whatsoever, there were no statistically significant differences between the PLLA, the PLDL Purac®, and the CT(-) after 48h and 72h of culture ($p > 0.05$). The morphology of the cells in contact with both biomaterials was also considered normal, showing no signal of cytotoxicity. The high rates of proliferation and viability of the cells in contact with the PLLA, shown by the biocompatibility assays, demonstrate that the PLLA is a biocompatible material. The PLDL Purac® exhibited similar results, as expected. Those findings show that the PLLA synthesized has the same biocompatibility as the PLDL Purac®. Thus, the PLLA synthesized in our laboratory is a high quality biomaterial that can assist in the manufacturing of nanofibers that can be adapted for different biomedical applications.

1. Introduction

Polymers constitute a very wide-ranging class of biomaterials, with diverse uses in the biomedical field. These biomaterials must show suitable mechanical properties as well as biocompatibility characteristics, for use in the human body. Therefore, they should not present any local or systemic adverse biological response. PLA is known for its outstanding biocompatibility and mechanical properties. It also features a diversification of applications, since simple changes in its physical and chemical structure may make it useful in different areas. It can be used as a combination of L-lactic (PLLA) and D, L-lactic (PLDL) acid monomers, being the latter rapidly degraded without formation of crystalline fragments during this process (Fukushima et al. 2008). Therefore, PLA and its copolymers are materials commonly used in tissue engineering. Whereas one of the goals of tissue engineering is to help improve tissue regeneration, the use of nanofiber membranes, combined with their potential for biodegradation, could be of interest for various biomedical applications, since they mimic the natural extracellular matrix (ECM), providing an excellent environment for the cells to attach, grow and migrate, thus improving the rate of tissue regeneration (Dong et al. 2009). In the present study, we synthesized PLLA in our laboratory through ring-opening polymerization and manufactured nanofiber membranes with it. To assay the biocompatibility of the material, we performed different biocompatibility experiments, and we compared it with PLDL Purac®

nanofibers membranes, a PLA co-polymer commonly used in tissue engineering, with excellent biocompatibility characteristics (Leiggener et al. 2006).

2. Materials and Methods

2.1 Manufacturing of PLLA and PLDL nanofibers

For electrospinning, the biodegradable and biocompatible polymers PLDL Purac® and Poly(L-lactic acid) (PLLA) were used. PLLA was synthesized in our laboratory as described by Lopes (2014). In the nanofibers manufacturing process, the PLLA was dissolved in acetone and chloroform, and PLDL in acetone, both at analytical grade. The solution was then loaded in a 10ml syringe, connected to a polyamide cylinder, attached to a 0.7mm hypodermic needle as a nozzle. The flow rate of the jet (8ml/h) was controlled by using a syringe pump. To charge the solution, a 15kV high voltage power-source was used. The distance between the needle and the collector plate was of 17cm and the time of electrospinning of 2h.

2.2 Cell Incubation

The Vero cells (fibroblast) were seeded (3×10^6 cells/mL) in a culture plate and incubated with 5% CO₂ at 37°C for 24h. Then, PLLA and PLDL nanofibers were added in wells and cultured for different times. DMEM-LG containing 0.5% phenol and 10% FBS were used as the positive control CT(+) and negative control CT(-) for toxicity, respectively. All experiments were performed at least in triplicate (n=3).

2.3 MTT

The modified Mosmann (1983) method was chosen to perform the MTT assay. For this assay, after periods of incubation, the MTT solution (0.5 mg/mL Sigma) was added, and after 4h of incubation it was withdrawn and 200 µl of dimethyl sulphoxide (DMSO) was added to determine the absorbance values, at an absorption wavelength of $\lambda = 595$ nm (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate reader, Molecular Probes). The resulting absorbance values were expressed as optical density (OD) (mean value \pm standard deviation). The comparison between the values was made through parametric data analysis One-way ANOVA. Analysis with p

<0.05 were considered significant. Analyzes were performed by using StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.4 Elution

The elution assay is a quantitative method designed to show the presence of toxic material eluted from a test sample and the effects on the fibroblast cells cultured in the presence of the extract. For this assay, the materials were incubated in culture medium for 48h. After this period, the extract obtained from incubation of materials was inoculated with the fibroblast cells, prepared as mentioned in item 2.2. After various incubation periods (24, 48 and 72h), the extract was removed and a colorimetric assay was performed, as mentioned in item 2.3.

2.5 Live/Dead®

The qualitative fluorescence assay kit Live/Dead® (Molecular Probes) was used to qualify the fibroblast viability. After the incubation time, the cells were washed with 200 µl of PBS and treated with a solution of Calcein AM and Ethidium homodimer-1 (EthD-1) according to the manufacturer's instructions. The cells were incubated at 37°C for 30 min, then washed with PBS and observed by inverted fluorescence microscopy (Nikon E800) with a specific program (Image Pro-Plus software).

2.6 Direct Contact

For direct contact assay fibroblasts were cultured into a high confluence layer in a 24 wells plate. Then, the culture medium was removed and replaced with fresh one. The nanofiber samples of PLLA and PLDL were placed onto the culture and incubated for 24h, with 5% CO₂ at 37°C. After this period, the materials and culture medium were removed from the wells. The remaining cells were fixated with alcohol 70% and then stained with Toluidine Blue (TB) and Xylidine Ponceau (XP). The stain only works on the living cells, and thus, the toxicity of the material is indicated by the absence of stained cells around the material.

2.7 Agar Diffusion

The agar diffusion assay is a qualitative test designed to show toxic effects of the material on cell morphology. A near confluent layer of fibroblasts was prepared in a 6-well culture plate. The medium was removed and the cells covered with a solution of 2% agar, which contained [vital stain](#). While the agar solidified, the cells dispersed through it. The PLLA and PLDL nanofibers were then placed onto the surface overlaid of the agar and incubated for 24h at 37 °C. Latex was chosen as positive control of cytotoxicity CT(+) and Teflon as the negative control of cytotoxicity CT(-). The live cells take up the neutral red vital stain and retain it, while the dead cells do not. Thus, the toxicity of the material were evaluated by the loss of vital stain under and around the material, allowing differentiating the viable from the lysed cells.

3. Results and Discussion

3.1 Cytotoxicity by MTT assay

Cytotoxicity tests were performed to study the polymer biocompatibility. In this study, we chose the MTT assay where the metabolic activity and the rate of cell growth indicated the degree of cytotoxicity of the PLLA and PLDL in the cell culture. MTT is a yellow salt that is reduced by mitochondrial dehydrogenase activity of the enzyme, resulting in a formazan purple salt. This reduction occurs only in living cells. Thus, cell viability was determined by the intensity of purple color, which is proportional to the amount of formazan crystals formed. After performing the MTT test, the absorbance values obtained generated the curves below (Figure 1). The graph shows the proliferation of fibroblast cells in contact with the PLLA and PLDL after 24, 48 and 72h of exposition.

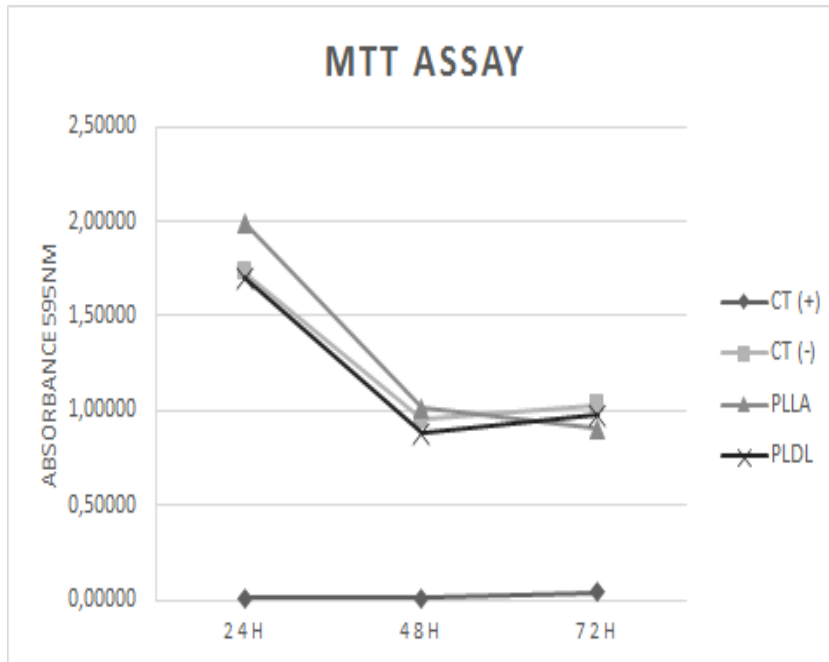


Figure 1. MTT assay for fibroblast cells cultured with PLLA and PLDL, negative control for toxicity CT(-) and positive control for toxicity CT(+) for 24 h, 48 h and 72 h.

According to the ANOVA test, after 24h of exposure, there were statistical differences ($p < 0,05$) between CT(-), PLLA and PLDL, with PLLA showing a higher rate of cell proliferation than PLDL and CT(-). Whatsoever, there were no statistically significant differences between the PLLA, PLDL and the (CT-) after 48h and 72h of culture ($p > 0.05$). Those results appoint that at the initial exposure time, where the medium is rich in nutrients and space for the cells to proliferate, there is a high rate of cellular growth. The presence of the nanofibers stimulate the cell development, which explains the higher amount of cells when cultured with the PLLA and PLDL nanofibers, than on the CT(-). Those findings show that the synthesized PLLA and the PLDL do not present cytotoxic behavior with respect to the fibroblast cells in the evaluated periods, in accordance with the MTT studies of Sarasua et al. (2011) and Wu et al. (2014).

3.2 Elution

The elution assay is a quantitative technique designed to show the incidence of toxic material eluted from a test sample into the culture medium. Figure 2 shows the kinetics of the cells

exposed to the PLLA and PLDL nanofibers. As observed, the positive control of cytotoxicity CT(+) shows a very little presence of live cells. As for the negative control CT(-), cells with PLLA nanofibers and cells with PLDL nanofibers, both showed a high rate of proliferation at 24h of incubation, with no statistical difference between them, where at 24h of incubation there was a high amount of space and nutrients for the cells to multiply. At 48h there was a decrease in cell proliferation for CT(-), PLLA and PLDL, probably due to the increasing amount of metabolites and the decreased quantity of space and nutrients for the cells. The same happened at 72 h of incubation. These findings show that the synthesized PLLA and the PLDL does not negatively affect the fibroblast cell viability in the evaluated time periods.

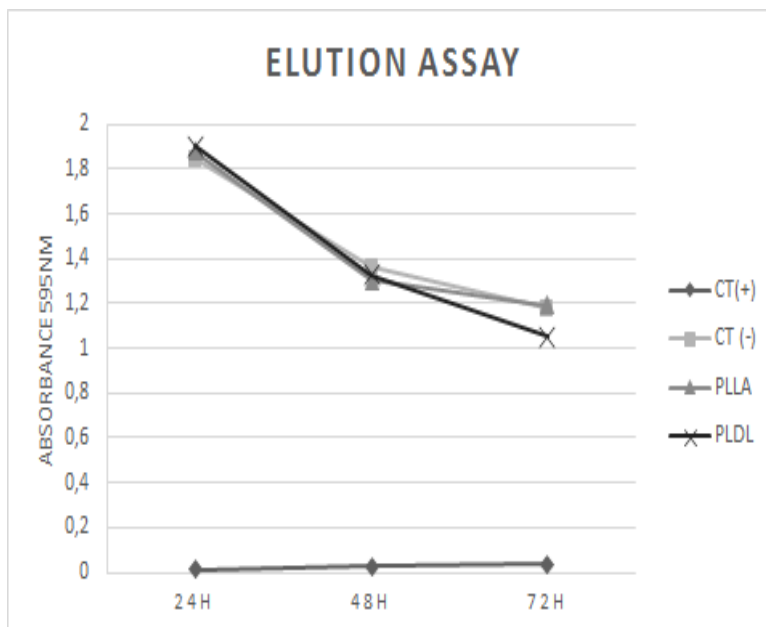


Figure 2. Elution assay for fibroblast cells cultured with PLLA and PLDL, negative control for toxicity CT(-) and positive control for toxicity CT(+) for 24 h, 48 h and 72 h.

3.3 Viability by LIVE/DEAD®

The Live/Dead® assay provides a qualitative evaluation of the polymer biocompatibility when in contact with the cells. The fibroblast were cultured with the biomaterials at three different times: 24, 48 and 72h, along with it controls of toxicity. The calcein present in live cells produces an intense green fluorescence, which is determined by the enzymatic conversion of the non-fluorescent cell-permeant agent, calcein AM. EthD-1 enters cells with damaged

membranes undergoing a strong fluorescence enhancement upon binding to nucleic acids, thereby producing a bright red fluorescence in dead cells. EthD-1 is excluded by the intact plasma membrane of live cells.

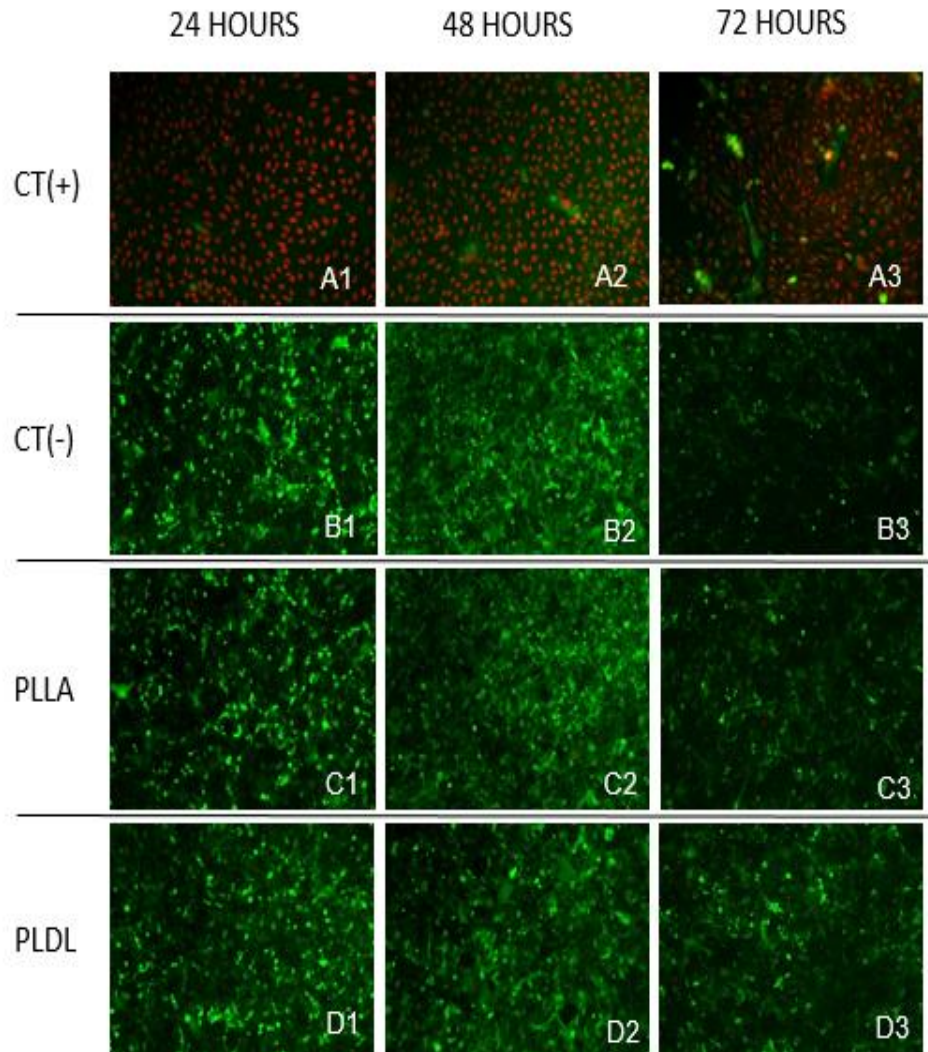


Figure 3. Live/Dead assay of fibroblast in contact with PLLA and PLDL at different times. A – Positive control CT(+). B – Negative control CT(-). C – PLLA nanofibers cultured with fibroblasts. D – PLDL nanofibers cultured with fibroblasts.

Figure 3 presents the results of the Live/Dead assay. Images A show the positive control of toxicity CT(+) where the cells were red stained, showing cell death at all times. Images B shown the negative control of toxicity CT(-), where, at different times, cells were stained in fluorescent

green indicating that the cell membrane was intact. Images C show the cells in contact with PLLA for 24h, 48h and 72 h, respectively. They all showed normal morphology, as the ones at CT(-); however, at 72h we can see some cells red stained, showing that there are some dead cells. Whatsoever, at 72h of incubation, there are less nutrient and space for the cells to keep proliferating, with a high amount of metabolites in the culture medium. This can be the reason for the appearance of a higher number of dead cells in the culture. The same results were obtained for the cells in contact with PLDL, as shown in Images D. Those results show that the presence of PLLA and PLDL nanofibers did not affect negatively cell proliferation and morphology, instead improved cell proliferation, in line with the results previously shown by Bernstein et al. (2012), who tested PLLA with different formats, such as screws and pins through LIVE/DEAD® assay. Hence the qualitative assay of Live/Dead corroborate the quantitatively cytotoxicity assay MTT.

3.4 Direct Contact

The cells were directly exposed to the PLLA and PLDL nanofibers to assay if their presence would cause toxic effects on cell morphology. Since only live cells are stained, we can measure the toxicity of the material through the lack of stain around the area exposed to the material. Figure 4 presents the results of the assay; Images A report the control, where no material was in contact with the fibroblast, showing normal cell morphology (A1 and A2). Images B show the cells in contact with PLLA nanofibers and stained with Toluidine Blue (B1) and Xylidine Ponceau (B2), both images show a normal cell morphology, indicating that the PLLA nanofibers present no toxicity for the fibroblasts. Images C show the cells in contact with PLDL nanofibers and stained with Toluidine Blue (C1) and Xylidine Ponceau (C2) indicating that the PLDL nanofibers also present no toxicity for the fibroblasts.

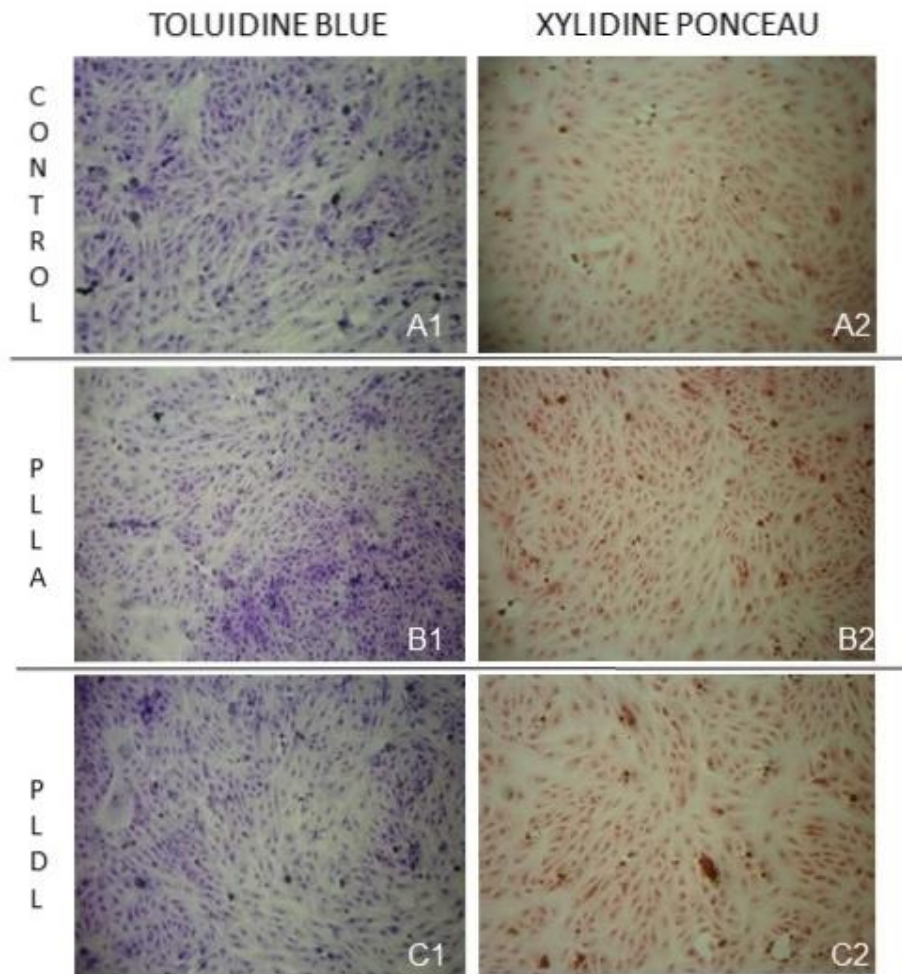


Figure 4. Direct Contact assay. Cells in contact with PLLA and PLDL stained with Toluidine Blue and Xylidine Ponceau.

3.5 Agar Diffusion

The agar diffusion assay is a qualitative test, where one can assay the toxicity of a material from the lack of dye around it, since only live cells can be stained. Figure 5 show the fibroblast cells in contact with PLLA, PLDL and their respective controls. On image A we can see the lack of dye of the cells in contact with the Latex CT(+), showing cell death. On image B, the cells were all stained with vital stain neutral red when in contact with the Teflon CT(-), showing that the cells were alive and with normal morphology. Image C show the cells in contact with PLLA nanofiber and image D with PLDL nanofibers. On both images, the cells were stained, both presenting normal morphology. This demonstrated that both materials do not present any toxic effect on cell culture.

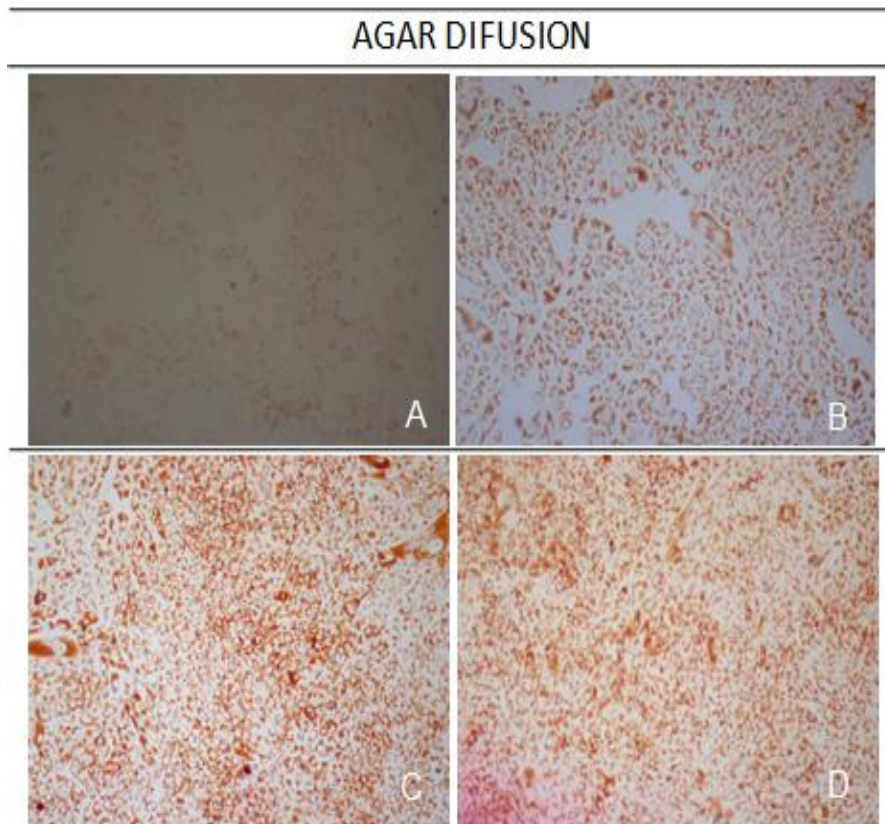


Figure 5. A – Positive Control of Toxicity (Latex). B – Negative control of toxicity (Teflon). C- Cells exposed to PLLA nanofibers. D- Cells exposed with PLDL nanofibers.

4. Conclusion

The results of the MTT assay, Live/Dead, Direct Contact, Elution and Agar Diffusion bring to the conclusion, that both PLLA nanofibers and PLDL® nanofibers do not present toxic effect on fibroblast cell cultures. Moreover, there were no statistical differences between the quantitatively results of PLLA and PLDL® on the MTT and Elution assays. This show that the PLLA synthesized in our laboratory has the same biocompatibility characteristics than the PLDL®, a material available on the market.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the financial support provided by the Scientific Research Foundation for the State of São Paulo and National Council for Scientific and Technological Development.

Reference

- Fukushima K., Kimura Y., 2008, An efficient solid-state polycondensation method for synthesizing stereocomplexed poly(lactic acid)s with high molecular weight. *J Polym Sci Part A: Polym Chem.* 46, 3714–3722.
- Dong Y., Liao S., Ngiam M., Chan C. K., Ramakrishna S., 2009, *Tissue Eng. Part B. Rev.* 15, 333-351.
- Leiggener C.S., Curtis R., Muuller A.A, Pfluger D., Gogolewski S., Rahn B.A., 2006, Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration. *Biomaterials.* 27,202–207.
- Lopes M. S., 2014, Microreactor development for Synthesis of Bioabsorbable Polymer (PLLA) used as biomedical implants. Campinas, 2014. PhD Program in Chemical Engineering. State University of Campinas.
- Mosmann T., 1983, Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Sarasua J.R., Rodriguez-Lopez N., Zuza E., Petisco S., Castro B., del Olmo M., Palomares T., Alonso-Varona A., 2011, Crystallinity assessment and in vitro cytotoxicity of polylactide scaffolds for biomedical applications. *J Mater Sci: Mater Med.* 22, 2513–2523.
- Wu G., Wu W., Zheng Q., Li J., Zhou J., Hu Z., 2014, Experimental study of PLLA/INH slow release implant fabricated by three dimensional printing technique and drug release characteristics in vitro. *Biomed Eng Online.* 19, 13:97.
- Bernstein A., Tecklenburg K., Südkamp P., Mayr H.O., 2012, Adhesion and proliferation of human osteoblast-like cells on different biodegradable implant materials used for graft fixation in ACL-reconstruction. *Arch Orthop Trauma Surg.* 132 (11), 1637-1645.

Discussão Geral

Biomateriais e Dispositivos Médicos – Contextualização

No Brasil, a produção de biomateriais é limitada e, em alguns casos, inexistentes, levando a uma necessidade de importação desses materiais para o uso, o que eleva o custo de uso destes para terapias, impossibilitando o uso dos biomateriais em muitos casos.

Os biomateriais seriam usados para corrigir/regenerar lesões de tecidos, levando a uma melhora na qualidade de vida das pessoas que enfrentam problemas de saúde, de forma que um paciente inativo possa retornar as suas atividades sociais e econômica.

Produzir biomateriais de boa qualidade no Brasil é, portanto, vital para abranger o uso dessas terapias, sendo que estes possuiriam um custo menor, sem necessidade de importação, facilitando e democratizando o acesso aos pacientes, especialmente aqueles atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

MTT

O teste de citotoxicidade MTT foi realizado a fim de estudar a biocompatibilidade dos polímeros. Nesse teste, a atividade metabólica e a taxa de crescimento celular indicam o nível de toxicidade do PLLA e do PLDL na cultura celular. O MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolio]} é um sal amarelo que quando reduzido pela atividade enzimática da desidrogenase mitocondrial, resulta na formação de um sal de coloração púrpura, o formazan.

Desidrogenases mitocondriais, existem somente em células metabolicamente ativas, as quais clivam o anel de tetrazólio. Este um composto de coloração amarela, se transforma em um composto de coloração púrpura, chamado de formazan {E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}. O formazan é um cristal insolúvel em soluções aquosas, de forma que a produção deste reflete o estado funcional da cadeia respiratória, no qual quanto maior a atividade metabólica maior a concentração de cristais de formazan formados.

O gráfico da Figura 1 dos Resultados mostra a proliferação das células fibroblásticas em contato com os polímeros PLLA e PLDL após os períodos de exposição de 24, 48 e 72 horas.

O teste estatístico ANOVA foi realizado para averiguar as diferenças estatísticas entre os resultados apresentados. Após o período de 24 horas de exposição das células aos polímeros, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o CT (-), PLLA e PLDL, no qual as células em contato com o PLLA mostraram uma taxa de proliferação maior do que as em contato com PLDL e CT(-), no qual $p = 0,0399$.

Entretanto, não houve diferença significativa entre o PLLA, PLDL e o CT (-) nos períodos de exposição de 48 e 72 horas ($p > 0,05$). Esses resultados apontam que no período inicial de exposição das células aos polímeros, onde o meio de cultura é rico em nutrientes e espaço para as células proliferarem, há um crescimento mais significativo, seguido por uma diminuição na proliferação em 48h e 72h.

Estes dados indicam que o PLLA sintetizado e o PLDL ®Purac não apresentam efeito tóxico na cultura de fibroblastos nos períodos avaliados, estando de acordo com a literatura, no qual Sarasua et al. (2011) (58) utilizou o ensaio de MTT para avaliar a biocompatibilidade de scaffolds de PLLA e PDLA em uma cultura de fibroblastos por 24,48 e 72hs, no qual tanto o PLLA quanto o PDLA não apresentaram efeitos tóxicos nos períodos avaliados. No trabalho de Wu et al. (2014) (59) no qual implantes de PLLA com função de *drug-delivery*, foram expostos a células mesenquimais de rato, não apresentaram efeitos tóxicos a cultura celular após os diferentes períodos de exposição. Sheng et. al. (2015) (60) estudou scaffolds esponjosos de PLLA, no qual o material foi exposto a células HeLa por 24h, 48h e 72h, e então o ensaio de MTT foi realizado para avaliar a citotoxicidade e a biocompatibilidade celular, no qual os scaffold de PLLA não apresentaram efeito tóxico sobre a cultura celular, e ainda estimularam o crescimento celular. Resultados similares foram encontrados nos trabalhos de Kabrini et al. (2015)(61) com scaffold de nanofibras de Poli (L-Ácido láctico)/Policaprolactona(PLLA/PCL) para regeneração nervosa no qual os scaffold não apresentaram efeito tóxico as células, assim como no trabalho de Ramezanifard et al. (2016)(62) com nanoscaffolds de nanofibras de PLLA recobertos com nanopartículas de willemita (Zn_2SiO_4) para regeneração óssea no qual os materiais não apresentaram efeitos tóxicos as células mesenquimais.

Eluição

O teste de Eluição é um dos testes propostos pela ISO 10993-5 para avaliação citotóxica de materiais de uso médico. A técnica consiste em mostrar a incidência de material tóxico eluído de uma amostra no meio de cultura. O teste quantitativo indica o efeito do extrato em uma cultura celular, de forma a mostrar se há ou não um efeito tóxico a partir do material eluído. Após a exposição das células ao extrato, um teste colorimétrico é realizado e as absorvâncias são medidas.

O gráfico da Figura 2 dos Resultados mostra a cinética das células expostas as nanofibras de PLLA e PLDL, assim como seus respectivos controles. Como observado, o controle positivo de toxicidade CT(+) mostra uma presença muito baixa de células vivas, como esperado. Já o controle negativo de toxicidade CT(-), assim como as células expostas as nanofibras de PLLA e PLDL, mostram uma taxa maior de proliferação no período de 24 horas de incubação, não apresentando diferença estatística entre elas. Nesse período inicial de proliferação celular, o meio de cultura é rico em nutrientes e espaço, ideal para uma maior proliferação celular.

Nas amostras com 48 horas de incubação, há uma queda na proliferação celular das células do CT(-), assim como as expostas as nanofibras de PLLA e PLDL, provavelmente devido a diminuição do espaço e nutrientes disponíveis para as células, e um aumento na quantidade de metabólitos no meio de cultura. O mesmo pode ser observado após 72 horas de incubação, sem haver diferença estatística entre CT(-), PLLA e PLDL.

Esses resultados mostram que o PLLA sintetizado e o PLDL não apresentam efeito negativo na viabilidade das células do tipo fibroblasto nos diferentes períodos avaliados. Esses dados corroboram com o teste quantitativo de MTT.

Live/Dead®

O teste de Live/Dead® é uma avaliação qualitativa da biocompatibilidade dos polímeros quando em contato com as células. O teste permite diferenciar as células vivas das mortas pela sua fluorescência, sendo que as células vivas são marcadas pela cor verde e as mortas pela cor vermelha.

A calceína presente nas células vivas produz uma coloração verde fluorescente, devido à conversão enzimática do agente não fluorescente, Calcein AM, enquanto que nas células mortas o EthD-1 adentra as células que possuem danos em sua membrana, e se liga aos ácidos nucleicos gerando a forte fluorescência vermelha. O EthD-1 é excluído das células vivas, que apresentam membrana celular intacta (63).

A Figura 3 dos Resultados apresenta as imagens dos testes de Live/Dead®. As imagens A1, A2 e A3 mostram o controle positivo de toxicidade CT(+) em diferentes tempos (24, 48 e 72hs respectivamente), no qual as células foram coradas de vermelho, mostrando a morte celular como esperado.

As imagens B1, B2 e B3 mostram o controle negativo de toxicidade CT(-), em diferentes tempos (24, 48 e 72hs respectivamente), as células foram coradas em um verde fluorescente, mostrando que as membranas celulares das células estavam intactas e, portanto, as células estavam vivas.

As imagens C1, C2 e C3 mostram as células em contato com as nanofibras de PLLA nos tempos de 24h, 48h e 72h respectivamente. Todas as imagens mostram células com morfologia normal, assim como as células do CT(-), entretanto, após 72 horas de exposição podemos observar algumas células coradas de vermelho, o que mostra que houve morte celular. Após 72 horas de exposição, há uma grande quantidade de metabólitos no meio de cultura e uma quantidade menor de nutrientes, o que leva a existência de algumas células mortas.

Os mesmos resultados foram encontrados nas células cultivadas com as nanofibras de PLDL, como mostradas nas imagens D1, D2 e D3, nos tempos de 24h, 48h e 72h respectivamente. Esses resultados mostram que a presença das nanofibras não afetou negativamente a morfologia e proliferação celular. Esses dados estão de acordo com os trabalhos de Hanson et al. (2007) (64) no qual testou o efeito do tratamento de plasma de oxigênio na aderência de células mesenquimais humanas a scaffolds de PLLA, e para isso utilizou do ensaio de Live/Dead® para averiguar se o tratamento afetaria a viabilidade celular, constatando que o tratamento não teve efeito tóxico nas células. Assim como o trabalho de Bernstein et al. (2012) (65), no qual testou o PLLA em diferentes formatos, como pinos e parafusos através do teste de Live/Dead® Portanto, o resultado do teste qualitativo de Live/Dead® corrobora com o teste quantitativo de MTT.

Contato Direto

O teste qualitativo de contato direto proposto pela norma ISO 10993-5(49) busca concluir se as células expostas diretamente com as nanofibras de PLLA e PLDL sofrerão efeito tóxicos, de forma a afetar sua morfologia.

Para tal, após a exposição aos materiais, as células foram coradas com dois diferentes corantes, Azul de Toluidina (AT) e Xilidina Ponceau (XP). O corante Azul de Toluidina é um corante que marca seletivamente grupos ácidos de componentes teciduais, apresentando afinidade pelo DNA dos núcleos celulares e pelo RNA presente no citoplasma, os quais fixam o corante e coram-se profundamente (66). Já o corante Xilidina Ponceau é utilizado para detectar proteínas (67).

Considerando que apenas células vivas podem ser coradas, pode-se medir a presença de toxicidade pela falta de coloração nas áreas expostas em torno do material.

Na Figura 4 dos Resultados, apresenta-se as imagens do teste de Contato Direto.

As Imagens A1 e A2, apresentam o controle do teste, onde não há nanofibras em contato com a cultura de fibroblastos, apresentando morfologia celular normal. Na imagem A1 as células foram coradas com Azul de Toluidina e as células em A2 com Xilidina Ponceau.

As Imagem B1 e B2, indicam os fibroblastos em contato com as nanofibras de PLLA, coradas com Azul de Toluidina (B1) e Xilidina Ponceau (B2). Em ambas as imagens há células coradas, que apresentam morfologia normal, indicando que a presença das nanofibras de PLLA não apresentam efeito tóxico a cultura celular.

Nas imagens C1 e C2, as células em contato com as nanofibras de PLDL foram coradas com Azul de Toluidina (C1) e Xilidina Ponceau (C2), sendo que todas as células foram coradas e apresentaram morfologia normal, como esperado. Isto indica que o PLDL também não apresenta efeito tóxico para os fibroblastos.

Esses dados corroboram com os resultados encontrados da literatura como no trabalho de Wu et al. (2014) (59), que realizou o ensaio de contato direto para avaliar a biocompatibilidade de um implante de PLLA com função de *drug-delivery*, no qual células mesenquimais de rato foram cultivadas e colocadas em contato direto com o implante por 1,2 e 3 dias. Após os diferentes períodos de exposição as células cresceram e se fixaram, sem a presença de células anormais em torno do implante. O crescimento uniforme das células mesenquimais em torno do implante, com morfologia normal, indicaram não haver sinais de toxicidade.

Difusão em Ágar

O teste de difusão em ágar é um teste qualitativo proposto pela norma ISO 10993-5(49), no qual se pode avaliar a viabilidade celular com auxílio de corantes vitais, como o vermelho neutro (*vital stain*).

O corante vermelho neutro é solúvel em água, penetrando a membrana celular e se concentrando nos lisossomos (68). Existem substâncias as quais lesam as membranas celulares, levando a uma diminuição da ligação com o vermelho neutro. Logo, é possível diferenciar as células vivas das mortas, através da intensidade de coração das células e ao redor destas.

Para tal, é necessária a avaliação qualitativa através de um exame microscópico das células, de forma a analisar a morfologia geral, assim como a lise celular, sendo o resultado considerado atóxico, leve, moderado ou de severa toxicidade.

A análise microscópica da integridade celular, como demonstrado na Figura 5 dos Resultados, mostrou que o controle positivo de toxicidade CT(+), imagem A, no qual se observa a falta de coloração ao redor das células em contato com o Látex, o que indica que houve lise e morte celular, liberando o corante vermelho neutro, dando um aspecto incolor em torno do material, se mostrando tóxico como esperado.

Já na imagem B, apresenta o controle negativo de toxicidade CT(-), no qual as células em contato com o Teflon foram coradas, indicando que as células incorporaram o corante vermelho neutro, indicando que suas membranas celulares estavam intactas e com morfologia normal, se mostrando atóxico como esperado.

A imagem C, apresenta os fibroblastos em contato com as nanofibras de PLLA, sendo observado uma intensa coloração, e também uma morfologia considerada normal, indicando que as membranas das células estavam intactas, e, portanto, as células vivas. Estes achados estão de acordo com os apresentados pelo controle negativo, indicando que as nanofibras de PLLA não apresentam toxicidade para a cultura celular, e são, portanto, atóxicas.

A imagem D, mostra as células em contato com as nanofibras de PLDL, na qual também não foi apresentado toxicidade, a qual se pode concluir pela intensa coloração, integridade e morfologia normal dos fibroblastos. O PLDL, assim como o PLLA, não apresenta efeito tóxico à cultura celular, e é, portanto, atóxico.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura como no trabalho de Wang et al. (2014) (69), que avaliou a viabilidade celular do copolímero Poli (ácido lático)/

Quitosana (PLA-CS) usando difusão em ágar, e concluindo que o material não apresentou efeito tóxico as células.

Conclusão

Os testes de biocompatibilidade realizados, propostos pela norma ISO 10993-5, indicaram que os materiais não apresentaram toxicidade à cultura de fibroblastos à qual foram expostos.

O PLLA sintetizado pelo Instituto Nacional de Biofabricação apresentou características de biocompatibilidade semelhantes ao PLDL ®PURAC.

Referências

1. Vaquette C, Cooper-White J. Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration. *Acta Biomater.* 2011; 6: 2544-57.
2. Revati M, Abdul Majid MS, Normahira M. Biodegradable Poly(Lactic Acid) scaffold for tissue engineering: a brief review. *Journal of Polymer Science and Technology.* 2015;1: 16-24.
3. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 2005; 15: 13-21.
4. Ma PX. Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008; 60: 184–98.
5. Mironov V, TruskT, KasyanovV, LittleS, SwajaR, MarkwaldR. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. *Biofabrication.* 2009; 1: 1-16.
6. Melchels FP, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials.* 2010; 31: 6121-130.
7. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2007; 59:1413–433.
8. Mirtchi AA, Lemaitre J, Terao N. Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate--monocalcium phosphate system. *Biomaterials.* 1989;10(7):475-80.
9. Williams DF. *Definitions in Biomaterials (Progress in Biomedical Engineering).* 4th ed. Amsterdam. Elsevier. 1987.
10. Piotrowska U, Sobczak M. Enzymatic polymerization of cyclic monomers in ionic liquids as a prospective synthesis method for polyesters used in drug delivery systems. *Molecules (Basel, Switzerland).* 2015; 20: 1–23.
11. Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E, Leong KW. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology.* 2001; 61: 1189–224.
12. Wiebe J, Holger M, Hamm CW. Current Status of Bioresorbable Scaffolds in the Treatment of Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology.* 2014; 64: 2541–551.

13. Jahno VD. Síntese e Caracterização do Poli(L-Ácido Láctico) para uso como Biomaterial. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil, 2005.
14. Hench LL, Andersson O. An Introduction to Bioceramics. Singapore: World Scientific, 1993, 41–62.
15. Park, J; Lakes, R. S. Biomaterials – An Introduction. 3th ed. Springer, 2007.
16. Ciccone WJ, Motz C, Bentley C, Tasto JP. Bioabsorbable Implants in Orthopaedics: New Developments and Clinical Applications. *J Am Acad Orthop Surg.* 2001; 9: 280 - 88.
17. Karande TS, Agrawal CM. Functions and Requirements of Synthetic Scaffolds in Tissue Engineering. *Nanotechnology and Tissue Engineering – The Scaffold.* 2008; 53-86. CRC Press, 2008.
18. Bártolo P, Mendes A, Jardini AL. Bio-prototyping. *Design & Nature II.* M. W. Collins & C. A. Brebbia (Editors), WIT Press, 2004, 535-44.
19. Norma ABNT NBR 15448-1. Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis Parte 1: Terminologia, 2008.
20. Lucchesi C, Ferreira B, Duek E, Santos A, Joazeiro P. Increased response of Vero cells to PHBV matrices treated by plasma. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 2008; 19(2):635-43.
21. Cramer LP. Mechanism of cell rear retraction in migrating cells. *Current opinion in cell biology.* 2013; 25(5): 591–9.
22. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews.* 2007; 59: 207–33.
23. Gilding DK, Reed AM. Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/poly(lactic acid) homo and copolymers: 1. *Polymer.* 1979;20: 1459- 464.
24. Lasprilla AJR. Síntese do Poli (ácido Láctico) a Partir do Ácido Láctico para Aplicação em Dispositivos Biomédicos. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2011.
25. Nampoothiri KM, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology.* 2010; 101. 8493–501, 2010.
26. Cheng Y, Deng S, Chen P, Ruan R. Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Frontiers of Chemistry in China.* 2009; 4(3), 259-64.

27. Gupta B, Revagade N, Hilborn J. Poly(lactic acid) fiber: an overview. *Prog Polym Sci.* 2007; 34:455-82.
28. Auras RA, Lim LT, Selke SEM, Tsuji H. *Poly (Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing and Applications.* New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
29. Moon SI, Taniguchi I, Miyamoto M, Kimura Y, Lee CW. Synthesis and properties of high molecular weight poly(L-lactic acid) by melt/solid polycondensation under different reaction conditions. *High Performance Polymers.* 2001;13(2): 189-96.
30. Drumright RE, Gruber PR, Henton DE. Polylactic acid technology. *Adv. Mater.* 2000; 12: 1841–846.
31. Gogolewski S. Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury Int. J. Care Injured.* 2000; 31, Supply.4, SD 28-32.
32. Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J.Mater.Sci. Mater.Med.* 1992; 3: 432-46.
33. Proikakis CS, Tarantili PA, Andreopoulos AGJ. Synthesis and Characterization of Low Molecular Weight Polylactic Acid. *Journal of Elastomers and Plastic.* 2002; 34: 49-56.
34. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 2000;21: 2335–346.
35. Motta AC, Duek EAR. Estudo inicial da degradação in vitro de poli(L-co-D,L ácido láctico) sintetizado em laboratório. *Revista Matéria.* 2008;13(3): 429-38.
36. McDermott AM, Mason DE, Lin AS, Guldberg RE, Boerckel JD. Influence of structural load-bearing scaffolds on mechanical load- and BMP-2-mediated bone regeneration). *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;62:169-81.
37. Motta AC. Síntese, Caracterização de dispositivos de poli (L-co D, L ácido láctico). Estudo da degradação in vitro e in vivo. Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2007.
38. Moser RC, McManus A, Riley S, Thomas, K. Strength retention of 70:30 Poly(L-lactide-co- D, L lactide) Following Real-Time Aging. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials.* 2005; 75B:.56- 63.
39. Alexander JT, Branch CL Jr, Subach BR, Haid RW Jr. Applications of a resorbable interbody spacer via a posterior lumbar interbody fusion technique. *Orthopedics.* 2002;25 (Suppl 10):S1185–S1189.

40. Sintegra Surgical-Sciences. Pompéia São Paulo. Parafusos Bioabsorvíveis SINFIX PLDL. Acessado em 14 de julho de 2016. Disponível em:
http://www.sintegrasciencias.com.br/aceite_sintegra/sintegra/Portugues/produto/index.php?acao=detalhar&cod=1%20%E2%80%93%20Acessado%20em%20Julho%20de%202016
41. Yarin AL, Koombhongse S, Reneker DH. Bending instability in electrospinning of nanofibers. *J Appl Phys.* 2001; 89: 3018-026.
42. Grafe T, Graham K. Presented at the International Nonwovens Technical Conference, Atlanta, GA, Sept 24, 2002.
43. Li D, Xia Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?. *Adv. Mater.* 2004; 16(14):1151-170.
44. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Eng.* 2006; 12(5):101-10.
45. Lannutti J, Reneker D, Tomasko D and Farson D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C.* 2007; 27:504-09.
46. Reneker DH, Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer produced by electrospinning. *Nanotechnology.* 1996; 7: 216-23.
47. Cannas M, Massè A, Pigatto A. Evaluation of biocompatibility through cell culture assay: notes. *Encyclopedic handbook of biomaterials and applications*, New York: Marcel Dekker Inc. Editions, 1995, Part A, volume 1, 433-56.
48. ISO 10993-5 I (E) Biological evaluation of medical devices. Part 1: Evaluation and testing, 2009.
49. ISO 10993-5 I (E) Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 2009.
50. Vilela MJ, Martins ML, Mendes RL, Santos AA. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2003;39: 67-72.
51. Goldberg AM. The Use of Animal Cells for Evaluation of Toxicity, Carcinogenesis and Mutagenesis. IN: *Modern Approaches to Animal Cell Technology.* (Ed.) R.E. Spier and J.B. Griffiths, UK: Butterworth & Co. Ltd., pgs. 1987, 747-755.
52. Chiellini F. Perspectives on: in vitro evaluation of biomedical polymers. *J. Bioact. Compat. Pol.* 2006; 21(3): 257-71.

53. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity of metal ions which are released from dental alloys. *Dent Mater.* 1993; 9(3):172-76.
54. Tsang VL, Bhatia SN. Fabrication of three-dimensional tissues. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007;103:189–205.
55. Lopes M. S., 2014, Microreactor development for Synthesis of Bioabsorbable Polymer (PLLA) used as biomedical implants. Campinas, 2014. PhD Program in Chemical Engineering. State University of Campinas.
56. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances.* 2010, 28 (3): 325-47.
57. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.
58. Sarasua JR, Rodriguez-Lopez N, Zuza E, Petisco S, Castro B, del Olmo M, Palomares T, Alonso-Varona A. Crystallinity assessment and in vitro cytotoxicity of polylactide scaffolds for biomedical applications. *J Mater Sci: Mater Med.* 2011; 22: 2513–523.
59. Wu G, Wu W, Zheng Q, Li J, Zhou J, Hu Z. Experimental study of PLLA/INH slow release implant fabricated by three dimensional printing technique and drug release characteristics in vitro. *Biomed Eng Online.* 2014;19:13:97.
60. Sheng S-J, Hu X, Wang F, Ma Q-Y, Gu M-F. Mechanical and thermal property characterization of poly-L-lactide (PLLA) scaffold developed using pressure-controllable green foaming technology. *Materials Science and Engineering C.* 2015; 49: 612–22.
61. Kabiri M, Oraee-Yazdani S, Dodel M, Hanaee-Ahvaz H, Soudi S, Seyedjafari E, Salehi M, Soleimani M. Cytocompatibility of a conductive nanofibrous carbon nanotube/poly (L-Lactic acid) composite scaffold intended for nerve tissue engineering. *EXCLI J.* 2015; 14: 851–60.
62. Ramezanifard R, Seyedjafari E, Ardeshiryajimi A, Soleimani M. Biomimetic scaffolds containing nanofibers coated with willemite nanoparticles for improvement of stem cell osteogenesis. *Materials Science and Engineering C.* 2016;62: 398–06.
63. Han SB, Shin YJ, Hyon JY, Wee WR. Cytotoxicity of Voriconazole on Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2011; 55(10):4519-523.

64. Hanson AD, Wall ME, Pourdeyhimi B, Lobo EG. Effects of oxygen plasma treatment on adipose-derived human mesenchymal stem cell adherence to poly(L-lactic acid) scaffolds. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2007;18(11):1387-400.
65. Bernstein A, Tecklenburg K, Südkamp P, Mayr HO. Adhesion and proliferation of human osteoblast-like cells on different biodegradable implant materials used for graft fixation in ACL-reconstruction. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery.* 2012; 132(11):1637–645.
66. Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J. Can. Dent. Assoc.* 2002; 68(10): 617-21.
67. Vidal BC. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine Ponceau 2R. *Analytical Histochemistry.* 1970; 15(4): 289-96.
68. Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. *Biomaterials.* 1996;17:1259-264.
69. Wang Q, Liu P, Liu P, Gong T, Li S, Duan Y, Zhang Z. Preparation, blood coagulation and cell compatibility evaluation of chitosan-graft-poly lactide copolymers. *Biomed Mater.* 2014;9(1):015007.

ANEXO

A publication of The Italian Association of Chemical Engineering - AIDIC Servizi



CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS

Milan, 24th January, 2017

TO WHOM IT MAY CONCERN

As Co-Editor in Chief of CET-Chemical Engineering Transaction and on behalf of AIDIC Servizi Srl, holder of the relative copyright, I herewith authorize

Ana Carolina Bueno Benatti

as author of the article published into Chemical Engineering Transaction, Vol. 49, 2016, entitled

Comparative analysis of biocompatibility between Poly (L-lactic acid) (PLLA) and PLDL Purac nanofibers for use in Tissue Engineering

DOI: 10.3303/CET1649034

to reuse it in her Master Thesis, for non-commercial purposes and provided that AIDIC/CET is acknowledged as source.

Best regards,

Sauro Pierucci

CET Co-Editor in Chief

CET - Chemical Engineering Transactions
c/o
AIDIC
The Italian Association of Chemical Engineering
Via Giuseppe Colombo 81 A,
I-20133 Milano, Italy
e-mail. <cet@aidic.it>
<http://www.aidic.it/cet>