



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**BÁRBARA ETRURI CIOCCA**

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE MEMBRANAS  
FIBROSAS DE POLI (L-ÁCIDO LÁCTICO) (PLLA) FABRICADAS POR  
ROTOFIAÇÃO PARA ENGENHARIA DE TECIDOS.

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF POLY  
(L-LACTIC ACID) (PLLA) FIBROUS MEMBRANES MANUFACTURED BY  
ROTARY JET SPINNING FOR TISSUE ENGINEERING.

CAMPINAS

2017

# **BÁRBARA ETRURI CIOCCA**

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE MEMBRANAS  
FIBROSAS DE POLI (L-ÁCIDO LÁCTICO) (PLLA) FABRICADAS POR  
ROTOFIAÇÃO PARA ENGENHARIA DE TECIDOS.

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF POLY  
(L-LACTIC ACID) (PLLA) FIBROUS MEMBRANES MANUFACTURED BY  
ROTARY JET SPINNING FOR TISSUE ENGINEERING.

*Dissertação apresentada à  
Faculdade de engenharia  
Química da Universidade  
Estadual de Campinas como parte  
dos requisitos exigidos para a  
obtenção do título de Mestra em  
Engenharia Química*

*Orientador:* Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO/TESE  
DEFENDIDA PELA ALUNA BÁRBARA  
ETRURI CIOCCA, E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. RUBENS MACIEL FILHO

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 33003017034P8

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

C493p Ciocca, Bárbara Etruri, 1993-  
Produção, caracterização e avaliação in vitro de membranas fibrosas de poli (l-ácido láctico) (plla) fabricadas por rotofiação para engenharia de tecidos / Bárbara Etruri Ciocca. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Rubens Maciel Filho.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Engenharia tecidual. 2. Biomateriais. 3. Cultura in vitro. 4. PLLA. I. Maciel Filho, Rubens, 1958-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Titulo em outro idioma:** Production, characterization and in vitro evaluation of poly (l-lactic acid) (plla) fibrous membranes manufactured by rotary jet spinning for tissue engineering

**Palavras-chave em inglês:**

Tissue engineering

Biomaterials

In vitro culture

PLLA

**Área de concentração:** Engenharia Química

**Titulação:** Mestra em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Rubens Maciel Filho [Orientador]

Milena Savioli Lopes

Guinea Brasil Camargo Cardoso

**Data de defesa:** 04-07-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Dissertação de Mestrado defendida por Bárbara Etruri Ciocca e aprovada em 04 de julho de 2017 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

---

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

---

Prof. Dra. Milena Savioli Lopes

---

Dra. Guinea Brasil Camargo Cardoso

A ata de defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmico da aluna.

## AGRADECIMENTOS

Um grande desafio agradecer, em duas páginas, todos que de alguma forma estiveram envolvidos nestes dois anos de mestrado. Palavras jamais irão expressar minha real gratidão.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela minha vida e pela paz nos momentos que encontrei dificuldades, hoje vejo que tudo acontece por algo melhor. Obrigada por iluminar e abençoar meus passos sempre.

A meus pais, que sempre primaram pela minha educação. Obrigada pai e mãe, por serem calma, luz, amor, sabedoria, incentivo, porto seguro, tudo e mais um pouco na minha vida! Eterna gratidão.

Agradeço ao meu namorado por sempre se mostrar uma pessoa maravilhosa e estar presente quando eu mais precisei. Mesmo quando não era possível se desdobrava por mim. Obrigada.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Maciel Filho pelos ensinamentos e pela paciência ao longo do meu estágio até o atual momento. Prometo tentar diminuir minha ansiedade.

Agradeço ao Dr. André Jardini pela co-orientação e toda sua ajuda durante nossas pesquisas, e pelo incentivo para meu ingresso no programa de pós-graduação da FEQ.

Agradeço aos meus amigos da FEQ; Emília pela amizade e nosso grau de parentesco distante, sem você dividindo mesa comigo aquele laboratório não seria o mesmo, obrigada pelas dicas, ajudas, risadas, fofocas e por estar presente num momento em que me encontrei sem chão. Ao Lucas pelas dúvidas que tem tirado até hoje de praticamente tudo que envolve EQ, pelos yakissobas divididos na feirinha, e pelo bar que nunca marcamos. Ao Dani pela paciência em explicar coisas simples várias vezes, por descontrair o ambiente do lab nas horas tensas e por dar risada e entender minhas piadas. Ao grupo das migas, à Bru pela primeira amizade que fiz na FEQ e pelos perrengues que passamos juntas durante dois anos, essa amizade não irá acabar apesar da distância, e à Nahi pela calma e por ser presente e disposta a ajudar em tempo integral, cinética e

reatores não seria possível sem você. Ao Gui pela amizade e confiança, pelas piadas boas e ruins, pelas conversas longas na FEA e por corrigir todos meus textos, prometo que agora vamos comer doce. Ao Rafa Scatena pelas aulas de Termo no início e por me ajudar a enxergar que nada é tão horrível quanto parece.

Agradeço imensamente à Dra. Ana Amélia da FCM e à Dra. Guinea da FEM, vocês ajudaram a tirar este trabalho do papel.

Gostaria de agradecer ao professor Raphael Suppino da FEQ pela paciência em me ensinar Cinética e Reatores Químicos, e pelas conversas esclarecedoras que tivemos. Ao professor Lisboa da FEQ por entender minhas dificuldades. Ao professor Éder da FEM pela sua disposição em ensinar e tirar todas minhas dúvidas. À professora Ana Rita da FEQ, apesar de difícil sua matéria foi uma das que mais aprendi e coloquei em prática tudo que vi.

Aos técnicos e demais profissionais da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos que me foi concedida, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sendo possível a realização deste Mestrado.

## RESUMO

O poli (L-ácido láctico) (PLLA) é um polímero utilizado nas mais diversas aplicações, e já consagrado na área médica como um biomaterial, devido às suas propriedades como biocompatibilidade. Desta forma, o presente trabalho teve como principais objetivos a produção e caracterização de microfibras de PLLA através do processo de rotofiação, com a finalidade de produzir uma membrana fibrosa para ser aplicada na engenharia de tecidos. A rotofiação é um processo que consiste em formar fibras de uma solução polimérica através da alta velocidade de rotação gerada pelo motor do equipamento. A solução foi preparada através da dissolução do polímero em clorofórmio resultando em uma solução de 0,2 g/mL. As fibras obtidas foram analisadas e caracterizadas físico-quimicamente pelos métodos de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), e espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Testes *in vitro* com culturas celulares são essenciais para avaliar a capacidade do PLLA a ser utilizado na engenharia de tecidos. Foram então realizados ensaios de Live/Dead®, MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) e AlamarBlue® com dois tipos de linhagens celulares, sendo elas fibroblastos e osteoblastos. Em seguida foram realizadas análises estatísticas dos ensaios MTT e AlamarBlue® para verificar o comportamento das células comparadas aos seus controles. Foram realizados os testes de ANOVA e teste Tukey para verificação entre as diferenças das amostras. Os resultados obtidos nos ensaios de caracterização físico-química mostraram que as fibras produzidas tem características que satisfazem os requisitos para uso como *scaffold*, e os resultados obtidos nos testes de cultura de células e análises estatísticas demonstraram que o comportamento das duas linhagens quando em contato com as membranas fibrosas de PLLA foram satisfatórios. Assim pode-se concluir que a estrutura composta por fibras de PLLA produzidas por rotofiação são adequadas para uso na engenharia de tecidos como *scaffolds*.

**Palavras-chave:** Engenharia tecidual, biomateriais, cultura *in vitro*, PLLA.

## ABSTRACT

Poly (L-lactic acid) (PLLA) is a polymer used in a wide range of applications, and is already recognized in the medical field as a biomaterial, due to its properties as biocompatibility. In this way, the main objectives of the present work were the production and characterization of PLLA microfibers through the rotary jet spinning process, in order to produce a fibrous membrane to be applied in tissue engineering. Rotary jet spinning is a process that create fibers from a polymer solution through the high speed of rotation generated by the motor equipment. The solution was prepared by dissolving the polymer in chloroform resulting in a solution of 0.2 g/mL. The obtained fibers were analyzed and physicochemically characterized by scanning electron microscopy (SEM), dispersive energy spectroscopy (EDS), thermogravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), and infrared spectroscopy Of Fourier (FT-IR). *In vitro* tests with cell cultures are essential for assessing the ability of PLLA to be used in tissue engineering. Live/Dead®, MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazoline bromide) and AlamarBlue® assays were performed with two types of cell lines, fibroblasts and osteoblasts. Statistical analyzes of the MTT and AlamarBlue® assays were performed to verify the behavior of the cells compared to their controls. ANOVA and Tukey's test were used to verify the differences between samples. The results obtained in the physical-chemical characterization tests showed that the fibers produced have characteristics that satisfy the requirements for use as *scaffold*, and the results obtained in the tests of cell culture and statistical analysis demonstrated that the behavior of the two cell cultures when in contact with the fibrous membranes of PLLA were satisfactory. Thus it can be concluded that the composite structure of PLLA fibers produced by rototyping are suitable for use in engineering fabrics such as *scaffolds*.

**Key-words:** Tissue engineering, biomaterials, *in vitro* culture, PLLA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

<b>Figura 1</b>	Esquema simplificado de engenharia regenerativa e de tecidos.	18
<b>Figura 2</b>	Aplicações de <i>scaffolds</i> fibrosos de PLLA na área médica. Adaptado de Santoro et al. (2016).	21
<b>Figura 3</b>	Estrutura química do poli (L-ácido láctico) (PLLA).	25
<b>Figura 4</b>	Representação Esquemática do equipamento de rotofiação.	27
<b>Figura 5</b>	Fluxograma com as etapas do procedimento experimental.	33
<b>Figura 6</b>	Equipamento de rotofiação utilizado no trabalho, disponível na Faculdade de Engenharia Mecânica – UNICAMP.	34
<b>Figura 7</b>	Aspecto macroscópico da membrana fibrosa obtida pelo processo de rotofiação.	37
<b>Figura 8</b>	Micrografias eletrônicas de varredura obtidas nos aumentos 100x (A), 500x (B), 2500x (C) e 5000x (D).	38
<b>Figura 9</b>	Distribuição dos diâmetros das fibras das membranas fibrosas de PLLA rotofiadas.	39
<b>Figura 10</b>	Espectro obtido na análise EDS.	41
<b>Figura 11</b>	Espectro obtido através da análise de FT-IR.	42
<b>Figura 12</b>	Curva termogravimétrica obtida para o PLLA rotofiado.	45
<b>Figura 13</b>	Espectro de DSC obtida para o PLLA rotofiado (segundo aquecimento).	46
<b>Figura 14</b>	Fluxograma esquemático das etapas dos ensaios <i>in vitro</i> .	49
<b>Figura 15</b>	Curva de proliferação celular pelo método do MTT das células VERO nos tempos de 24, 48 e 72 h.	55
<b>Figura 16</b>	Porcentagem de viabilidade das células VERO detectada pela intensidade de fluorescência do AlamarBlue nos tempos de 24, 48 e 72 h.	56
<b>Figura 17</b>	Imagens de microscopia óptica do fundo da placa das células VERO cultivadas por 24, 48 e 72 h. Aumento de 10x.	57
<b>Figura 18</b>	Imagens de microscopia óptica das membranas fibrosas cultivadas com células VERO cultivadas por 24, 48 e 72 h. Aumentos de 10 x e 20x.	57
<b>Figura 19</b>	Curva de proliferação celular pelo método do MTT das células M3CT3-R1 nos tempos de 24, 48 e 72 h.	58
<b>Figura 20</b>	Porcentagem de viabilidade das células M3CT3-R1 detectada pela intensidade de fluorescência do AlamarBlue nos tempos de 24, 48 e 72 h.	59
<b>Figura 21</b>	Imagens de microscopia óptica do fundo da placa das células M3CT3-E1 cultivadas por 24, 48 e 72 h. Aumento de 10x.	60
<b>Figura 22</b>	Imagens de microscopia óptica das membranas fibrosas cultivadas com células M3CT3-E1 cultivadas por 24, 48 e 72 h. Aumentos de 10 x e 20x.	61

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b>	Porcentagem dos elementos encontrados na análise EDS.	41
<b>Tabela 2</b>	Grupamentos encontrados na análise de FT-IR da membrana fibrosa de PLLA.	43
<b>Tabela 3</b>	Temperaturas de transição encontradas no primeiro e segundo aquecimentos da membrana fibrosa de PLLA rotofiada	46
<b>Tabela 4</b>	Teste de normalidade Shapiro-Wilk com os valores de p(calculado) para cada ensaio biológico realizado.	64
<b>Tabela 5</b>	Valores de p(calculado) obtidos na ANOVA.	65
<b>Tabela 6</b>	Valores obtidos no teste Tukey.	66
<b>Tabela 7</b>	Resultados das diferenças entre amostras do teste Tukey.	67

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

<b>%</b>	Porcentagem
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>Au</b>	Ouro
<b>C</b>	Carbono
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio
<b>cm</b>	Centrímetro
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centrímetro quadrado
<b>CNT</b>	Controle Negativo de Toxicidade
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>CPT</b>	Controle Positivo de Toxicidade
<b>DMSO</b>	Sulfóxido de dimetilo
<b>DSC</b>	Calorimetria Diferencial de Varredura
<b>EDS</b>	Espectroscopia de Energia Dispersiva
<b>FCM</b>	Faculdade de Ciência Médicas
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FEM</b>	Faculdade de Engenharia Mecânica
<b>FEQ</b>	Faculdade de Engenharia Química
<b>FT-IR</b>	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
<b>g</b>	Grama
<b>h</b>	Hora
<b>HP</b>	<i>Horse-Power</i>
<b>INCT-Biofabris</b>	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biofabricação
<b>kV</b>	Quilovolts
<b>Labimo</b>	Laboratório de Biomateriais em Ortopedia
<b>Labiomec</b>	Laboratório de Biomateriais e Biomecânica
<b>MEV</b>	Microscópio Eletrônico de Varredura
<b>mg</b>	Miligramas
<b>min</b>	Minuto
<b>μL</b>	Microlitros
<b>mL</b>	Mililitros

---

---

<b>mm</b>	Milímetro
<b>µm</b>	Micrômetros
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>O</b>	Oxigênio
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>pA</b>	Pico ampère
<b>PLLA</b>	Poli (L-ácido lático)
<b>PS</b>	Penicilina e estreptomicina
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>Sn</b>	Estanho
<b>Tc</b>	Temperatura de cristalização
<b>Tcc</b>	Temperatura de cristalização à frio
<b>Tg</b>	Temperatura de transição vítrea
<b>TGA</b>	Análise Termogravimétrica
<b>Ti</b>	Temperatura inicial de degradação
<b>Tm</b>	Temperatura de fusão
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas

---

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	15
I. Organização do documento.....	15
II. Objetivos.....	15
1.1. Introdução.....	16
1.2. Principais contribuições deste trabalho.....	21
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	23
2.1. Literature Review .....	23
2.1.1. Tissue Engineering .....	23
2.1.2. Poly (L-lactic acid) – PLLA .....	25
2.1.3. Rotary jet spinning.....	26
2.1.4. Cell culture.....	28
2.1.4.1. Connective Tissue .....	29
2.1.4.2. Bone Tissue .....	30
2.2. Conclusions .....	31
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA.....	33
3.1. Preparo da solução polimérica .....	33
3.2. Rotofiação .....	34
3.3. Esterilização do material .....	35
3.4. Caracterização das Membranas Fibrosas .....	36
3.4.1. Caracterização físico-química.....	36
3.4.2. Avaliação da morfologia.....	36
3.4.2.1. Análise dos resultados obtidos .....	36
3.4.3. Avaliação dos compostos químicos.....	39
3.4.3.1. Análise dos resultados obtidos .....	40
3.4.4. Avaliação térmica .....	43
3.4.4.1. Análise dos resultados obtidos .....	44
3.5. Conclusões .....	47
CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO EM CULTURA CELULAR .....	49
4.1. Avaliação biológica.....	49
4.2. Metodologia dos ensaios <i>in vitro</i> .....	51
4.2.1. Inoculação das células para os ensaios <i>in vitro</i> .....	51
4.2.2. Avaliação da citotoxicidade direta.....	51

4.2.2.1. Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i> MTT .....	52
4.2.2.2. Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i> AlamarBlue® .....	52
4.2.2.3. Ensaio de viabilidade celular <i>in vitro</i> Live/Dead® .....	53
4.3. Resultados dos ensaios <i>in vitro</i> .....	54
4.3.1. Resultados dos ensaios com as células VERO .....	54
4.3.1.1. Resultados MTT .....	54
4.3.1.2. Resultados AlamarBlue® .....	55
4.3.1.3. Resultados Live/Dead® .....	56
4.3.2. Resultados dos ensaios com as células M3CT3-R1 .....	58
4.3.2.1. Resultados MTT .....	58
4.3.2.2. Resultados AlamarBlue® .....	59
4.3.2.3. Resultados Live/Dead® .....	60
4.4. Conclusões .....	62
CAPÍTULO 5 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	63
5.1. Análises Estatísticas .....	63
5.2. Conclusões .....	68
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS .....	69
6.1. Conclusões .....	69
6.2. Trabalhos Futuros .....	70
Referências Bibliográficas .....	71
APÊNDICES .....	76

## **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO**

O capítulo 1 consiste na apresentação da organização do documento, dos objetivos geral e específicos, na introdução do trabalho e principais contribuições desta pesquisa.

### **I. Organização do documento**

Para uma melhor compreensão e leitura, a dissertação está dividida em sete capítulos, onde cada capítulo se inicia com uma breve descrição do que será apresentado ao longo do mesmo, contendo suas subdivisões e, em alguns casos, a discussão e os resultados. Ao final do documento, se encontram as referências utilizadas para a realização deste trabalho e os apêndices.

De maneira sucinta buscou-se descrever o que está presente em cada capítulo: No Capítulo 1 são apresentadas a introdução e as principais contribuições deste trabalho; no Capítulo 2 a revisão da literatura; no Capítulo 3 a metodologia utilizada no trabalho; no Capítulo 4 a caracterização do material; no Capítulo 5 a avaliação do material em cultura celular; no Capítulo 6 as análises estatísticas; e finalmente, no Capítulo 7 as conclusões deste trabalho e trabalhos futuros.

### **II. Objetivos**

#### **Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi produzir e caracterizar membranas fibrosas de PLLA obtidas pelo processo de rotofiação, visando conhecer sua melhor aplicação como *scaffold*, conforme suas propriedades e biocompatibilidade com a cultura celular.

## Objetivos Específicos

1. Avaliar a porosidade e a morfologia de superfície da membrana fibrosa através da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), como um fator determinante para adesão celular;
2. Determinar quais os elementos químicos presentes na membrana fibrosa por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para avaliar a exclusão total do solvente;
3. Determinar os grupos funcionais presentes na membrana fibrosa pela análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), para verificar se houve mudança na estrutura química da membrana fibrosa após o processamento;
4. Verificar as propriedades térmicas, como temperatura de degradação pela análise termogravimétrica (TGA), e determinar temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), fusão cristalina ( $T_m$ ) e cristalização ( $T_c$ ) pela análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC). Com estas informações, será possível determinar termicamente se sua aplicação é possível como biomaterial para ser implantado no corpo humano;
5. Verificar a viabilidade celular e a citotoxicidade (morte celular), por meio a respostas biológicas via testes *in vitro* em cultura celular (como teste MTT(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) para avaliar proliferação celular, teste Live/Dead® para avaliar a viabilidade celular, e teste AlamarBlue® para avaliar proliferação celular);
6. Verificar os dados obtidos nos ensaios *in vitro* com análises estatísticas através do ensaio de normalidade (teste Shapiro-Wilk), elaboração da tabela ANOVA e teste Tukey.

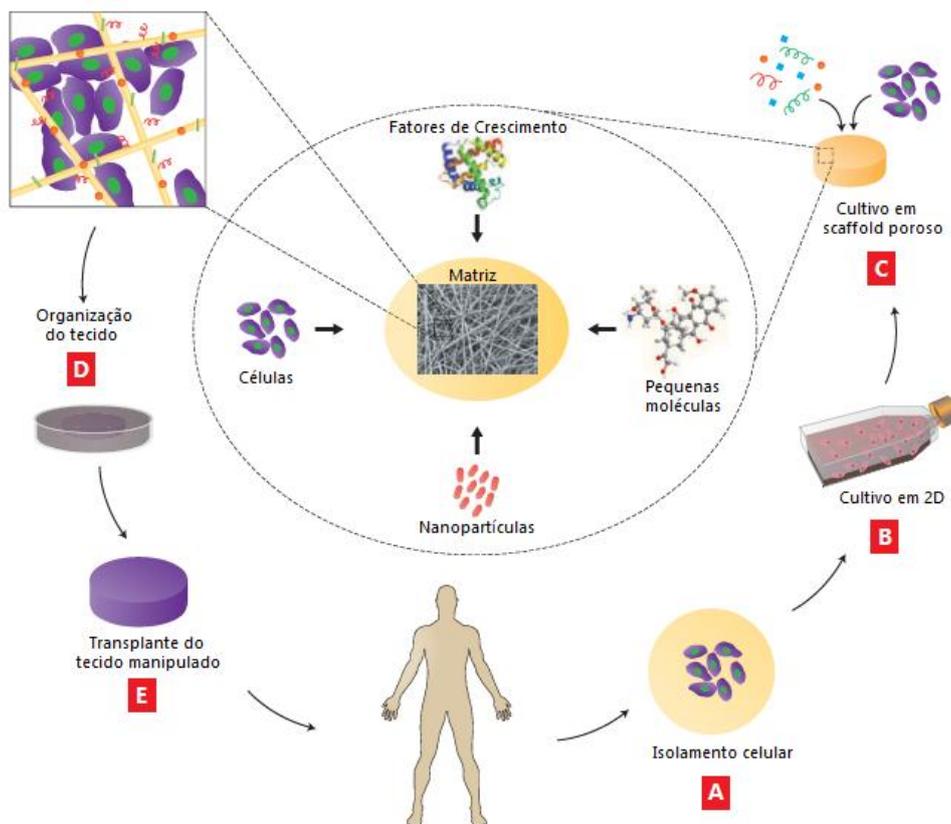
### 1.1. Introdução

A Engenharia tecidual é um campo relativamente novo e muito promissor que visa a construção e desenvolvimento de novas ferramentas para aplicação na medicina e áreas da saúde, através da regeneração de tecidos, culminando em uma melhor

qualidade de vida para a população. Esta área de pesquisa é estimulada por diversos fatores como o aumento da expectativa de vida da população, alto índice de acidentes de trânsito, acidentes de trabalho e violência urbana, que requerem tratamentos nos quais a engenharia tecidual pode ser útil e mesmo decisiva.

Visando sanar os problemas citados, nos últimos anos houve um estudo intenso no campo da engenharia tecidual, o que gerou um avanço considerável na produção e no desenvolvimento de novos materiais, e no aprimoramento dos materiais já existentes para aplicação na área da saúde; estes materiais são conhecidos como biomateriais. Os biomateriais destinam-se a suprir as demandas da sociedade, objetivando alta qualidade, baixo custo e rápida produção, atendendo as necessidades específicas que requerem procedimentos que façam uso destes materiais (PINTO *et al.*, 2009).

O transplante de órgãos é um grande problema atualmente devido as suas limitações como a falta de doadores, a necessidade de alta compatibilidade entre doador e receptor, que acarreta significantes índices de rejeição e por ser um processo de custo elevado. Devido a esses problemas, diversas pessoas morrem antes de receberem o transplante. Desta forma, a engenharia regenerativa, que engloba a engenharia de tecidos, visa criar matrizes tridimensionais (*scaffolds*) em que as células consigam se aderir, crescer e proliferar. Com este procedimento, deseja-se criar estruturas, temporárias ou não, e cultivá-las com células do próprio paciente e utilizá-las como implante, diminuindo assim os índices de rejeição e as filas em hospitais para pacientes que necessitam de transplante de órgãos (DVIR *et al.*, 2010). A Figura 1 apresenta um esquema simplificado do princípio básico da engenharia regenerativa de tecidos.



**Figura 1** – Esquema simplificado de engenharia regenerativa e de tecidos. As células são isoladas do paciente (A) e são então cultivadas em superfícies bidimensionais para melhor expansão das células (B), em seguida as células são colocadas em contato com o *scaffold* para colonização do mesmo, juntamente com fatores de crescimento, pequenas moléculas e micro/nanopartículas (C), este *scaffold* então é mantido em biorreatores para organização do tecido em condições ótimas (D), e por fim, quando o tecido estiver funcional, o *scaffold* é transplantado para o local danificado a fim de restaurar sua função (E). Adaptado de DVIR *et al.*, 2010.

As duas maiores potências do mercado mundial de biomateriais são Estados Unidos e alguns países da Europa. No entanto, países emergentes como China, Índia, Japão, Brasil, Rússia e Romênia, tem ganhado destaque neste cenário devido às altas taxas de crescimento de pesquisas e desenvolvimento de biomateriais apresentados. Em 2008, o cenário mundial do mercado de biomateriais movimentou aproximadamente 25,6 bilhões de dólares, sendo a participação do Brasil de 2% (ALCIMED, 2011). Já em 2012 o mercado mundial de biomateriais atingiu a marca de 44 bilhões de dólares (PIRES *et al.*, 2015). No período de 2015 a 2020, espera-se um crescimento desse

mercado de 16% ao ano, podendo atingir 130,57 bilhões de dólares (MARKETSANDMARKETS, 2015).

No campo dos biomateriais, um foco especial é dado aos biomateriais poliméricos devido às suas características de produção, biodegradação, vasta gama de opções e aplicações no mercado, e em alguns casos, a capacidade de guiar a proliferação celular. Dentre os biomateriais poliméricos, o poli (L-ácido láctico) (PLLA) se destaca por ser biodegradável e biocompatível, apresenta aspectos favoráveis de processabilidade e flexibilidade de formulação, se tornando um material consagrado na área médica. Além disso, possui excelentes propriedades estruturais e baixo custo quando comparado aos materiais convencionais existentes no ramo de implantes atualmente (PONGTANAYUT *et al.*, 2013). Suas aplicações nas áreas médicas e farmacêuticas são diversas como em sistemas de liberação controlada de fármacos, produtos cicatrizantes, implantes cirúrgicos, implantes ortopédicos, *scaffolds* biorreabsorvíveis, engenharia regenerativa, engenharia de tecidos, entre outros (NARAYANAN *et al.*, 2016; MURARIU & DUBOIS, 2016; DAVACHI & KAFFASHI, 2015; YADAV *et al.*, 2015; PAWARA *et al.*, 2014). Sua aplicação na área da saúde é frequente pois, é um material que já tem aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*).

O PLLA é um polímero alifático constituído basicamente pela união de inúmeras cadeias de ácido láctico. O ácido láctico pode ser obtido através de matérias primas renováveis, podendo ser extraído de açúcares ou amidos, o que descarta sua dependência de produção através do petróleo e eventuais presenças de moléculas tóxicas à saúde humana e animal (LIM *et al.*, 2008). Por ser um poliéster biodegradável, utilizado nas mais diversas áreas e, principalmente na área médica, onde é utilizado em diversas aplicações, na área têxtil para produção de fibras e tecidos, e nas produções de artigos técnicos e de embalagens (MURARIU & DUBOIS, 2016).

Uma vez que a afinidade e adesão celular em poros e fibras de escala micro/nanométrica é elevada, estudam-se cada vez mais métodos para obtenção de micro/nanofibras para facilitar o desenvolvimento das tecnologias existentes ou criar novas tecnologias através da engenharia de tecidos. Um método de produção de micro/nanofibras amplamente conhecido é a eletrofiação, porém sabe-se que existem dificuldades empregadas nesta técnica, como a necessidade do uso de solução polimérica condutora e o tempo mais longo para formação de fibras. Buscando outras alternativas para a produção de micro/nanofibras que sanassem as dificuldades

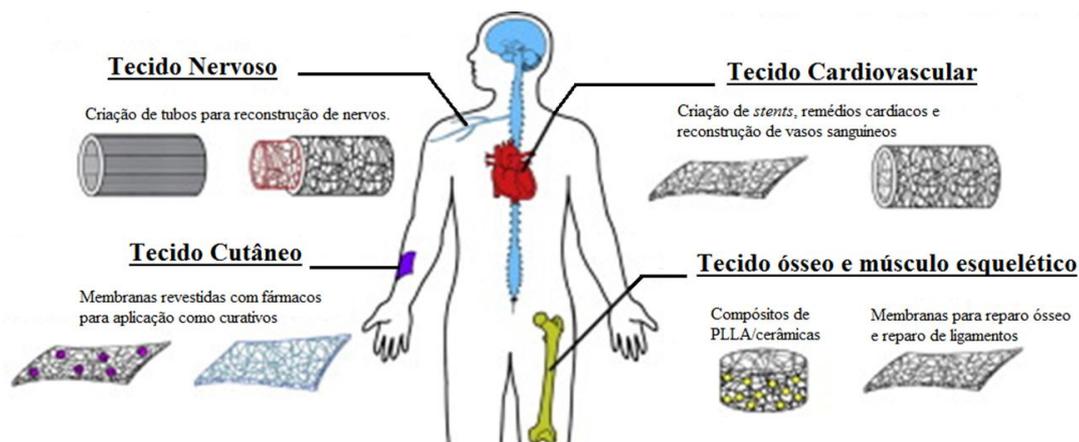
encontradas na eletrofiação, desenvolveu-se então a rotofiação, uma técnica mais simples e rápida (BADROSSAMAY *et al.*, 2010).

A rotofiação é um método de obtenção de fibras de escala que variam de micro a nanométricas, através da alta velocidade de rotação gerada pelo motor do equipamento. O equipamento consiste em um reservatório central onde a solução polimérica é despejada, com capilares nas paredes por onde saem as fibras poliméricas, uma base acoplado ao motor, o qual gera a rotação do equipamento, e um coletor onde as fibras ficam depositadas ao final.

A topografia de superfície de um biomaterial tem um importante papel na regulação das atividades celulares. Através de um processo conhecido como orientação de contato a superfície do material influencia em diversas etapas da cultura celular, desde a adesão e morfologia da célula até a proliferação e diferenciação celular (CURTIS & WILKINSON, 1997; ZHOU *et al.*, 2015).

As aplicações de fibras poliméricas em escala micro/manométricas vêm se expandindo rapidamente. Desta forma os benefícios que tem sido gerados nas áreas de nanociências, biociência e outros campos da tecnologia e da engenharia de tecidos, são considerados inestimáveis (REN *et al.*, 2015).

De acordo com SANTORO *et al.*, 2016, membranas fibrosas, com fibras em escala micro/nanométrica, de PLLA tem sido utilizadas em diversos estudos envolvendo a área de saúde (Figura 2). Entre algumas de suas aplicações encontram-se *scaffolds* fibrosos para aplicação na engenharia de tecidos ósseos como reparo ósseo (ZHAO *et al.*, 2012), *scaffolds* fibrosos para aplicação na engenharia de tecido musculoesqueléticos como reparo de ligamentos (SURRAO *et al.*, 2012), *scaffolds* fibrosos para aplicação na engenharia de tecido nervoso como sistema de entrega controlada de fármacos neurológicos (BINAN *et al.*, 2014), *scaffolds* fibrosos para aplicação na engenharia de tecido cardiovascular e *scaffolds* fibrosos para aplicação na engenharia de tecidos cutâneos como curativos (KONTOGIANNOPOULOS *et al.*, 2011).



**Figura 2** – Aplicações de *scaffolds* fibrosos de PLLA na área médica. Adaptado de Santoro *et al.* (2016).

Visando estudar o desempenho de um possível biomaterial, se fazem necessários ensaios biológicos, que investiguem os efeitos que o material causa em contato com células (*in vitro*) ou o organismo vivo (*in vivo*). A cultura de células requer condições estéreis e um meio de cultura contendo água, sais, nutrientes essenciais e soro sanguíneo para a sustentação celular e para seu crescimento fora do corpo. Os testes iniciais são realizados com culturas de células, onde estes buscam desenvolver sistemas que se assemelham ao máximo com o organismo, sendo necessário o controle de temperatura, pH, uso de antibióticos, fluxo de ar, e em alguns casos, o uso fatores de crescimento, estímulos físicos e mecânicos.

Desta forma, o presente trabalho tem a proposta de desenvolver um novo biomaterial rotofiado e biocompatível a partir de um PLLA desenvolvido na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, e estudar o comportamento da cultura de células em contato com o material através de ensaios *in vitro*.

## 1.2. Principais contribuições deste trabalho

O trabalho realizado teve como principal objetivo desenvolver um biomaterial que promovesse melhorias na qualidade de vida dos pacientes quando comparado aos materiais convencionais disponíveis atualmente no mercado, visando a diminuição do custo para pacientes e para o setor público, menor desgaste do paciente por não ser

necessária uma cirurgia de remoção do biomaterial uma vez que o mesmo é biorreabsorvível. Para tanto produziu-se uma membrana fibrosa formada por microfibras rotofiadas de PLLA, que apresentou características térmicas e físico-químicas apropriadas para uso como biomaterial, e uma alta afinidade com o tecido ósseo. Esta afinidade é uma diretriz para trabalhos futuros, que busca o desenvolvimento de um material que auxilie ou substitua tecido ósseo humano.

## CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Capítulo 2 consiste na apresentação da fundamentação teórica do trabalho, que será apresentada em inglês. O objetivo deste capítulo ser em inglês deve-se ao fato que ele será submetido para publicação, após a defesa da dissertação e possíveis complementos, em um periódico especializado.

### 2.1. Literature Review

#### 2.1.1. Tissue Engineering

Tissue engineering is a relatively new field that offers original ways to reconstruct organs and tissues that have suffered some kind of trauma or damage (GHANAVATI *et al.*, 2015).

It is a multidisciplinary area that biology, medicine and science are interconnected throughout the process (manufacturing, characterization and application of the materials under development). Such areas focus on the goal of developing artificial substrates that mimic the environment which cells reside (DIAO *et al.*, 2016). For biomedical applications, the selected materials must be biocompatible, and their properties will depend directly on the region in which they will be applied (MAHONEYAC *et al.*, 2016). If the material contains the characteristics of interest and can be applied in the human body without contraindications, it is called biomaterial. The development of new biomaterials is crucial to tissue engineering (JOSHI *et al.*, 2015).

The definition of biomaterial was described and approved by the Consensus Conference on Biomaterials for Clinical Applications in 1982 as "Any substance or combination of substances of synthetic or natural origin which for an undetermined period of time is used as a medical device, or biomedical, aiming the interaction with the biological system" (WILLIAMS, 1987).

There is a wide range of materials being used as biomaterials, such as metals, ceramics, composites and polymers. Among the cited materials, the most versatile and most used in fabric engineering are polymers.

According to Canevarolo (2006), polymers are macromolecules composed of many repeating units (so-called), linked through covalent bonds, thus having a high molecular weight and a wide variety of physical and chemical properties. The raw material for the production of a polymer is monomer, i.e. a molecule with a repeating unit. One of the various forms of classification of polymers is by its nature, which may be synthetic or natural.

Natural polymers, such as collagen and fibrinogen, are made from biological materials, which improves the biomaterial performance in the biological system due to good with the cells. However, some synthetic polymers are mostly used for these applications because of their easy handling, as well as due to the manufacture conditions suitable properties such as porosity, degradation time and mechanical characteristics may be obtained. The criterion of selection of a biomaterial is based on the area that it will be applied, being possible to choose and manipulate which type of biomaterial resembles the desired region (BAKER *et al.*, 2016). A point to be considered for the polymeric biomaterials development is the origin of the raw material since the monomer should not contains toxic compound, even in small amounts.

One of the main forms used for the application of a biomaterial is in the form of *scaffolds*. *Scaffolds* are three-dimensional arrays that have the function of temporary mechanical support and shape determiner for cellular development. Due to its pores, a high mass transfer and removal of residues is possible. To promote such development and cell adhesion, the pores must be interconnected and mainly resemble to the area that will be implanted for better and faster tissue regeneration (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011).

To be considered suitable, *scaffolds* must be biocompatible, that is, it has to promote compatibility with living tissues or organs, it must have a three-dimensional shape and have interconnected pores so that the vascularization of the tissue is favored. In addition, its surface must promote cell migration, proliferation, and differentiation, and

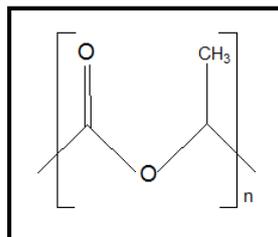
finally, must possess adequate mechanical properties to fulfill the desired function (MAYER, 2000).

Depending on the application of the biomaterial, it may be bioabsorbable or not. Non-absorbable biomaterials, such as metal implants, are common in the area of orthopedic application, as they fulfill the requirements as greater mechanical stress and permanent properties. Absorbable biomaterials are more advantageous, because they do not require a second surgery to remove the implant, since they will have a good interaction with the organism, so that the cells will adhere, grow and proliferate, causing a gradual degradation of the implant, and rebuilding the damaged tissue (JOSHI *et al.*, 2016). Many polymers may be used in such cases with especial emphasis to poly (L-lactic acid).

### 2.1.2. Poly (L-lactic acid) – PLLA

Several polymers have been used for application as biomaterial, among them a widely used and already established polymer in literature, is poly (L-lactic acid) (PLLA).

Poly (L-lactic acid) (PLLA) is a semi-crystalline polymer with, a melting point between 174 °C and 184 °C, and a glass transition temperature around 65 °C, which may be related to its high molar mass and its crystallinity. It has mechanical properties compatible with applications in the medical field, with modulus of elasticity and tensile strength in the range of 3.2 - 3.7 GPa and 55-60 MPa respectively. The methyl group of PLLA makes it hydrophobic and more resistant to hydrolysis (ZUIDEVELD *et al.*, 2006). The chemical structure of PLLA is shown in Figure 3.



**Figure 3** – Chemical structure of poly (L-lactic acid) (PLLA).

There are two most common ways that PLLA can be synthesized, to know, by ring opening or polycondensation. The use of PLLA in micro or nanoscales has been widely used for medicine due to the cell attachment to the biopolymer, which gives a better interaction of PLLA with the organism (SANTORO *et al.*, 2016).

PLLA is a thermoplastic polymer, at a certain temperature the material shows a viscous behavior, being possible the forming and molding thereof. Thermoplastic polymers are an alternating mixture of rigid and malleable segments, thermodynamically incompatible and segregating in micro domains. Some of them have excellent biocompatibility and are widely used for biomedical applications (ZHANG *et al.*, 2005).

Due to the fact that PLLA it is a thermoplastic polyester made with lactic acid (mixed-function organic compound - carboxylic acid and alcohol), such polymer is biodegradable, and for this reason, it has been the instrument of many research. The PLLA is considered a biopolymer, in addition to biodegradable it is also biocompatible, which amplifies the application field, mainly in the medical area (PONGTANAYUT *et al.*, 2013).

During metabolism of *scaffold* by the human body, PLLA is hydrolyzed to lactic acid, which under aerobic conditions is metabolized in water and carbon dioxide to finally be excreted by the body. However, its total degradation time is long relatively (approximately 36 months, according to ANNETTE (2005)), which can cause inflammatory reactions. One disadvantage of PLLA is its brittleness and rigidity, which limits the areas of application as biomaterial (NAIR *et al.*, 2007). Associated with the polymer characteristics is the way to built-up the scaffold, and among many possibilities the rotary jet spinning appears to be interesting.

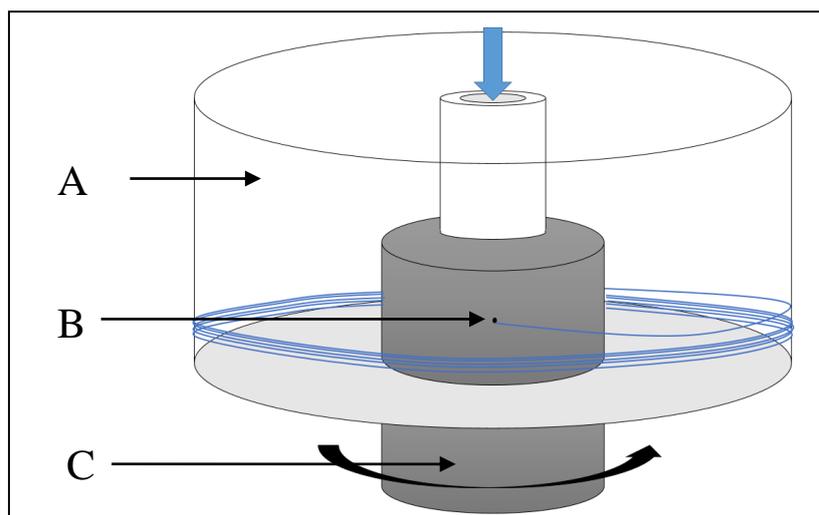
### **2.1.3. Rotary jet spinning**

Rotary jet spinning consists in a simple method for obtaining fibers from micrometric to nanometric scales, and can be described as a process where a polymer solution is exposed at a high rotational speed, which will form a long polymer jet extending before its solidification. Evaporation of the solvent depends on its volatility. If

the solvent is highly volatile, the formed fibers will be thicker due to the fast solidification, result of a faster evaporation, making difficult the extension of the jet (BRITO, 2013; BADROSSAMAY *et al.*, 2010).

When compared to other methods of obtaining micro or nanofibers, rotary jet spinning stands out due to various desired characteristics of the technique. Since there is no necessity of electric field, the polymer solution do not need to be electrically conductive and therefore the technique is readily applied to various polymer solutions. The apparatus has a simplified handling when compared to other micro/nanofiber production techniques, oriented/aligned fibers can be produced, and with a small amount of solution, it is possible to obtain a high amount of fibers (BADROSSAMAY *et al.*, 2010).

Rotary jet spinning equipment, shown in Figure 4, consists of a cylindrical manifold where the formed fibers are deposited and at the center of this manifold there is a central reservoir containing an upper orifice, where the solution is injected (blue arrow). Through 4 small holes in the side of the circular reservoir the jets will come out and form the fibers, and finally an electric motor responsible for rotation, with a power of 3.5 HP and speeds ranging from 1500 to 45000 RPM.



**Figure 4** – Schematic representation of the rotary jet spinning equipment, where the letters represent the items: (A) collector, (B) circular reservoir, and (C) base coupled to the electric motor. Adapted from ZAVAGLIA *et al.*, (2012).

With smaller pores and a higher surface area than normal fibers, the use of rotary jet spinning polymeric micro/nanofibers in the medical field has grown considerably due to the diverse possibilities of application such as artificial skin, bandages for wound regeneration, balloon angioplasty, intragastric balloons, *scaffolds*, neural connections, among others (ZHANG *et al.*, 2005).

#### **2.1.4. Cell culture**

Cell culture is a technique that has been developed to study cellular behavior outside the body under controlled and adequate conditions.

The cell behaves in several ways depending on the characteristics of the substrate, such as porosity, pore geometry, chemical composition, material geometry and surface topography. Therefore, the cell type to be worked depends intrinsically on the properties of the matrix to be chosen so that the cells grow, differentiate, develop and proliferate, so the biomaterials must mimic the characteristics of the desired tissue.

The pores presence allows the growth and penetration of new cells throughout the scaffold, including the vascularization. Before the transplantation, the scaffold will be populated by cells of the receptor, and after populated it will be immobilized at the implanted site, greatly reducing the risk of infection. One of the important factors on the pores present in three-dimensional supports is the size and interconnectivity between them, due to the great influence on cell growth (APARECIDA *et al.*, 2009).

Allied to cell culture, there are several types of tests to verify cell viability, apoptosis (cell death programmed), cell lethality, genotoxicity (DNA mutation), chromosomal abnormalities, uncontrolled cell proliferation. The focus will be given to tests that evaluate biocompatibility through biological responses obtained by *in vitro* tests such as MTT, Live/Dead® and AlamarBlue®. This is one of the steps to validate a possible risk that the material to be implanted can represent human health.

#### **2.1.4.1. Connective Tissue**

The connective tissue has mesodermal origin, and its main functions are to join tissues, serving as support and connection, and to protect the body, since it is responsible for blood coagulation, healing, and transport of gases, nutrients and catabolites. In addition, connective tissue compositions makes its mechanical properties suitable, being a body tissue resistant to impacts and traction, and has elasticity. The connective tissue is also responsible for storing fat and ions (MONTANARI, 2016; OVALLE & NAHIRNEY, 2008; HAM & CORMACK, 1983).

It is characterized by being a tissue that has large amount of extracellular matrix and several cell types present (MONTANARI, 2016; ROSS & PAWLINA, 2012; GENESER, 2003).

The extracellular matrix or intercellular substance can be described in a simple way as a set of molecules that connects cells and organs, giving support to the body. The extracellular matrix is composed of collagen fibers or collagen, elastic fibers, reticular fibers, fundamental substance and interstitial fluid. There are several types of collagens, such as Type I (most common in the body), Type II (present in cartilage), Type III (present in reticular fibers), Type IV (present in basal lamellae) and Type V (present in membranes of the fetus). The elastic fibers make up the walls of the great blood vessels of the base of the heart like the aorta. Finally, the reticular fibers are found in the hematopoietic organs, those that produce blood cells. Connective tissue cells are fibroblasts, fibrocytes, plasma cells, mast cells, macrophages and fat cells (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Preliminary tests of cell culture are done with fibroblasts because they are the most abundant cells present in connective tissue. The main function of fibroblasts is to synthesize the fibers (collagen, elastic and reticular) of connective tissue and the fundamental substance, and produces growth factors that control cell proliferation and differentiation (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

For the in vitro assays it was used a lineage of fibroblast cells, commercially known as VERO lineage, which originated from African green monkey kidney epithelial tissue. This lineage was chosen to analyze the behavior of the fibroblastic cells in contact

with the biomaterial, to study the biomaterial potential as a substitute for some tissues or organs.

#### **2.1.4.2. Bone Tissue**

Osteoblasts are the most abundant component of bones, thus being the main component of the skeleton. The human skeleton consists of more than 200 bones of different shapes, sizes and compositions, serves as soft tissue supports and protects vital organs such as bone marrow. The bones are connected by several joints that allow the execution of movements and guarantee stability to the body (BRITO, 2013; SIKAVITSAS *et al.*, 2001).

The bones work as a deposit of ions, which are stored or released in a controlled manner, in order to maintain constant concentration in body fluids. They can absorb toxins and heavy metals in ways that reduce the effects of these components on other tissues in the body. Since there is no diffusion of substances through the bone matrix, nutrition and the exchange of molecules and ions between blood capillaries and osteocytes depends on the canaliculus present in the matrix itself (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

An important component present in bones is hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), where 99% consists of calcium, 85% phosphorus and 65% sodium, this component is responsible for bone strength and strength profile (BRITO, 2013; ROSEMBERG, 2000).

Bone tissue is a type of specialized connective tissue made up of cells and bone matrix. Cells present in bone tissue are osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. Young cells in the bone tissue are called osteoblasts, and are responsible for the synthesis of organic components of the bone matrix, such as type I collagen, proteoglycans and glycoproteins. Osteocytes are mature cells derived from osteoblasts; these cells are in charge of secreting substances essential for bone maintenance. Osteoclasts are giant, multinucleated, and mobile cells that play roles in bone resorption in bone shade (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Bone is an extremely organized organ and has a complex structure. When exposed to fractures, it is able to remodel and rebuild, but this natural ability is reduced when the trauma is severe as exposed fractures, requiring surgical intervention with the aid of synthetic supports (HING, 2004).

For in vitro assays, a line of osteoblastic cells originating from mice's calvaria M3CT3-E1 subclone 14 (CRL 2594TM) was purchased from ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, EUA). The choice of this line was made to analyze the behavior of the cells in contact with the biomaterial, to investigate the potential of the biomaterial as a bone substitute.

## **2.2. Conclusions**

In general, tissue engineering is an extremely promising field for medical applications due to the advances made in this area, the development of new technologies and the improvement of current technologies has progressed rapidly and increasingly.

Inserted in the field of tissue engineering are metals, ceramics, composites and polymers, where polymers are the main materials used for the development of biomaterials in tissue engineering. Biomaterials are biocompatible materials with the organism, that is, they do not cause rejection or negative responses when inserted in the organism.

Among the most common polymers and biomaterials is PLLA, a polymer already established in the literature when it comes to the development of devices for medical application. This popularity of PLLA is given because of the biocompatibility property.

In order to produce PLLA fibers, a new technology known as rotary jet spinning was used, this process is based on the production of micro/nanometric fibers through a simple processing method, where its main characteristic is the centrifugal force. The production of numerous fibers in scale micro/nanometrics form, in the end, a fibrous membrane.

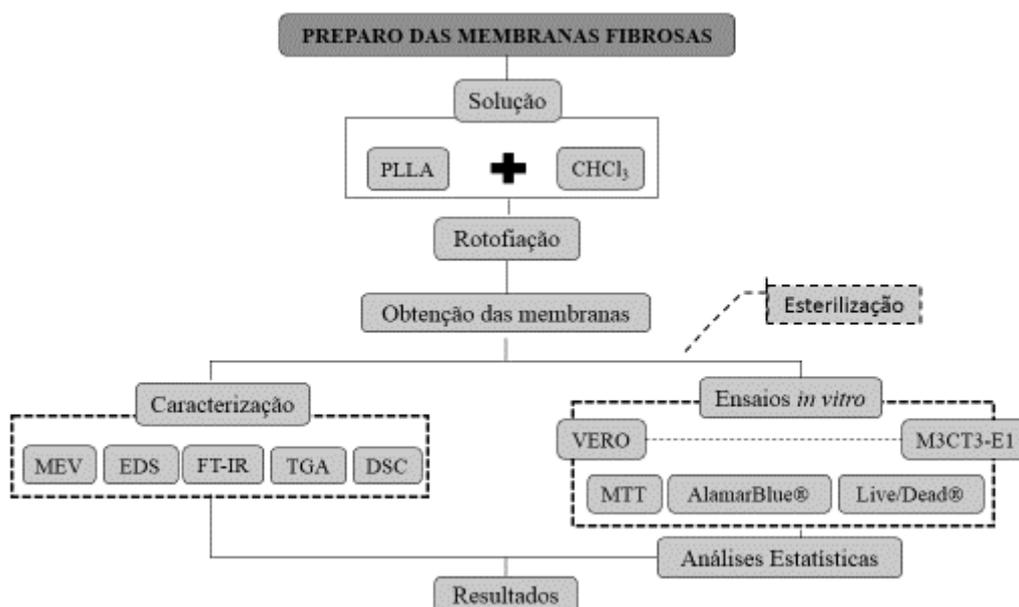
There are several advantages of producing a fibrous membrane for application as biomaterial. Once the membrane has pores, the cells have points for fixation and adhesion, so that these cells grow and proliferate, a tissue will form, and due to the pores present, it will be possible to have vascularization of the formed tissue and the exchange of gases and metabolites will be facilitated.

The cell culture branch (*in vitro* assays), is then inserted, which are intended to perform the preliminary tests for future *in vivo* applications. The most abundant tissue in the human organism is connective tissue. In this way, the main cell culture tests begin with the fibroblasts, young cells of the connective tissue, responsible for the formation of extracellular matrix and act on the cicatrization.

Another well-studied tissue of the human body is bone tissue, due to the large number of accidents involving fractures, the high price of prostheses and the need for more than one life-long surgery, since the existing prostheses require maintenance and in some cases, it is necessary to change them. Thus, the study of young bone tissue cells, osteoblasts, is extremely important for the development of improvements in the medical field, where there is demand for lower cost and wear for the patient as well as for the public system.

## CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA

O Capítulo 3 consiste na apresentação da metodologia utilizada ao longo do trabalho, sendo descritos o preparo da solução, a técnica de rotofiação utilizada e como foi realizada a esterilização do material. Visando apresentar as etapas da metodologia de uma maneira simplificada, foi elaborado um fluxograma da metodologia apresentado na Figura 5, onde foi realizado o preparo da solução para ser possível obter as membranas fibrosas através da rotofiação, as membranas fibrosas foram caracterizadas por diferentes testes, e foram realizados ensaios com culturas celulares seguidos de análises estatísticas.



**Figura 5** – Fluxograma com as etapas do procedimento experimental.

### 3.1. Preparo da solução polimérica

O PLLA utilizado neste trabalho foi produzido através do método de abertura de anel por PATTARO (2016), na Faculdade de Engenharia Química, no INCT-Biofabris, localizado na UNICAMP, que se encontrava no estado sólido.

O PLLA foi então moído, e 3 gramas foram solubilizados em um béquer contendo 15mL de clorofórmio [ $\text{CHCl}_3$ , 99%] da Synth (Brasil). O béquer foi vedado e deixado em repouso em temperatura ambiente para completa solubilização. A solução final obtida foi armazenada num frasco âmbar com vedação, para não haver perda de solvente, e a concentração final obtida foi de 0,2% m/v. A concentração da solução foi preparada seguindo o trabalho de PINTO (2015).

### 3.2. Rotofiação

Como observado na Figura 4, o equipamento utilizado para a rotofiação consiste em três componentes principais, sendo um reservatório com quatro pequenos orifícios na parede, um coletor e uma base acoplada ao motor.

A rotofiação do PLLA foi realizada na Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas no Labiomec.

A Figura 6 representa o equipamento de rotofiação que foi utilizado neste trabalho.



**Figura 6** – Equipamento de rotofiação utilizado no trabalho, disponível na Faculdade de Engenharia Mecânica – UNICAMP. Imagem cedida como cortesia pela Dra. Guinea Brasil Camargo Cardoso.

O coletor foi coberto com papel alumínio para facilitar a remoção das fibras após a rotofiação. O equipamento foi ligado e a velocidade foi estabilizada por aproximadamente 6.500 RPM. A solução de PLLA foi depositada lentamente e de maneira contínua no orifício superior ao reservatório, a fim de manter o fluxo contínuo.

Após o desligamento do equipamento, as fibras obtidas foram retiradas utilizando o papel alumínio como suporte da membrana fibrosa coletada. Todas as amostras foram armazenadas no dessecador até o uso.

### **3.3. Esterilização do material**

As membranas fibrosas de PLLA produzidas através da rotofiação foram posicionadas dentro de envelopes de papel grau cirúrgico e em seguida foram vedados para esterilização a fim de remover toda forma de vida microbiana.

A esterilização foi cedida e realizada pela empresa ACECIL Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda. em Campinas, utilizando óxido de etileno, um gás esterilizante altamente penetrante, com ação bactericida, fungicida, virucida e esporocida. Este método permite esterilizar materiais sem danificá-los, podendo ser aplicado para materiais termossensíveis, já que não há necessidade de aquecimento por métodos de calor seco ou vapor.

Os envelopes foram posicionados numa câmara onde o gás esterilizante foi inserido. Após a esterilização, foram realizadas três aerações forçadas com nitrogênio dentro da câmara, para remover qualquer resíduo de óxido de etileno e de seus subprodutos.

### **3.4. Caracterização das Membranas Fibrosas**

#### **3.4.1. Caracterização físico-química**

Todas as análises para a descrição das membranas fibrosas via caracterização físico-química, foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração – LRAC, exceto a análise de DSC que foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento de Processos de Separação – LDPS. Ambos laboratórios estão localizados na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. As análises realizadas estão descritas a seguir, juntamente com seus resultados.

#### **3.4.2. Avaliação da morfologia**

A análise morfológica da superfície da amostra foi realizada de forma macroscópica (a olho nu) e microscópica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LEO ElectronMicroscopy/Oxford, Leo 440i, Cambridge, Inglaterra), com uma tensão de 20 kV, e corrente de 100 pA. Para a realização desta análise a amostra passou por um processo de recobrimento metálico com ouro em um metalizador (SputterCoater EMITECH, K450, Kent, Reino Unido).

##### **3.4.2.1. Análise dos resultados obtidos**

Visando analisar a membrana fibrosa obtida de maneira global, foi feita uma análise macroscópica (Figura 7), na qual observa-se que a membrana fibrosa apresenta um aspecto volumoso e contínuo, similar a um tecido de algodão. A membrana fibrosa apresentou boa capacidade para manipulação e certa flexibilidade, o que possibilitou que a mesma fosse cortada facilmente com auxílio de uma tesoura.

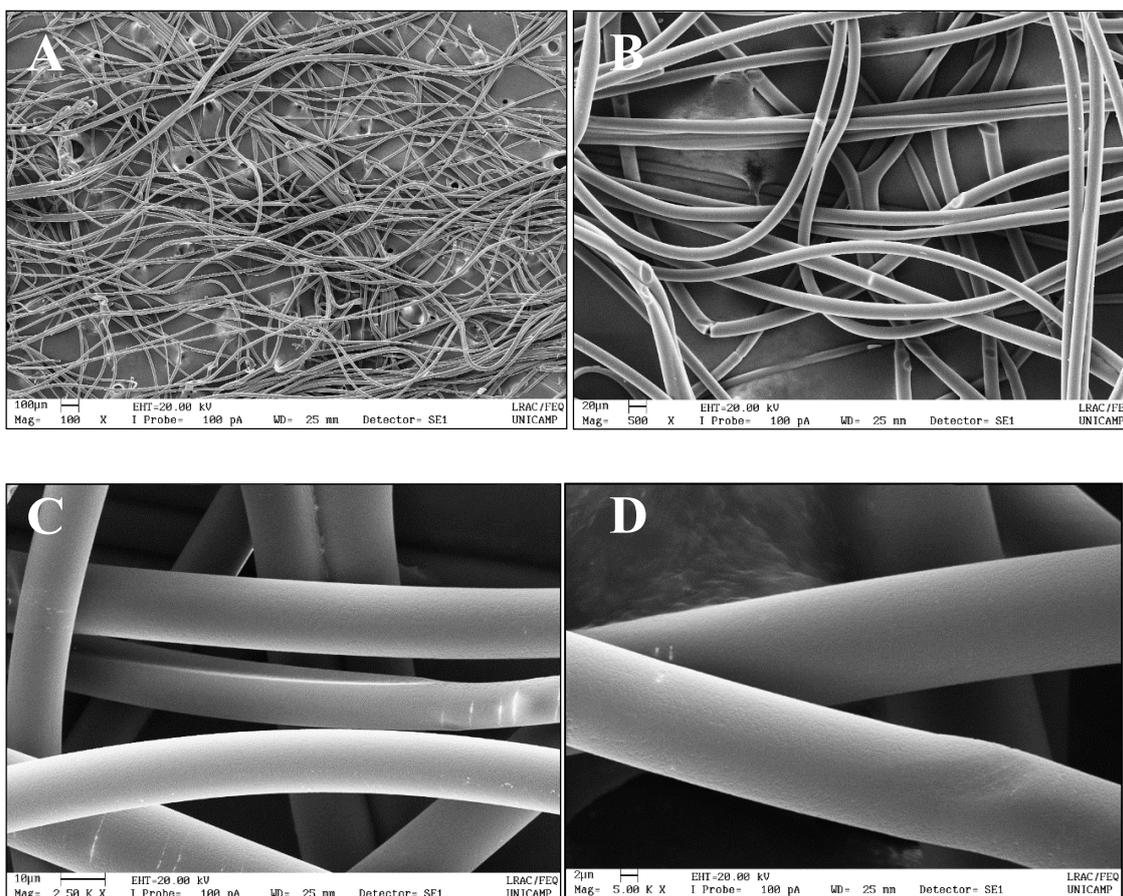


**Figura 7** – Aspecto macroscópico da membrana fibrosa obtida pelo processo de rotofiação.

Buscando analisar a superfície da membrana fibrosa e de suas fibras, microscopicamente, tem-se a Figura 8, que representa as imagens das micrografias obtidas nos aumentos 100x, 500x, 2500x e 5000x.

Tem-se então, de maneira geral, que as Figuras 8-A e B se referem à membrana fibrosa produzida, e as Figuras 8-C e D se referem às fibras das membranas fibrosas.

Pode-se observar na Figura 8-A que as fibras estão dispersas e sobrepostas de forma desordenada. De forma geral, as fibras distribuídas ao longo da membrana fibrosa possuem diâmetro praticamente constante, contendo pouca variação. Os poros ao fundo da foto devem ser desconsiderados, pois pertencem à fita de carbono a qual a membrana fibrosa foi fixada para análise. Já na Figura 8-B pode-se observar que as fibras não contém defeitos, apenas algumas marcas de contato entre as próprias fibras e junção de fibras, estes fatos se dão devido ao tempo de evaporação do solvente. Nas Figuras 8-C e D é possível notar que as fibras não contem poros, possuem sua superfície lisa, e de diâmetro constante, devido a ótima concentração (0,2 g/mL) da solução utilizada na rotofiação e as características de evaporação do solvente.

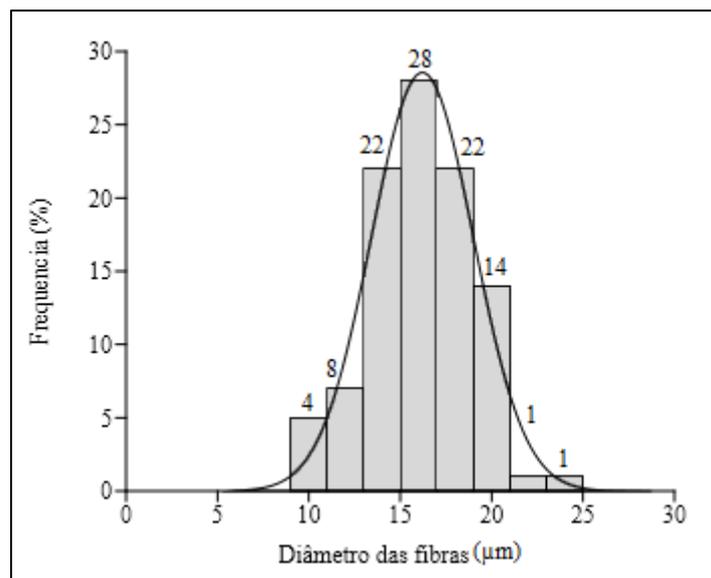


**Figura 8** – Micrografias eletrônicas de varredura obtidas nos aumentos 100x (A), 500x (B), 2500x (C) e 5000x (D).

Observando as micrografias obtidas, pode-se concluir morfológicamente que as membranas fibrosas são adequadas para implantação como biomaterial, uma vez que não possuem defeitos nas fibras como *beads* (defeitos calosos nas fibras) e por estarem entrelaçadas oferecem uma matriz adequada para o crescimento celular.

Nota-se que a membrana fibrosa possui poros de diversos tamanhos devido às fibras se sobreporem de forma desordenada, podendo ser uma alternativa de seu uso para aplicação como *scaffold*.

A Figura 9 mostra um histograma referente a distribuição do diâmetro das fibras das membranas fibrosas obtidas por rotofiação.



**Figura 9** – Distribuição dos diâmetros das fibras das membranas fibrosas de PLLA rotofiadas.

O histograma apresenta a distribuição e a frequência dos tamanhos das fibras, sendo que a gaussiana sobre os histogramas mostra como ocorreu a distribuição normal dos diâmetros próximo ao valor médio (16,24  $\mu\text{m}$ ). Pode-se observar que a maior quantidade das fibras está distribuída próxima ao ponto médio da gaussiana, cerca de 72% das fibras se encontram entre 13 a 19  $\mu\text{m}$ . Isto ocorre devido a homogeneidade das fibras produzidas pelo processo de rotofiação (BRITO, 2013).

### 3.4.3. Avaliação dos compostos químicos

A avaliação elementar qualitativa da membrana fibrosa foi realizada pontualmente através de um equipamento acoplado ao MEV, um detector de energia dispersiva de raios X (EDS) (LEO ElectronMicroscopy/Oxford, 6070, Cambridge, Inglaterra), com uma tensão de 20kV, e corrente de 600 pA para obtenção dos espectros.

Para avaliação dos grupamentos químicos presentes na membrana fibrosa, a amostra foi analisada por FT-IR no modo transmissão (ATR) por meio do uso do

acessório SMART OMNI SAMPLER, no espectrômetro Nicolet 6700 (ThermoScientific, Madison/USA). As análises foram feitas na resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , utilizando uma varredura média de comprimento de onda infravermelho de  $675$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , num total de 128 varreduras, em atmosfera ambiente.

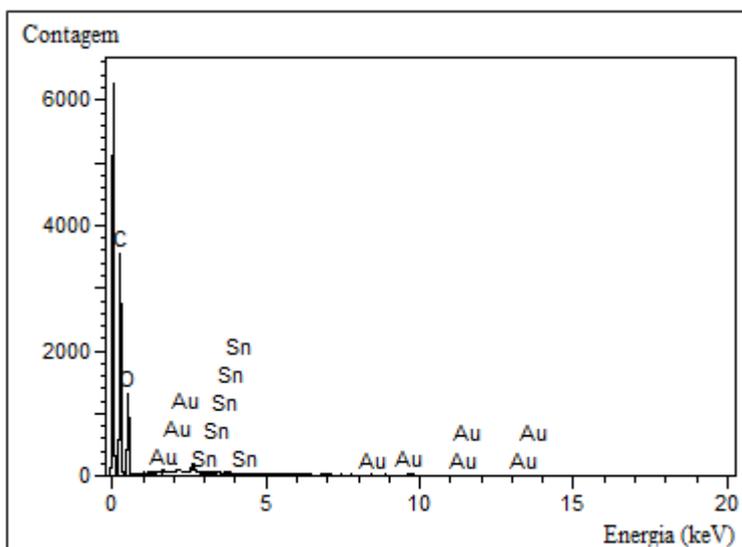
### **3.4.3.1. Análise dos resultados obtidos**

A análise de EDS foi feita para avaliar de forma qualitativa os elementos químicos presentes na membrana fibrosa, para ter uma segurança de que todo o solvente havia sido evaporado durante a rotofiação e que nenhuma substância tóxica estaria presente na membrana fibrosa.

A Figura 10 representa o espectro obtido na análise EDS onde foram encontrados os elementos carbono (C), oxigênio (O), estanho (Sn) e ouro (Au).

A presença de ouro deve-se à metalização da membrana fibrosa, o estanho se dá devido a presença do catalisador utilizado para a produção do polímero, e a presença de carbono e oxigênio já eram esperadas por formarem a cadeia do PLLA.

Os valores disponíveis na Tabela 1 são uma estimativa pontual, uma vez que o equipamento não é sensível para quantificação. Porém, observa-se que estão presentes em maiores quantidades carbono e oxigênio que somados totalizam em 99,32%. A interferência do estanho devido ao catalisador é de 0,68% e pode ser desconsiderada. O ouro presente na Figura 10 foi desconsiderado por pertencer ao processamento da amostra para análise.



**Figura 10** – Espectro obtido na análise EDS

Elementos	%
<b>C</b>	53.10
<b>O</b>	46.22
<b>Sn</b>	0.68
<b>Total</b>	<b>100.00</b>

**Tabela 1** – Porcentagem dos elementos encontrados na análise EDS.

A análise de FT-IR foi feita para comprovar que os grupamentos presentes na membrana fibrosa de PLLA rotofiada não sofreram nenhum tipo de alteração após o processamento.

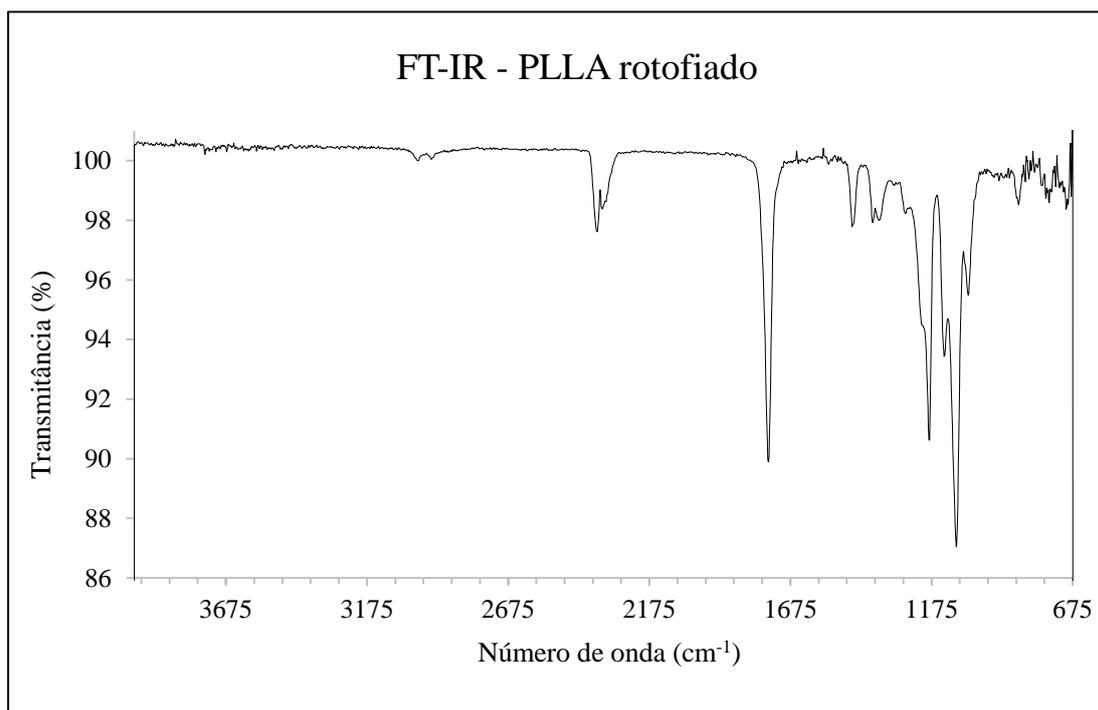
A Figura 11 mostra o espectro obtido na análise de FT-IR na faixa de frequência de 4000 a 675  $\text{cm}^{-1}$  do PLLA rotofiado. Analisando os picos obtidos no espectro podem ser feitas algumas conclusões quanto à composição da membrana fibrosa rotofiada.

Notam-se absorções pouco pronunciadas nas regiões próximas de 3000 a 2775  $\text{cm}^{-1}$ , referentes às ligações dos grupamentos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}$  (PATTARO, 2016; BRITO, 2013; KRIKORIAN & POCHAN, 2005). Na região 1775  $\text{cm}^{-1}$  nota-se um pico bem pronunciado referente ao grupamento  $\text{C}=\text{O}$  (PATTARO, 2016; BRITO, 2013; KRIKORIAN & POCHAN, 2005). Os picos presentes na região de 1475 a 1275  $\text{cm}^{-1}$  são referentes aos grupamentos  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  (PATTARO, 2016; BRITO, 2013; KRIKORIAN & POCHAN, 2005). Nas regiões de, aproximadamente, 1175 a 975  $\text{cm}^{-1}$  observa-se os

maiores picos pronunciados do espectro, referentes ao grupamento C-O (PATTARO, 2016; BRITO, 2013; KRIKORIAN & POCHAN, 2005). E, finalmente, nas regiões de, aproximadamente, 800 a 675 $\text{cm}^{-1}$  encontram-se picos referentes ao grupamento C-H (PATTARO, 2016; BRITO, 2013; KRIKORIAN & POCHAN, 2005).

Pode-se notar que a amostra estava livre de umidade uma vez que não há pronunciamento de picos nas regiões de 4000 a 3000 $\text{cm}^{-1}$ . Os picos presentes nas regiões de 2375 a 2275 $\text{cm}^{-1}$  estão pronunciados devido ao método utilizado (ATR em atmosfera ambiente), onde há uma grande interferência do  $\text{CO}_2$  presente no ambiente, que se fez presente durante a análise, e não foi possível removê-lo mesmo com o branco, pois o equipamento é sensível ao grupamento em questão.

Para facilitar a análise dos dados obtidos na análise de FT-IR, a Tabela 2 foi elaborada.



**Figura 11** – Espectro obtido através da análise de FT-IR

<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupamento</b>
3000 – 2775	CH <sub>3</sub> e CH
2375 – 2275	CO <sub>2</sub>
1775	C=O
1475 – 1275	CH <sub>3</sub> e CH <sub>2</sub>
1175 – 975	C-O
800 – 675	C-H

**Tabela 2** – Grupamentos encontrados na análise de FT-IR da membrana fibrosa de PLLA.

Ambas as análises demonstraram que não há existência de compostos ou grupamentos maléficos ao organismo humano, de forma que o PLLA rotofiado pode ser aplicado na engenharia de tecidos.

#### **3.4.4. Avaliação térmica**

A degradação térmica do material foi verificada por TGA (METTLER TOLEDO, TGA/DSC1 Schwerzenbach, Suíça). Cerca de 10 mg da amostra foram pesados numa balança microanalítica (Mettler Toledo, MX5, Schwerzenbach, Suíça) e então colocados em um cadinho de alumina de 70 $\mu$ L. O cadinho contendo material foi então aquecido em atmosfera inerte com nitrogênio, com uma vazão de 50mL/min, de 25°C a 500°C a uma velocidade de 10°C/min.

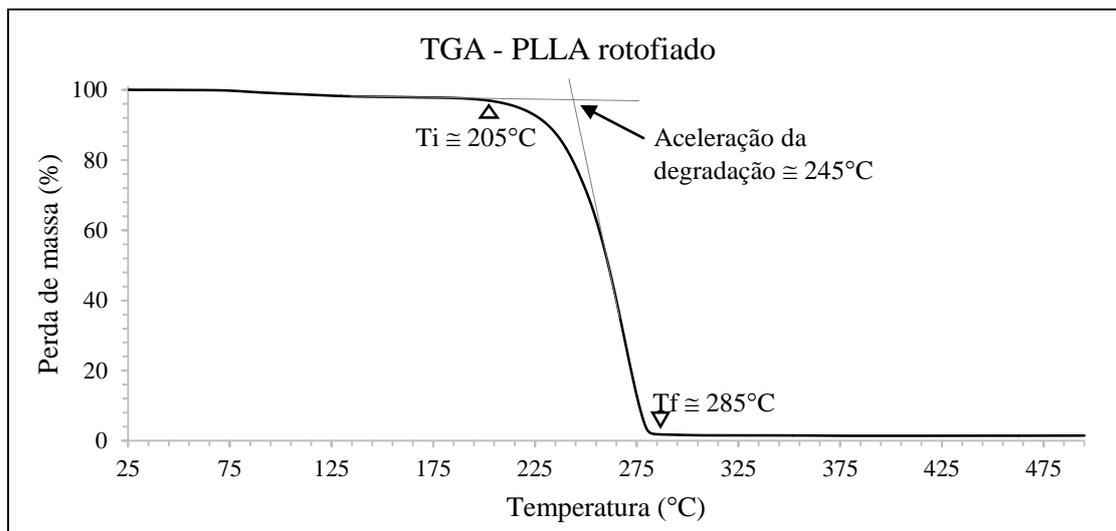
A membrana fibrosa foi caracterizada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) em calorímetro Mettler Toledo DSC 1, com temperaturas variando entre 25°C a 200°C, em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50mL/min a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, a fim de definir as temperaturas específicas do material. Cerca de 7mg do material foram pesados numa balança microanalítica (Mettler Toledo, MX5, Schwerzenbach, Suíça) e colocados num cadinho de alumínio de 40 $\mu$ L, com tampa furada e fechado sob pressão, para então ser realizada a análise.

O material foi aquecido até 200°C, abaixo da temperatura de degradação do mesmo (confirmado pelo TGA na Figura 12), em seguida foi resfriado até 25°C, e novamente aquecido até 200°C. Este processo é realizado para o material perder sua memória térmica. O segundo aquecimento representa o comportamento do material sem a influência do processamento.

#### **3.4.4.1. Análise dos resultados obtidos**

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos na análise TGA foi desenvolvido o gráfico representado na Figura 12, que relaciona a variação de massa em porcentagem com a temperatura (em graus Celsius). A curva obtida corresponde à perda de massa da membrana fibrosa de PLLA.

O comportamento do material se mantém constante (sem perda de massa) até a temperatura aproximada de 205°C; a partir desta temperatura o material começa a perder massa, adota-se então 205°C como temperatura inicial de degradação ( $T_i$ ). Em seguida há uma curva com uma queda abrupta da massa, que representa uma degradação rápida do material, até a mesma chegar na temperatura final de degradação ( $T_f$ ) onde a curva se estabiliza novamente e se mantém constante em praticamente 0, indicando a degradação completa da membrana fibrosa de PLLA. A  $T_f$  avaliada foi de aproximadamente 285°C. Para encontrar o valor de temperatura em que o material apresenta a aceleração da degradação, foram feitas as derivadas da curva entre  $T_i$  e  $T_f$ , e encontrou-se o valor de aproximadamente 245°C.



**Figura 12** – Curva termogravimétrica obtida para o PLLA rotofiado (onde  $T_i$  representa a temperatura inicial de degradação do material, e  $T_f$  representa a temperatura final de degradação do material).

A Figura 13 representa o espectro obtido na análise de DSC, referente ao primeiro e ao segundo aquecimento, podem ser observadas as temperaturas de transição vítrea ( $T_g$ ), de cristalização ( $T_c$ ) e temperatura de fusão ( $T_m$ ). Os espectros do primeiro aquecimento, do resfriamento e do segundo aquecimento estão disponíveis no Apêndice 1.

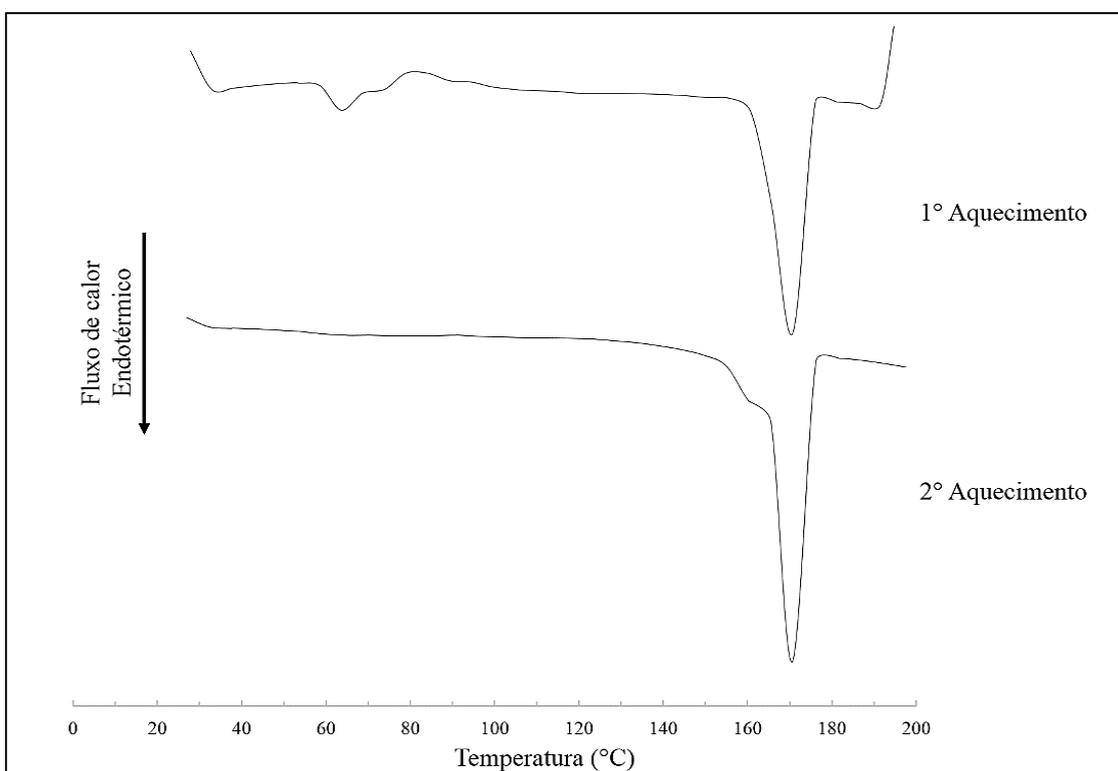
Nota-se que a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura que se inicia o movimento das cadeias poliméricas, ou seja, temperatura que as cadeias poliméricas podem mudar de conformação, se encontra nítida apenas no primeiro aquecimento, em torno de 63°C.

A temperatura de cristalização à frio ( $T_{cc}$ ) é a temperatura em que grande parte das cadeias poliméricas se movem de maneira a formar uma estrutura cristalina pontual, a temperatura inicial de cristalização ( $T_c$ ) também pode ser observada.  $T_c$  e  $T_{cc}$  podem ser observadas apenas no primeiro aquecimento, na qual  $T_c$  é aproximadamente em 73°C e  $T_{cc}$  em 80°C.

Já a temperatura de fusão cristalina, ou temperatura de fusão ( $T_m$ ) é a temperatura em que as regiões cristalinas da cadeia polimérica desaparecem e se fundem,

deixando então o polímero em estado fundido. Pode-se notar que se trata de um pico bem definido no primeiro aquecimento e no segundo aquecimento nota-se uma região bimodal. No primeiro aquecimento seu valor é de aproximadamente 173,5°C, e no segundo aquecimento nota-se que o material apresenta duas novas fases cristalinas em sua estrutura, uma em aproximadamente 160°C e outra em 170°C.

Como uma maneira mais simples de visualizar os dados obtidos na análise de DSC, foi elaborada a Tabela 3.



**Figura 13** - Espectro de DSC obtida para as membranas fibrosas de PLLA rotatiado referentes ao primeiro e segundo aquecimento.

<b>1° Aquecimento</b>	Temperatura de transição vítrea (Tg)	63°C
	Temperatura de cristalização (Tc)	73°C
	Temperatura de cristalização à frio (Tcc)	80°C
	Temperatura de fusão (Tm)	173,5°C
<b>2° Aquecimento</b>	Temperatura de fusão 1 (Tm <sup>1</sup> )	160°C
	Temperatura de fusão 2 (Tm <sup>2</sup> )	170°C

**Tabela 3** – Temperaturas de transição encontradas no primeiro e segundo aquecimentos da membrana fibrosa de PLLA rotatiada.

Segundo JAHNO (2005) e AURAS *et al.* (2003), as temperaturas de cristalização e temperatura de fusão do PLLA são descritas como,  $T_{cc}$  entre 50°C e 80°C, e  $T_m$  entre 130°C a 180°C.

Comparando os valores obtidos de  $T_m$  no segundo aquecimento (160°C e 170°C) com o valor de PATTARO (2016) (148,5°C), pode-se afirmar que houve variação na estrutura polimérica da membrana fibrosa, isto se dá pelo processamento de rotofiação o qual o material foi submetido.

Desta forma, analisando termicamente, pode-se concluir que as membranas fibrosas de PLLA rotofiadas tem uma alta capacidade térmica para ser utilizada como biomaterial, uma vez que sua temperatura de degradação se inicia em aproximadamente 205°C, confirmando que o material não irá se degradar ao ser implantando devido à temperatura corporal. Sua temperatura de fusão se encontram entre 160°C e 170°C, o que certifica que o material não irá sofrer nenhuma mudança na sua conformação quando implantado no corpo humano.

### **3.5. Conclusões**

Após as etapas de preparo da solução, rotofiação e esterilização das membranas fibrosas serem realizadas, as membranas fibrosas de PLLA seguiram para realização das técnicas de caracterização e ensaios *in vitro* para assim ser possível a definição da melhor aplicação da mesma.

Os resultados obtidos nas análises morfológica e físico-químicas reafirmam o possível uso do PLLA para aplicação na engenharia de tecidos, já consagrado na literatura. A estrutura de superfície das fibras de PLLA rotofiado mostram que não há defeitos ao longo das fibras, e o entrelaçamento entre estas fibras que formam a membrana fibrosa geram poros por toda a membrana fibrosa o que facilita a vascularização e trocas gasosas das células. Nas avaliações químicas (EDS e FT-IR), os resultados obtidos demonstram que a membrana fibrosa de PLLA rotofiada não demonstra toxicidade uma vez que não possui compostos tóxicos presentes e não apresenta grupamentos nocivos à saúde. Ao analisar os grupamentos presentes, nota-se que o material não sofreu alterações

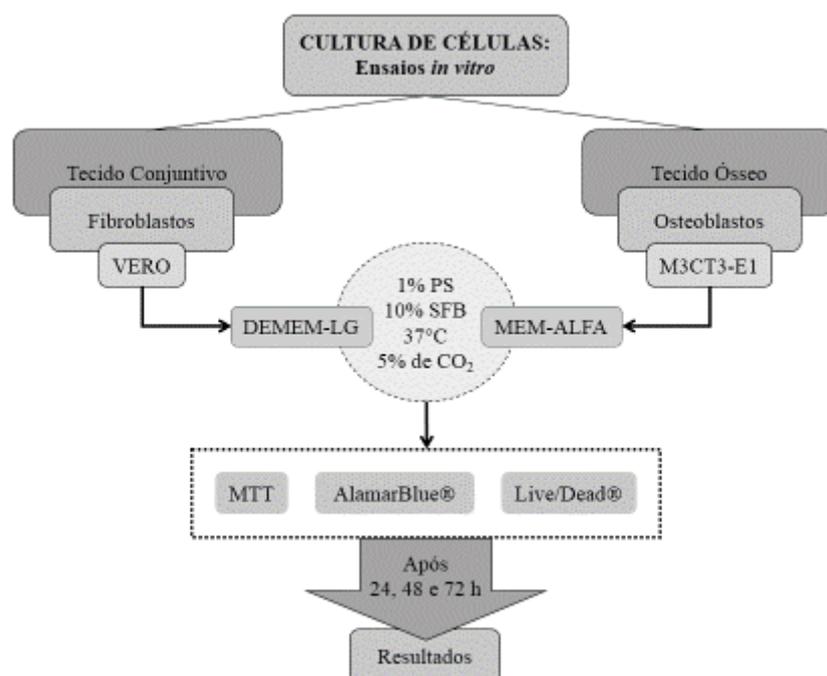
em seus grupamentos após passar pela rotofiação. Os valores obtidos nas avaliações térmicas são diferentes à valores encontrados para o PLLA na literatura, podendo afirmar que o processamento do polímero alterou sua estrutura aquímica. Quando houver a aplicação das membranas fibrosas no organismo humano, as mesmas não irão sofrer alguma transição ou degradação. Com estes resultados, analisando apenas as características físico-químicas das membranas fibrosas de PLLA rotofiado, pode-se concluir que seu uso como biomaterial não oferece riscos à saúde, podendo ser utilizado para aplicações médicas.

## CAPÍTULO 4 – AVALIAÇÃO EM CULTURA CELULAR

O Capítulo 4 busca explicar, de forma clara a finalidade dos testes biológicos realizados, e apresentar os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* para avaliação biológica com os dois tipos de linhagem celular escolhidos, fibroblastos e osteoblastos. Os testes realizados com estas linhagens visaram conhecer o comportamento das mesmas quando expostas em contato com as membranas fibrosas de PLLA rotofiadas.

### 4.1. Avaliação biológica

A Figura 14 é uma representação esquemática dos ensaios *in vitro* realizados no trabalho. Foram selecionadas duas linhagens celulares (VERO e M3CT3-E1), ambas foram mantidas nas mesmas condições e foram realizados os ensaios de viabilidade celular (MTT, Live/Dead® e AlamarBlue®) para avaliar a toxicidade das membranas fibrosas de PLLA nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Nos testes MTT e AlamarBlue® foi realizado o branco e descontado das médias para a realização dos gráficos.



**Figura 14** – Fluxograma esquemático das etapas dos ensaios *in vitro*.

Foi realizada a cultura celular de duas linhagens celulares diferentes, sendo elas: osteoblastos originários da calvária de ratos M3CT3-E1 subclone 14 (CRL 2594TM) adquiridas junto à ATCC (*American Type Culture Collection*; Manassas, VA, EUA), e fibroblastos originários de rim de Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*), fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP (CCIAL 057/ ATCC CCL-81).

Buscando eliminar os erros dos ensaios, as membranas fibrosas inseridas em cada poço foram cortadas em medidas iguais (1cm<sup>2</sup>).

Todos os testes foram feitos em quadruplicata e ao final do tempo de 24, 48 e 72 horas de contato entre a membrana fibrosa de PLLA e as células. Desta forma, foram então verificadas as propriedades como citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular, por testes *in vitro* que serão melhores explicados a seguir.

Para avaliar a viabilidade celular foi realizado o teste Live/Dead®; este ensaio se baseia em distinguir células vivas de células mortas por meio de coloração fluorescente. As células vivas são coloridas em verde e as mortas são coloridas em vermelho.

Cada corante possui um tempo específico e sua análise é observada em um microscópio de fluorescência. São obtidas imagens as quais são analisadas, e se estabelece uma relação entre células vivas e mortas, de forma que é possível tirar conclusões quanto à interação do substrato e a cultura celular.

As avaliações da proliferação celular e citotoxicidade foram feitas através dos ensaios de MTT e AlamarBlue®, ambos ensaios colorimétricos. Foram realizados os dois ensaios pois, segundo HAMID *et al.* (2004) o teste AlamarBlue® é mais sensível para a detecção da citotoxicidade que o teste MTT.

O ensaio MTT mede a atividade da enzima redutase mitocondrial em células vivas. É inserido o sal amarelo tetrazólio, e se as células que estiverem metabolicamente ativas irão metabolizar o sal mudando o meio de cor para tons de azul e púrpura. Os ensaios foram feitos em placas contendo 96 poços onde foram semeadas as células

Para o ensaio AlamarBlue® é utilizado o corante azul fracamente fluorescente conhecido como resazurina, que ao ser metabolizado pelas células, é reduzido à resuforina mudando sua cor para rosa e altamente fluorescente. O mecanismo pelo qual acontece

essa redução ainda está pouco esclarecido, mas acredita-se que as células viáveis fazem este processo através de reações químicas ou enzimáticas (SILVA, 2009).

Os testes foram realizados em parceria com a Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP no Labimo.

Para cada linhagem celular foi utilizado um meio de cultura específico. Os osteoblastos (M3CT3-E1) foram cultivadas com 10 mL de meio de cultura mínimo essencial Eagle (MEM-ALFA, Vitrocell), e os fibroblastos (VERO) foram cultivados com meio Eagle modificado por Dulbecco com baixa concentração de glicose (DMEM-LG - Gibco). Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 1% de penicilina e estreptomicina (PS, Gibco) e as células foram mantidas a 37°C em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> na atmosfera (Sanyo Scientific, USA).

Posteriormente as células foram utilizadas para realização dos ensaios *in vitro* pelos métodos colorimétrico e de fluorescência do MTT, AlamarBlue® e Live/Dead®.

## **4.2. Metodologia dos ensaios *in vitro***

### **4.2.1. Inoculação das células para os ensaios *in vitro***

Foi inoculada uma suspensão de células M3CT3-E1 e células VERO na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL em placas de 96 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) para a realização dos ensaios do MTT, AlamarBlue® e Live/Dead®. As placas foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 h.

### **4.2.2. Avaliação da citotoxicidade direta**

Decorrido 24 h de ambientação foi adicionado aos poços as membranas fibrosas de PLLA rotofiado, a fim de avaliar a possível liberação de substâncias tóxicas presentes no material nas culturas de células M3CT3-E1 e VERO.

#### **4.2.2.1. Ensaio de viabilidade celular *in vitro* MTT**

Foi adotado o método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium modificado por MOSMANN (1983) e de acordo com normas internacionais recomendadas para avaliação de novos biomateriais (ISO 10993-5 I Par 5, 1992; KIRKPATRICK, 1992).

Após período de cultivo de 24, 48 e 72 h as membranas fibrosas e o meio de cultura foram retirados dos poços, que foram lavados com 200  $\mu$ L de PBS. O MTT, previamente dissolvido em PBS (5 mg/mL), foi diluído em meio MEM-ALFA e DMEM de acordo com a cultura célula a ser analisada, em uma concentração de 0,5 mg da solução estoque por mililitro de meio. Em seguida, 200  $\mu$ L da solução foi adicionada nos poços e a placa mantida no escuro em incubadora de CO<sub>2</sub> por 4 h a 37°C. Após este período, a solução de MTT foi descartada, 200  $\mu$ L de sulfóxido de dimetilo (DMSO) foi adicionado e a placa mantida em agitação por 30 min em temperatura ambiente.

Foi utilizado como controle positivo de toxicidade (CPT) uma solução de meio (MEM-alfa para M3CT3-E1 e DMEM para VERO), suplementados com 10% de fenol. Como controle negativo de toxicidade (CNT) foi adotado o meio convencional (MEM-ALFA e DMEM) suplementado com 10% SFB e 1% de PS.

A densidade óptica das células viáveis foram acessadas por meio de leitura de absorbância em leitor de Microplacas (Microplate Reader F5, Molecular Probes) em comprimento de onda de 595 nm.

#### **4.2.2.2. Ensaio de viabilidade celular *in vitro* AlamarBlue®**

Após 24, 48 e 72 h de incubação os materiais foram retirados e foram adicionados aos poços 50  $\mu$ L da solução do reagente Alamar Blue® em uma concentração de 10% em relação ao volume dos meios MEM-ALFA e DMEM presente nos poços (v/v) conforme recomendações do fabricante (Alamar Blue® *Cell Viability Reagent*). Em seguida a placa foi mantida no escuro em incubadora de CO<sub>2</sub> por 4 h a 37°C. Após este

período foram transferidos 100  $\mu$ L (n=4) para uma placa de 96 poços. A presença de células viáveis nestes poços foram detectadas por meio de filtros de fluorescência com 460 nm (emissão) e 630 nm (excitação) em leitora de Microplacas (Microplate Reader F5, Molecular Probes).

Foi utilizado como controle positivo de toxicidade (CPT) uma solução de meio (MEM-alfa para M3CT3-E1 e DMEM para VERO), suplementados com 10% de fenol. Entretanto para este ensaio houve evaporação de fenol nas placas, de forma que causou apoptose das células. Decidiu-se então utilizar como CPT um ambiente livre de fenol, sendo apenas os poços com meio de cultura. Como controle negativo de toxicidade (CNT) foi adotado o meio convencional (MEM-ALFA e DMEM) suplementado com 10% SFB e 1% de PS.

#### **4.2.2.3. Ensaio de viabilidade celular *in vitro* Live/Dead®**

Para a obtenção de imagens por microscopia de fluorescência as células VERO e M3CT3-E1 cultivadas com as membranas fibrosas por 24, 48 e 72 h, as células foram marcadas com kit específico (Live/Dead® *Viability cytotoxicity*) conforme recomendações do fabricante. Os materiais foram retirados dos poços e estes foram lavados com PBS. Foram utilizados dois marcadores: verde fluorescente calceína AM (480/500 nm excitação) e vermelho fluorescente iodeto de propídeo (490/638 nm excitação).

O procedimento foi realizado para obtenção de imagens do fundo do poço onde as células estavam sendo cultivadas, e imagens das membranas fibrosas de PLLA produzidas que foram cultivadas com as células.

As placas que continham as células e as membranas fibrosas foram incubadas, e foi adicionada solução contendo 2  $\mu$ M de iodeto de propídeo e 2  $\mu$ M de calceína AM por 30 minutos a 37°C para a marcação de células viáveis e não viáveis onde, aquelas apresentaram membrana celular intacta foram marcadas em verde fluorescente e aquelas com danos na membrana foram marcadas em vermelho fluorescente.

Após período de incubação as células foram observadas em microscópio com filtros de fluorescência (Nikon E800) e as imagens capturadas com software específico (Image Pro-Plus software). Foram obtidas duas imagens idênticas de uma mesma região com filtros com comprimentos de emissão e excitação correspondentes aos fluorocromos presentes no kit. Estas imagens foram sobrepostas em software para processamento de imagens de microscopia (ImageJ®). Foram obtidas imagens de regiões distintas de cada poço.

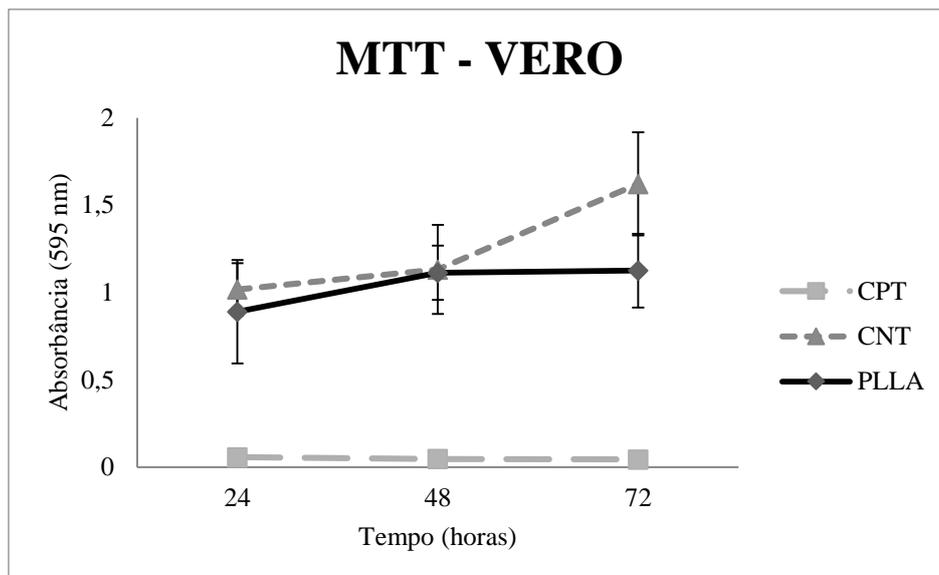
Foi utilizado como controle negativo de toxicidade (CNT) os meios convencionais (MEM-ALFA e DMEM) suplementados com 10% SFB e 1% de PS para as imagens do fundo dos poços.

### **4.3. Resultados dos ensaios *in vitro***

#### **4.3.1. Resultados dos ensaios com as células VERO**

##### **4.3.1.1. Resultados MTT**

A Figura 15 apresenta a curva de proliferação celular das células VERO após períodos de cultivo de 24, 48 e 72 horas com as membranas fibrosas de PLLA e seus controles positivo (CPT) e negativo de toxicidade (CNT), em termos de absorbância.

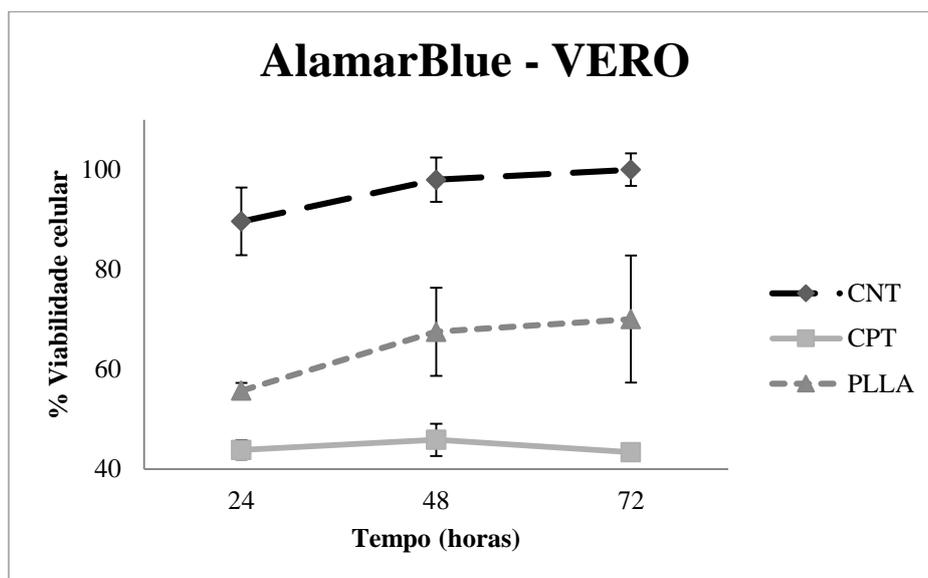


**Figura 15** – Curva de proliferação celular pelo método do MTT das células VERO nos tempos de 24, 48 e 72 h.

Ao analisar a Figura 15 nota-se que o comportamento do CPT teve uma baixa absorbância nos três tempos analisado, como já era esperado, uma vez que as células presentes no CPT se encontram mortas. Já o CNT teve um aumento gradual de 24 até 72 h, como também era esperado, uma vez que as células presentes no CNT estão vivas. Já as células que estiveram em contato com as membranas fibrosas de PLLA, denominadas na Figura 15 de PLLA, tiveram um crescimento no tempo de 24 para 48 h, e houve uma estabilização no crescimento nos tempos de 48 para 72 h. Uma vez que os resultados fornecidos mostram que o comportamento do PLLA se assemelha mais ao comportamento do CNT, pode-se assumir que as membranas fibrosas de PLLA produzidas não são tóxicas às células, uma vez que as mesmas, em contato com o material, apresentaram uma curva de proliferação.

#### 4.3.1.2. Resultados AlamarBlue®

Na Figura 16 está representado a viabilidade celular em porcentagem das células VERO no ensaio AlamarBlue®, nos tempos de 24, 48 e 72 h.

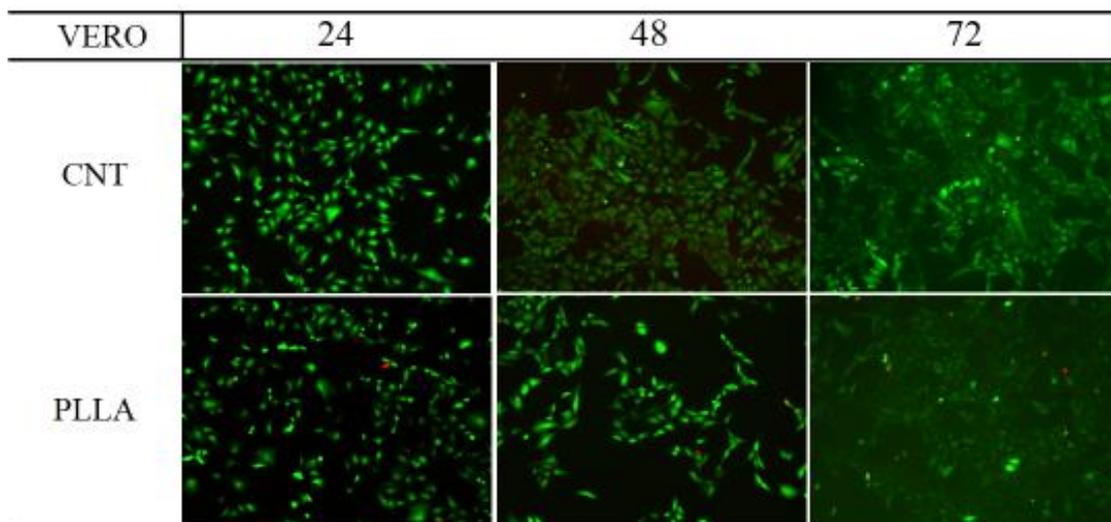


**Figura 16** – Porcentagem de viabilidade das células VERO detectada pela intensidade de fluorescência do AlamarBlue nos tempos de 24, 48 e 72 h.

A Figura 16 apresenta os resultados obtidos na análise, onde o CPT teve uma viabilidade celular abaixo das demais (CNT, PLLA), e o CNT teve a viabilidade celular com maiores valores, como era esperado. Pode-se observar que a curva da viabilidade celular das células que estiveram em contato com as membranas fibrosas (PLLA) apresentaram um crescimento gradual de 24 até 72 h. Estes dados afirmam que as membranas fibrosas de PLLA rotofiadas não apresentam toxicidade às células, uma vez que seu comportamento se assemelha ao comportamento do CNT, o que indica que o material pode ser utilizado na engenharia de tecidos.

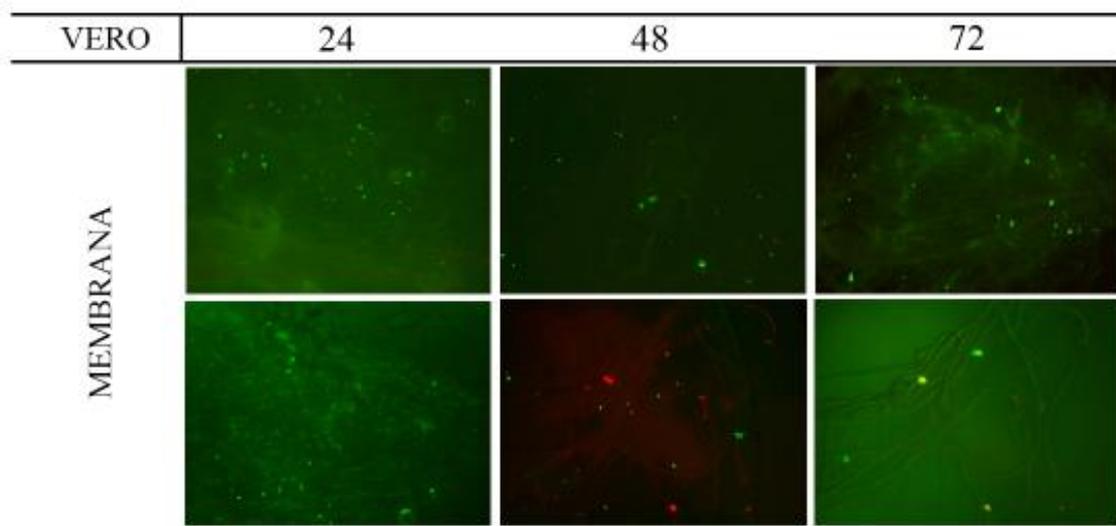
#### 4.3.1.3. Resultados Live/Dead®

As Figuras 17 e 18 apresentam as imagens da viabilidade celular por meio do uso do ensaio Live/Dead® obtidas por microscópio invertido de fluorescência. A Figura 17 apresenta imagens obtidas do fundo do poço referentes ao CNT e ao PLLA nos tempos de 24, 48 e 72 h. A Figura 18 apresenta imagens obtidas das membranas fibrosas nos tempos de 24, 48 e 72 h.



**Figura 17** – Imagens de microscopia óptica do fundo da placa das células VERO cultivadas por 24, 48 e 72 h. Aumento de 10x.

Comparando as imagens obtidas para o CNT e para o PLLA na Figura 17, nota-se uma semelhança entre os três tempos em que o ensaio foi realizado, onde a quantidade de células vivas (verdes) é expressivamente maior que a quantidade de células mortas (vermelhas). Desta forma, é possível assumir que o material não apresentou toxicidade às células já que o comportamento das células nas imagens são semelhantes.



**Figura 18** – Imagens de microscopia óptica das membranas fibrosas cultivadas com células VERO cultivadas por 24, 48 e 72 h. Aumentos de 10 x e 20x.

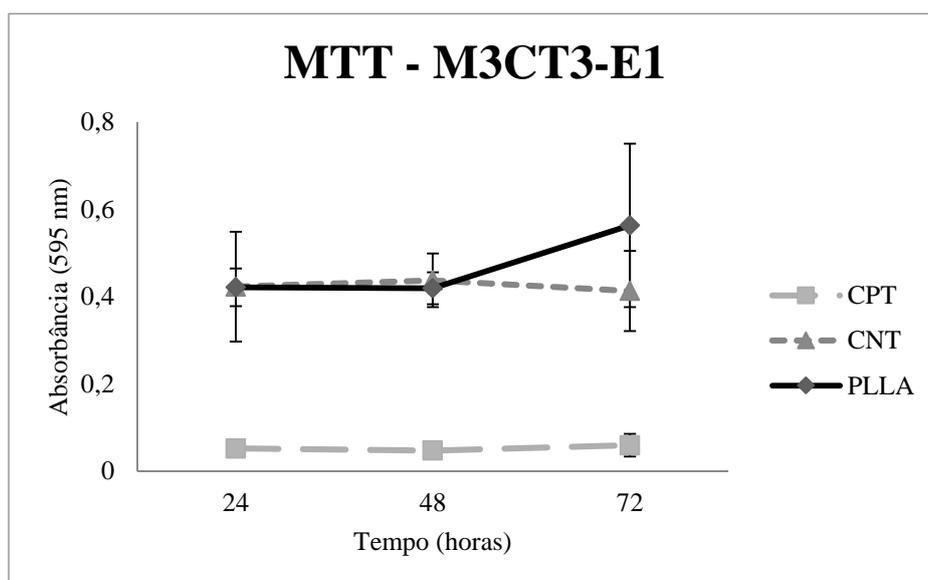
Na Figura 18 é possível observar que as células não se aderiram às membranas de forma significativa, tendo apenas algumas células espalhadas pelas fibras, porém pode-se observar que a maioria das células que está presente nas membranas estão coloridas em verde, ou seja, estão vivas.

Desta forma é possível concluir que as membranas de PLLA rotofiado não apresentaram toxicidade às células, uma vez que a quantidade de células vivas era expressivamente maior que a quantidade de células mortas. Assim, é possível assumir que as membranas fibrosas de PLLA tem potencial para serem utilizadas na engenharia de tecidos.

#### 4.3.2. Resultados dos ensaios com as células M3CT3-R1

##### 4.3.2.1. Resultados MTT

A Figura 19 apresenta a viabilidade das células M3CT3-E1 após períodos de cultivo de 24, 48 e 72 horas com as membranas fibrosas de PLLA, e seus controles positivo (CPT) e negativo de toxicidade (CNT). Neste gráfico a viabilidade celular está representada em termos de absorbância (595 nm).



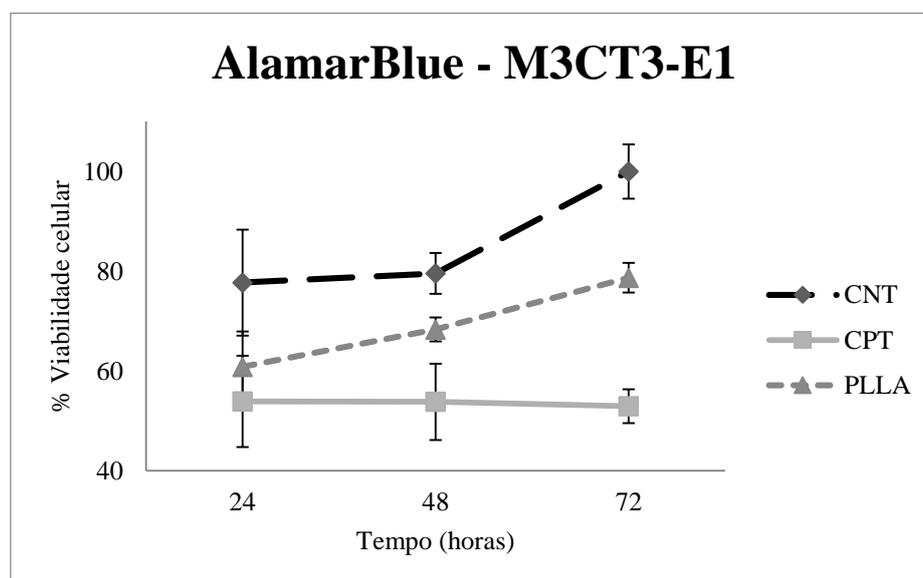
**Figura 19** – Curva de proliferação celular pelo método do MTT das células M3CT3-R1 nos tempos de 24, 48 e 72 h.

Observando a Figura 19 conclui-se que o CPT teve uma absorvância baixa, próxima a 0 durante todo período do ensaio, e o CNT teve um aumento de 24 para 48 h, e uma pequena diminuição no tempo de 48 para 72 h. Já as células que estiveram em contato com as membranas fibrosas (PLLA) se mantiveram praticamente estáveis no período de 24 até 48 h, e de 48 até 72 h apresentaram um maior crescimento. Pode-se concluir que o comportamento da curva PLLA se assemelha ao comportamento da curva CNT, tendo resultados muito próximos nos tempos de 24 e 48 h.

Desta forma, pode-se admitir que as membranas fibrosas produzidas não apresentaram toxicidade às células, uma vez que as células que estavam em contato com o material apresentaram uma curva de proliferação crescente.

#### 4.3.2.2. Resultados AlamarBlue®

A Figura 20 apresenta a porcentagem de viabilidade celular das células M3CT3-E1, nos tempos de 24, 48 e 72 h para o ensaio de AlamarBlue®.

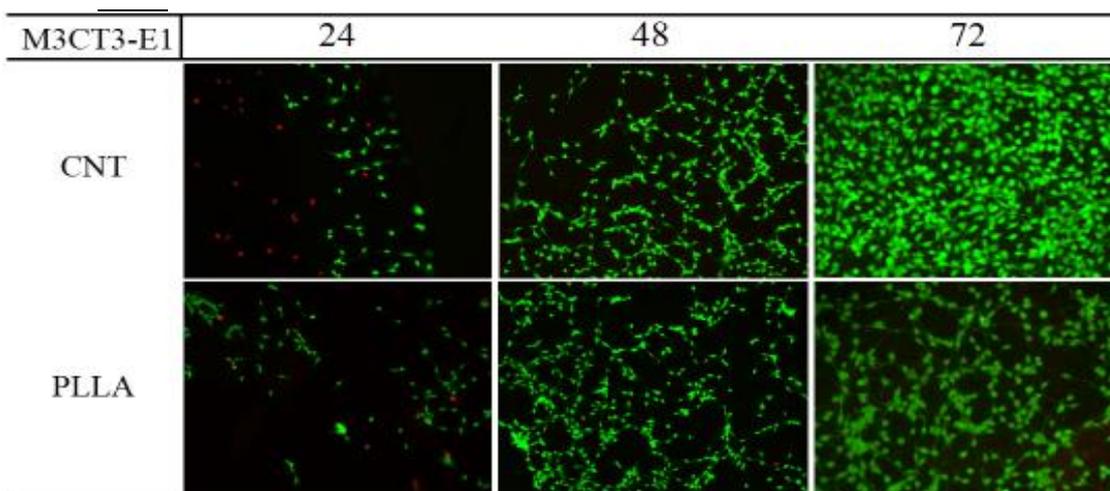


**Figura 20** – Porcentagem de viabilidade das células M3CT3-R1 detectada pela intensidade de fluorêscencia do AlamarBlue nos tempos de 24, 48 e 72 h.

Ao analisar a Figura 20 pode-se notar que o CPT apresentou uma porcentagem abaixo das demais curvas (CNT, PLLA), tendo uma curva levemente decrescente no período de ensaio de 24 até 72 h. O CNT apresentou um comportamento praticamente estável entre 24 e 48 h, e um comportamento crescente de 48 até 72 h. A curva PLLA, que representa o comportamento das células que estiveram em contato com as membranas fibrosas produzidas apresentou um comportamento crescente durante todo o período de ensaio (de 24 até 72 h). Assim pode-se concluir que as membranas fibrosas de PLLA rotofiadas produzidas não apresentaram toxicidade às células, tendo potencial para serem utilizadas na engenharia de tecidos como um biomaterial.

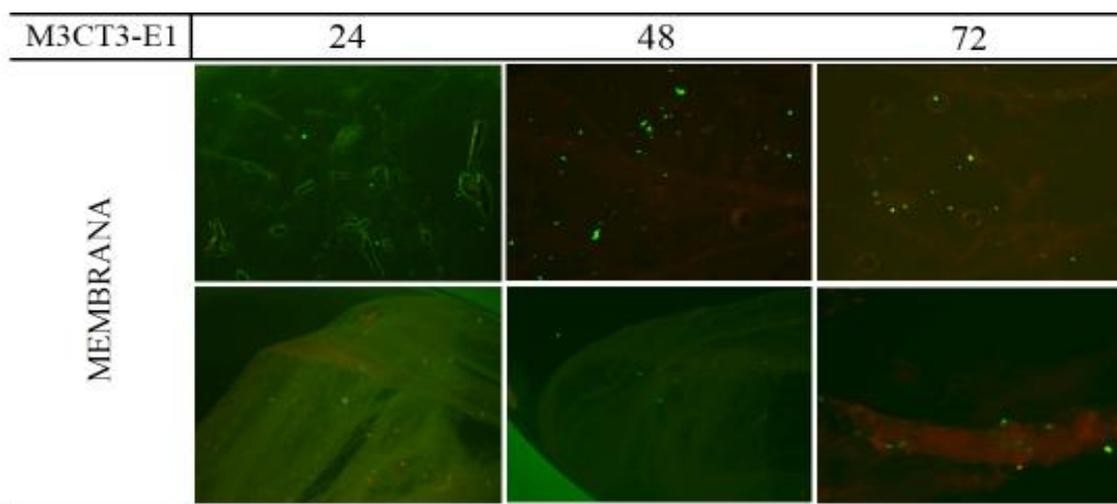
#### 4.3.2.3. Resultados Live/Dead®

As Figuras 21 e 22 apresentam as imagens da viabilidade celular por meio do uso do ensaio Live/Dead® obtidas por microscópio invertido de fluorescência. A Figura 21 apresenta imagens obtidas do fundo do poço referentes ao CNT e ao PLLA nos tempos de 24, 48 e 72 h. A Figura 22 apresenta imagens obtidas das membranas fibrosas nos tempos de 24, 48 e 72 h.



**Figura 21** – Imagens de microscopia óptica do fundo da placa das células M3CT3-E1 cultivadas por 24, 48 e 72 h. Aumento de 10x.

Comparando as imagens obtidas para o CNT e para o PLLA na Figura 21, nota-se uma semelhança entre os três tempos em que o ensaio foi realizado, onde a quantidade de células vivas (verdes) é expressivamente maior que a quantidade de células mortas (vermelhas). Desta forma, é possível assumir que o material não apresentou toxicidade às células.



**Figura 22** – Imagens de microscopia óptica das membranas fibrosas cultivadas com células M3CT3-E1 cultivadas por 24, 48 e 72 h. Aumentos de 10 x e 20x.

Na Figura 22 é possível observar que as células não se aderiram às membranas fibrosas de forma significativa, sendo possível notar que há um menor número de células do que na Figura 18. Porém pode-se observar que a maioria das células que está presente nas membranas fibrosas estão coloridas em verde, ou seja, estão vivas.

Desta forma é possível concluir que as membranas fibrosas de PLLA rotofiado não apresentaram toxicidade às células, uma vez que a quantidade de células vivas era maior que a quantidade de células mortas, sendo possível assumir que as membranas fibrosas de PLLA tem potencial para serem utilizadas na engenharia de tecidos.

#### **4.4. Conclusões**

Através dos ensaios realizados nos testes *in vitro* foi possível notar que ambas linhagens celulares, tanto fibroblastos (VERO) quanto osteoblastos (M3CT3-E1) demonstraram resultados positivos de viabilidade, proliferação e crescimento celular, e o material não se mostrou tóxico às células expostas em contato com o mesmo. Foi possível notar através do ensaio Live/Dead® das membranas fibrosas que não houve um grande número de células aderidas, porém as poucas células presentes estavam coradas em verde.

## CAPÍTULO 5 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O Capítulo 6 consiste em uma apresentação clara das análises estatísticas realizadas e dos dados obtidos.

### 5.1. Análises Estatísticas

A partir dos dados obtidos no Capítulo 5 nos ensaios de MTT e AlamarBlue® das células VERO e M3CT3-E1, foram realizadas análises estatísticas para comparar estatisticamente o comportamento dos controles CPT e CNT, com as células que estiveram em contato com as membranas fibrosas produzidas (PLLA). Todas as análises foram feitas no Software PAST com 95% de confiança.

Foi realizado teste de normalidade (Shapiro-Wilk) para verificar se os dados obedecem à uma distribuição normal, ou seja, verificar se a maioria dos valores obtidos nas amostras estão próximos ao valor médio de todas as amostras. Após a confirmação da normalidade dos dados, pode-se então realizar análises paramétricas como a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey. Foi realizada a ANOVA, pois havia necessidade de comparar 3 variáveis (CNT, CPT e PLLA), seguido do teste Tukey.

Os resultados obtidos nos ensaios MTT e AlamarBlue® das células VERO e M3CT3-E1 foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados com 95% de confiabilidade. Os valores de  $p$ (calculado) devem ser maiores que 0,05 para serem considerados normais.

Todos os ensaios se mostraram dentro da normalidade com valores de  $p > 0,05$ , como pode ser observado na Tabela 4.

<b>Ensaio Biológico</b>	<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tempo (horas)</b>	<b>CNT</b>	<b>PLLA</b>	<b>CPT</b>
<b>AlamarBlue®</b>	<b>M3CT3-E1</b>	24	0,846	0,1639	0,3341
		48	0,9412	0,2181	0,9488
		72	0,2865	0,5204	0,7801
	<b>VERO</b>	24	0,1035	0,2875	0,0947
		48	0,84	0,8275	0,1313
		72	0,897	0,3319	0,5841
<b>MTT</b>	<b>M3CT3-E1</b>	24	0,1796	0,9909	0,962
		48	0,1859	0,0698	0,4137
		72	0,4053	0,7014	0,2315
	<b>VERO</b>	24	0,1279	0,4486	0,7065
		48	0,313	0,2979	0,2876
		72	0,1499	0,3696	0,1612

**Tabela 4** – Teste de normalidade Shapiro-Wilk com os valores de p(calculado) para cada ensaio biológico realizado.

Após a realização do teste de normalidade foi realizada a ANOVA. A ANOVA informa apenas se há diferenças entre as amostras, porém não informa quais as amostra estão diferindo. A Tabela 5 fornece as informações dos valores de p(calculado), onde os valores de p menores que 0,05 confirmam que há diferença significativa entre as amostras. As Tabelas completas da ANOVA estão disponíveis nos Apêndices 2, 3, 4 e 5.

<b>Ensaio Biológico</b>	<b>Linhagem Celular</b>	<b>Tempo (horas)</b>	<b>p(valor)</b>
<b>AlamarBlue®</b>	<b>M3CT3-E1</b>	24	0,01290
		48	0,00000
		72	0,00000
	<b>VERO</b>	24	0,00144
		48	0,00007
		72	0,00002
<b>MTT</b>	<b>M3CT3-E1</b>	24	0,00013
		48	0,00000
		72	0,00049
	<b>VERO</b>	24	0,00015
		48	0,00001
		72	0,00002

**Tabela 5** – Valores de p(calculado) obtidos na ANOVA.

Nota-se na Tabela 5 que todos os valores de  $p$ (calculado) são menores que 0,05, de forma que é possível afirmar que há diferenças significativas entre as amostras em todos os ensaios biológicos realizados.

Uma vez que a ANOVA informa que há diferenças entre as amostras, é realizado o teste Tukey que informa quais amostras diferem. Foram realizadas duas análises, sendo uma delas onde os valores de  $p$  menores que 0,05, e os valores de  $Q_s$  (ou  $Q$  calculado) maiores que o valor do  $Q$  crítico (ou  $Q$  tabelado) (3,95) (DUKE, 2017) são considerados significativamente diferentes.

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos no teste Tukey. Acima da linha diagonal estão apresentados na cor azul os valores de  $p$ , e abaixo da linha diagonal estão apresentados em vermelho os valores de  $Q_s$ . Os dados que deram valores significativos estão ressaltados com a cor cinza de fundo.

M3CT3-E1			24 h			48 h			72 h		
	CNT	PLLA	CPT		CNT	PLLA	CPT		CNT	PLLA	CPT
CNT		0,06353	0,01201	CNT		0,03359	0,000342	CNT		0,000183	0,000183
PLLA	3,733		0,5472	PLLA	4,313		0,008722	PLLA	17,89		0,000183
CPT	5,265	1,532		CPT	9,884	5,571		CPT	37,26	19,37	

AlamarBlue

VERO			24 h			48 h			72 h		
	CNT	PLLA	CPT		CNT	PLLA	CPT		CNT	PLLA	CPT
CNT		0,000184	0,000183	CNT		0,002929	0,000225	CNT		0,001639	0,000187
PLLA	16,33		0,007386	PLLA	6,675		0,02048	PLLA	7,326		0,00335
CPT	22,06	5,733		CPT	11,44	4,766		CPT	13,86	6,534	

---

M3CT3-E1			24 h			48 h			72 h		
	CNT	PLLA	CPT		CNT	PLLA	CPT		CNT	PLLA	CPT
CNT		0,9393	0,000505	CNT		0,8934	0,000183	CNT		0,1642	0,006234
PLLA	0,4787		0,000397	PLLA	0,644		0,000183	PLLA	2,85		0,000583
CPT	9,012	9,491		CPT	18,32	17,68		CPT	5,9	8,751	

VERO			24 h			48 h			72 h		
	CNT	PLLA	CPT		CNT	PLLA	CPT		CNT	PLLA	CPT
CNT		0,8358	0,000411	CNT		0,9975	0,000192	CNT		0,07759	0,000194
PLLA	0,8154		0,000639	PLLA	0,09667		0,000191	PLLA	3,551		0,00047
CPT	9,412	8,597		CPT	13	13,1		CPT	12,71	9,158	

LEGENDA:       $Q_s$  (Q calculado)       $p$ (calculado)

**Tabela 6** – Valores obtidos no teste Tukey.

Visando facilitar a compreensão dos dados da Tabela 6, foi elaborada a Tabela 7, onde os resultados do Teste Tukey estão mostrados de maneira mais simplificada. Ressalta-se que o teste Tukey avalia a diferença entre as amostras para informar quais estão diferindo. São avaliadas as diferenças entre controle negativo e positivo de toxicidade (CNT x CPT), as membranas fibrosas produzidas e o controle positivo de toxicidade (PLLA x CPT) e as membranas fibrosas e o controle negativo de toxicidade (PLLA x CNT).

Ensaio Biológico	Linhagem Celular	Tempo (horas)	CNT x CPT		PLLA x CPT		PLLA x CNT	
			p(calculado)	Qs	p(calculado)	Qs	p(calculado)	Qs
AlamarBlue	M3CT3-E1	24	•	•				
		48	•	•	•	•	•	•
		72	•	•	•	•	•	•
	VERO	24	•	•	•	•	•	•
		48	•	•	•	•	•	•
		72	•	•	•	•	•	•
MTT	M3CT3-E1	24	•	•	•	•		
		48	•	•	•	•		
		72	•	•	•	•		
	VERO	24	•	•	•	•		
		48	•	•	•	•		
		72	•	•	•	•		

**Tabela 7** – Resultados das diferenças entre amostras do teste Tukey.

Analisando os dados da Tabela 7 pode-se afirmar que no ensaio MTT, o CNT e o PLLA se diferenciaram do CPT, mostrando que as células que estiveram em contato com as membranas fibrosas não apresentaram comportamento diferente das células do controle negativo de toxicidade; pode-se assim afirmar que o material não apresentou comportamento tóxico às células, de ambas linhagens estudadas, em ambos modos de análise (p e Qs), para todos os tempos.

Já no ensaio AlamarBlue® pode-se observar que o CNT e o CPT apresentaram diferença em seus comportamentos para ambas as células, em todos os tempos, nos dois modos de análise (p e Qs). Para a avaliação da diferença entre PLLA x CPT pode-se observar que para ambas células houve diferença apenas nos tempos de 48 e 72 h em ambos modos de análise. Na avaliação PLLA x CNT para as células M3CT3-E1 houve

uma diferença em ambos modos de avaliação nos tempos de 48 e 72 h, e para as células VERO houve diferença nos três tempos de ensaio em ambos modos de análise.

Tais diferenças apresentadas no ensaio AlamarBlue® entre PLLA x CNT se dão devido aos desvios padrões das médias estarem cruzando (Figuras 16 e 20). No teste MTT o crescimento das células do controle negativo de toxicidade e o crescimento das células em contato com as membranas fibrosas apresentaram valores próximos, cujas curvas de proliferação se cruzavam (Figuras 15 e 19).

## 5.2. Conclusões

Através do ensaio Shapiro-Wilk pode-se confirmar que os dados obtidos nos ensaios de MTT e AlamarBlue® eram normais, podendo então ser realizadas as análises estatísticas paramétricas como ANOVA e teste Tukey. Com os resultados da ANOVA foi possível notar que havia diferenças entre as amostras, e com os resultados do teste Tukey foi possível avaliar quais amostras diferiam entre si. As células VERO no teste AlamarBlue® apresentaram um comportamento intermediário entre os CPT e CNT; já as células M3CT3-E1 apresentaram um comportamento onde seu desvio padrão se cruzava com os desvio padrão de ambos controles (CPT e CNT) no tempo de 24 h, porém nos tempos de 48 e 72 h as células já apresentavam comportamento intermediário entre os controles. Para o teste MTT é possível notar que ambas as células tiveram comportamento semelhante ao CNT, onde suas curvas de proliferação e seus desvios se cruzam. Desta forma foi possível validar os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* com ajuda das análises estatísticas.

## CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

No Capítulo 7 são apresentadas as principais conclusões deste trabalho e as sugestões para trabalhos futuros a serem realizados a partir desta dissertação.

### 6.1. Conclusões

Os resultados obtidos em todas as análises, tanto nas caracterizações da membrana fibrosa quanto nos ensaios *in vitro* e nas análises estatísticas, demonstraram que as membranas fibrosas de PLLA rotofiado tem potencial como *scaffolds* para serem utilizados na engenharia de tecidos.

Através das avaliações morfológicas foi possível notar que a concentração utilizada foi ideal para a produção de fibras uniformes e constantes, e ao analisar a membrana fibrosa formada foi possível notar o entrelaçamento das fibras, o que forma os poros presentes.

Já nas avaliações químicas do material foi possível afirmar que não há presença de elementos tóxicos ao organismo, e nem grupamentos que ofereçam riscos à saúde.

Nas avaliações térmicas os valores obtidos foram confirmados com valores referências estipulados e estipulados na literatura. Estes valores encontrados demonstram que o material não irá sofrer nenhuma mudança de conformação em suas cadeias ou se degradar ao ser implantado no corpo humano, uma vez que a temperatura corporal é 36°C, podendo variar conforme exposição ao ambiente, ou devido a presença de antígenos que causem febre. No intervalo de variações que o corpo está susceptível, a membrana fibrosa de PLLA produzida se encontra estável.

Quando avaliados os ensaios de cultura celular nota-se que ambas linhagens celulares estudadas (fibroblastos e osteoblastos) tiveram resultados positivos.

De todos os resultados obtidos foi possível concluir até o momento que as membranas fibrosas de PLLA rotofiadas podem ser utilizadas para aplicação na engenharia de tecidos, uma vez que nenhuma das análises de caracterização mostraram pontos desfavoráveis. Com os resultados obtidos na cultura celular e análises estatísticas é possível notar que as membranas fibrosas tem potencial para serem utilizadas como *scaffold*, uma vez que os resultados foram promissores.

## 6.2. Trabalhos Futuros

Levando em consideração os resultados obtidos nesta dissertação, são propostas algumas sugestões para continuidade do trabalho:

1. Avaliação das propriedades mecânicas das membranas fibrosas de PLLA rotofiadas;
2. Avaliação do comportamento reológico das membranas fibrosas;
3. Realização de ensaios de biocompatibilidade *in vivo*;
4. Estudar o comportamento de diferentes linhagens celulares em contato com as membranas fibrosas;
5. Estudar um possível sistema de inclusão de fármacos nas membranas fibrosas produzidas;
6. Conseguir destinar, através de ensaios de afinidade celular, qual melhor aplicação das membranas fibrosas na engenharia de tecidos.

## Referências Bibliográficas

ALCIMED. Société de conseil en Innovation. Regional Analysis of the Biomaterials Market Nord-Pas-De-Calais and Pays De La Loire, FR – South West Germany, GE – Limburg province, NL – East Midlands, UK. *Biomat-IN*. p. 17. Paris, 2011. Disponível em: [http://www.biomatin.eu/pdf/Regional\\_analysis\\_of\\_the\\_biomaterial\\_market.pdf](http://www.biomatin.eu/pdf/Regional_analysis_of_the_biomaterial_market.pdf). Acessado em: 08/11/2016.

ANNETTE, C., RENOUF-G., ROSEB, J., FARRARB, D., CAMERONA, R., "A Degradation Study of PLLA Containing Lauric Acid". *Biomaterials*, v. 26, p. 2415-2422, 2005.

APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; GUASTALDI, A. C. Desenvolvimento de scaffold poroso bioativo de PEUAPM para utilização como biomaterial para reposição e regeneração óssea. *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR*. 2009.

AURAS, R. A.; HARTE, B.; SELKE, S.; HERNANDEZ, R. J. Mechanical, physical, and barrier properties of poly (lactide) films. *Journal of Plastic Film and Sheeting*, v. 19, n. 2, p. 123-135. 2003.

BADROSSAMAY, M. R.; MCILWEE, H. A.; GOSS, J. A.; PARKER, K. K. Nanofiber Assembly by Rotary Jet-Spinning. *Nano Lett.*, v. 10, p. 2257–2261, 2010.

BAKER, S. R.; BANERJEE, S.; BONIN, K.; GUTHOLD, M. Determining the mechanical properties of electrospun poly-ε-caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique. *Materials Science and Engineering C*, v. 59, p. 203–212, 2016.

BINAN, L.; TENDEY, C.; DE CRESCENZO, G.; EL AYOUBI, R.; AJJI, A.; JOLICOEUR, M. Differentiation of neuronal stem cells into motor neurons using electrospun poly-L-lactic acid/gelatin scaffold, *Biomaterials* v. 35, p. 664-674, 2014.

BRITO, T. A. V. Preparação e Caracterização de Nanofibras da Blenda PLLA/PCL obtidas pelos Processos de Eletrofição e Rotofiação. *Dissertação (mestrado)*. Faculdade de engenharia mecânica – Universidade de Campinas, Campinas, 2013.

CANEVAROLO JR. S. V. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo: *Artliber Editora*, ed. 2, 2006.

CURTIS, A. & WILKINSON, C. Topographical control of cells. *Biomaterials*, v. 18, p. 1573-1583, 1997.

DAVACHI, S. M. & KAFFASHI, B. Polylactic acid in medicine. *Polym. Plast. Technol. Eng.*, v. 54, p. 944-967, 2015.

DIAO, H. J.; WANG, K.; LONG, H. Y.; WANG, M.; CHEW, S. Y. Highly Fluorescent and Photostable Polymeric Nanofibers as Scaffolds for Cell Interfacing and Long-Term Tracking. *Advanced Healthcare Materials*, 2016.

DUKE UNIVERSITY - DEPARTMENT OF STATISTICAL SCIENCE. TABLE B.5 - The studentized range statistic (q). Disponível em: <<http://www2.stat.duke.edu/courses/Spring98/sta110c/qtable.html>>. Acessado em: 10 de Maio de 2017.

DVIR, T.; TIMKO, B. P.; KOHANE, D. S.; LANGER, R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology*, v. 6, p. 13-22, 2010.

GENESER, F. Histologia: com bases moleculares. Buenos Aires: Médica Panamericana/Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, ED. 3, p. 157-165, 2003.

GHANAVATI, Z.; NEISI, N.; BAYATI, V.; MAKVANDI, M. The influence of substrate topography and biomaterial substance on skin wound healing. *Anatomy & Cell Biology*, v. 48, p. 251-257, 2015.

HAM, A. W.; CORMACK, D. H. Histologia. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, ed. 8, p. 197, 1983.

HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*, v. 18, p. 703–710. 2004.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century; biology, chemistry or engineering? *Philos Trans A: Math Phys Eng Sci*, v. 362, p. 2821-2850, 2004.

ISO 10993-5 I (E) Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods, 1992.

JAHNO, V. D. Síntese e caracterização do poli (L-ácido-láctico) para uso como biomaterial. *Dissertação (mestrado)*. Escola de engenharia - Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JOSHI, M. K.; PANT, H. R.; TIWARIA, A. P.; MAHARJAN, B.; LIAO, N.; KIM, J. K.; PARK, C. H. ; KIM, C. S. Three-dimensional cellulose sponge: Fabrication, characterization, biomimetic mineralization, and in vitro cell infiltration. *Carbohydrate Polymers*, v. 136, p. 154–162, 2016.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia básica (texto e atlas). Rio de Janeiro – RJ. Editora *Guanabara Koogan LTDA.*, ed. 12, p. 558, 2013.

KIRKPATRICK CJ. A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro. *Biological testing of materials and medical devices*, v. 4, p. 13-32, 1992.

KONTOGIANNOPOULOS, K. N.; ASSIMOPOULOU, A. N.; TSIVINTZELIS, I.; PANAYIOTOU, C.; PAPAGEORGIOU, V. P. Electrospun fiber mats containing shikonin and derivatives with potential biomedical applications, *Int. J. Pharm.* v. 409, p. 216-228, 2011.

KRIKORIAN, V. & POCHAN, D. J. Crystallization Behavior of Poly(L-lactic acid) Nanocomposites: Nucleation and Growth Probed by Infrared Spectroscopy. *Macromolecules*, v. 38, p. 6520-6527, 2005.

- LIM, L.-T.; AURAS, R.; RUBINO, M. Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*, v. 33, p. 820-852, 2008.
- MAHONEYAC, C.; CONKLINB, D.; WATERMANB, J.; SANKARC, J.; BHATTARAIAC, N. Electrospun Nanofibers of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Depolymerized Chitosan for Respiratory Tissue Engineering Applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2016.
- MARKETSANDMARKETS. Biomaterials Market by Type of Material (Metallic, Ceramic, Polymers, Natural Biomaterials) & Application (Cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Neurology, Tissue Engineering, Ophthalmology) - Global Forecast to 2020. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html>, 2015. Acessado em: 08/11/2016.
- MAYER, J.; KARAMUK, E.; AKAIKE, T.; WINTERMANTEL, E. Matrices for tissue engineering-scaffold structure for a bioartificial liver support system. *J Controlled Release*, v. 64, n. 1-3, p. 81-90, 2000.
- MONTANARI, T. Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. Porto Alegre: Ed. da autora, ed. 3, p. 229. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/livrodehisto>. ISBN: 978-85-915646-3-7. 2016.
- MOSSMAM, T.J. A rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MURARIU, M. & DUBOIS, P. PLA composites: From production to properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 107, p. 17-46, 2016.
- NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.*, v. 32, p. 762, 2007.
- NARAYANAN, G.; VERNEKAR, V. N.; KUYINU, E. L.; LAURENCIN, C. T. Poly (lactic acid)-based biomaterials for orthopedic regenerative engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 107, p. 247-276, 2016.
- OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. Netter Bases da Histologia. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 52, 55, 58-59, 67, 69, 132, 147, 166, 2008.
- PATTARO, A. Síntese, Caracterização e Processamento de Polímeros Biorreabsorvíveis para uso na Engenharia de Tecidos (Tissue Engineering). *Tese (doutorado)*. Faculdade de engenharia química – Universidade de Campinas, Campinas, 2016.
- PAWARA, R. P.; TEKALEA, S. U.; SHISODIAA, S. U.; TOTREA, J. T.; DOMB, A. J. Biomedical applications of poly(lactic acid), Recent Patents on Regenerative Medicine. *Science Publishers*, v. 4, p. 44-51, 2014.
- PINTO, M. R.; MARIANO, E. C.; ALBERTO-RINCON, M. C.; DUEK, E. A. R. Análise histológica da blenda PLLA/PCL como prótese de menisco. *Matéria*, v. 14, n.4, 2009.
- PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M. Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mercado. *Química Nova*. v. 38, no. 7, p. 957-971, 2015.

PONGTANAYUT, K.; THONGPIN, C.; SANTAWITEE, O. The Effect of Rubber on Morphology, Thermal Properties and Mechanical Properties of PLA/NR and PLA/ENR Blends. *Energy Procedia*, v. 34, p.888-897, 2013.

REN, L.; OZISIK, R.; KOTHA, S. P.; UNDERHILL, P. T. Highly Efficient Fabrication of Polymer Nanofiber Assembly by Centrifugal Jet Spinning: Process and Characterization. *Macromolecules*, v. 48, p. 2593-2602, 2015.

ROSEMBERG, A. Ossos, articulações e tumores de partes moles. In: Otran, R. S., Kumar, V., Collins, T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 1087-1134, 2000.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. ed. 6, p. 105-164, 2012

SANTORO, M.; SHAH, S. R.; WALKER, J. L.; MIKOS, A. G. Poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 107, p. 206-212, 2016.

SIKAVITSAS, V. I.; TEMENOFF, J. S.; MIKOS, A. G. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. *Biomaterials*, v. 22, p. 2581-2593, 2001.

SILVA, M. R. Padronização de método colorimétrico para avaliação de atividade biológica de substâncias sobre forma taquitozoítas de *Toxoplasma gondii*, com a avaliação de triterpenosácidos sobre o parasito. *Dissertação (mestrado)*. Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

SURRAO, D. C.; WALDMAN, S. D.; AMSDEN, B. G. Biomimetic poly(lactide) based fibrous scaffolds for ligament tissue engineering, *Acta Biomater.*, v. 8, p. 3997-4006, 2012.

WILLIAMS, D. F. (Ed). Definitions in Biomaterials – Biomedical Engineering. *Elsevier*, v. 4, cap. 1, 1987.

YADAV, P.; YADAV, H.; SHAH, V. G.; SHAH, G.; DHAKA, G. Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: a systematic review. *J. Clin. Diagn. Res.*, v. 9, p. 21-25, 2015.

ZAVAGLIA C. A. C.; RODRIGUES, L. R.; DIAS, C. G. B. T.; RODRIGUEZ, G. N. P.; LOMBELLO, C. B.; D'ÁVILA, M. A. Dispositivo Modular de Rotofiação, Método de Operação e Uso. BR n.1020120084040, 2012.

ZHANG, Y.; CHWEE, T. L.; RAMAKRISHMA, S.; HUANG, Z. M. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 16, n. 10, p. 933–946, 2005.

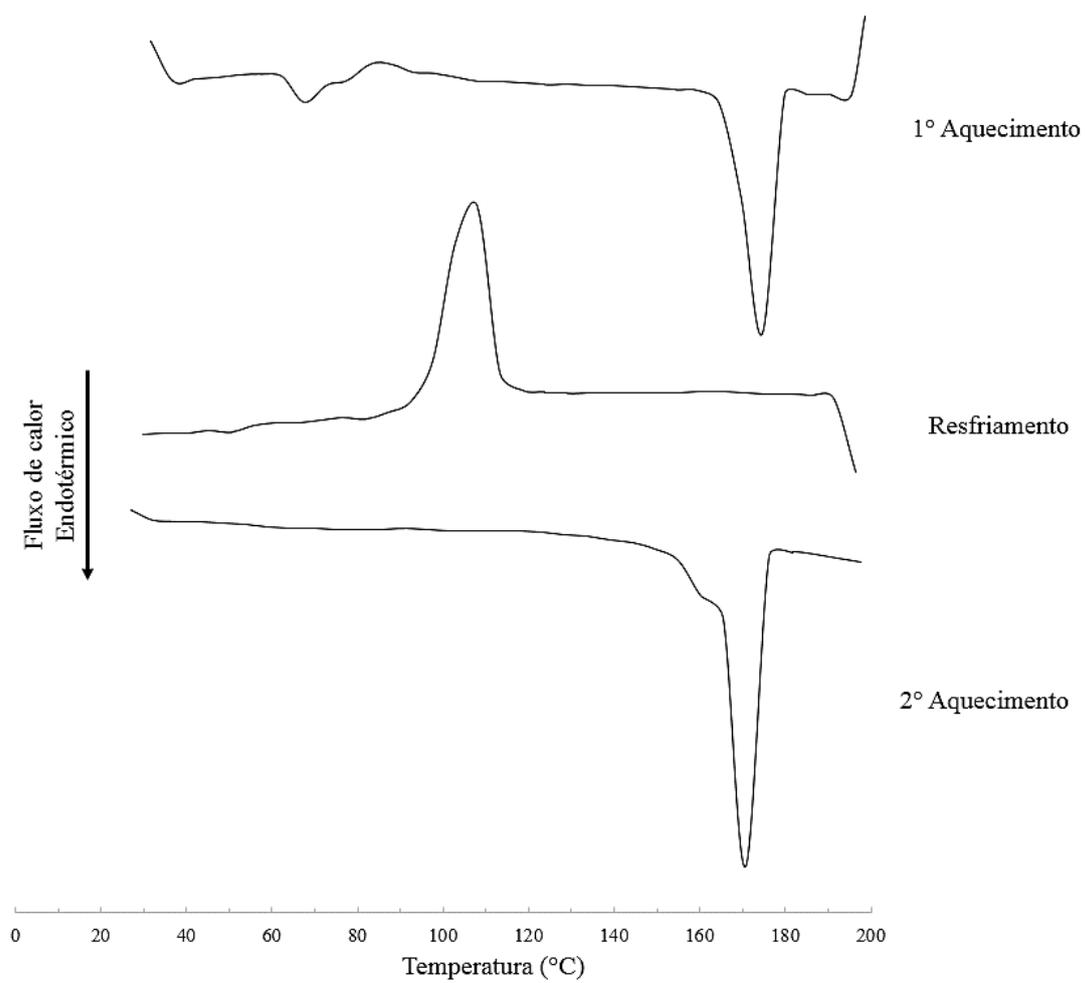
ZHAO, J. H.; HAN, W. Q.; TU, M.; HUAN, S. W.; ZENG, R.; WU, H.; CHA, Z. G.; ZHOU, C. R. Preparation and properties of biomimetic porous nanofibrous poly(l-lactide) scaffold with chitosan nanofiber network by a dual thermally induced phase separation technique, *Mater. Sci. Eng., C Mater.*, v. 32, p. 1496-1502, 2012.

ZHOU, Q.; XIE, J.; BAO, M.; YUAN, H.; YE, Z.; LOU, X.; ZHANG, Y. Engineering aligned electrospun PLLA microfibers with nano-porous surface nanotopography for modulating the responses of vascular smooth muscle cells. *J. Mater. Chem. B.*, v. 3, p. 4439, 2015.

ZUIDEVELD, M.; GOTTSCHALK, C.; KROPFINGER, H.; THOMANN, R.; RUSU, M.; FREY, H. Miscibility and properties of linear Poly(L-lactid)/branched poly(L-lactide) copolyester blends. *Polymer*, v.47, p.3740-3746, 2006.

## APÊNDICES

## Apêndice 1



## Apêndice 2

Tabela ANOVA - AlamarBlue - M3CT3-E1					
24 horas					
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	2,80469E07	2	1,40234E07	7,333	0,0129
Within groups:	1,72103E07	9	1,91226E06		Permutation p (n=99999)
Total:	4,52572E07	11			0,01151
<i>omega</i> <sup>2</sup> :	0,5135				
Levene's test for homogeneity of variance, from means				p (same):	0,7337
Levene's test, from medians				p (same):	0,6901
Welch F test in the case of unequal variances: F=5,39, df=5,827, p=0,0473					
48 horas					
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	3,10257E07	2	1,55128E07	24,55	0,0002265
Within groups:	5,68629E06	9	631810		Permutation p (n=99999)
Total:	3,6712E07	11			9E-05
<i>omega</i> <sup>2</sup> :	0,797				
Levene's test for homogeneity of variance, from means				p (same):	0,2783
Levene's test, from medians				p (same):	0,2924
Welch F test in the case of unequal variances: F=18,37, df=5,196, p=0,004404					
72 horas					
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	F	p (same)
Between groups:	1,14523E08	2	5,72613E07	347,3	3,027E-09
Within groups:	1,4838E06	9	164866		Permutation p (n=99999)
Total:	1,16006E08	11			0,00019
<i>omega</i> <sup>2</sup> :	0,983				
Levene's test for homogeneity of variance, from means				p (same):	0,3407
Levene's test, from medians				p (same):	0,3886
Welch F test in the case of unequal variances: F=423, df=4,567, p=6,544E-06					

## Apêndice 3

Tabela ANOVA - AlamarBlue - VERO					
24 horas					
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	<i>F</i>	<i>p</i> (same)
Between groups:	1,20608E08	2	6,03038E07	131,1	2,212E-07
Within groups:	4,14094E06	9	460104		Permutation <i>p</i> (n=99999)
Total:	1,24749E08	11			0,0002
<i>omega</i> <sup>2</sup> :	0,9559				
Levene's test for homogeneity of variance, from means				<i>p</i> (same):	0,04145
Levene's test, from medians				<i>p</i> (same):	0,0648
Welch <i>F</i> test in the case of unequal variances: <i>F</i> =98,37, <i>df</i> =5,355, <i>p</i> =5,999E-05					
48 horas					
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	<i>F</i>	<i>p</i> (same)
Between groups:	9,37794E07	2	4,68897E07	33,03	7,158E-05
Within groups:	1,27767E07	9	1,41963E06		Permutation <i>p</i> (n=99999)
Total:	1,06556E08	11			0,00012
<i>omega</i> <sup>2</sup> :	0,8422				
Levene's test for homogeneity of variance, from means				<i>p</i> (same):	0,2181
Levene's test, from medians				<i>p</i> (same):	0,2301
Welch <i>F</i> test in the case of unequal variances: <i>F</i> =44,19, <i>df</i> =5,171, <i>p</i> =0,0005607					
72 horas					
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	<i>F</i>	<i>p</i> (same)
Between groups:	1,71227E08	2	8,56136E07	48,08	1,57E-05
Within groups:	1,60269E07	9	1,78077E06		Permutation <i>p</i> (n=99999)
Total:	1,87254E08	11			0,0002
<i>omega</i> <sup>2</sup> :	0,887				
Levene's test for homogeneity of variance, from means				<i>p</i> (same):	0,003529
Levene's test, from medians				<i>p</i> (same):	0,006937
Welch <i>F</i> test in the case of unequal variances: <i>F</i> =151,9, <i>df</i> =4,403, <i>p</i> =8,673E-05					

## Apêndice 4

Tabela ANOVA - MTT - M3CT3-E1					
24 horas					
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	<i>F</i>	<i>p</i> (same)
Between groups:	0,337018	2	0,168509	28,59	0,0001261
Within groups:	0,0530476	9	0,00589418		Permutation <i>p</i> (n=99999)
Total:	0,390066	11			0,00556
<i>omega</i> <sup>2</sup> :	0,8214				
Levene's test for homogeneity of variance, from means				<i>p</i> (same):	0,04699
Levene's test, from medians				<i>p</i> (same):	0,1488
Welch <i>F</i> test in the case of unequal variances: <i>F</i> =134,7, df=4,028, <i>p</i> =0,0002043					
48 horas					
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	<i>F</i>	<i>p</i> (same)
Between groups:	0,367469	2	0,183735	108,1	5,102E-07
Within groups:	0,015299	9	0,00169989		Permutation <i>p</i> (n=99999)
Total:	0,382768	11			0,00346
<i>omega</i> <sup>2</sup> :	0,9469				
Levene's test for homogeneity of variance, from means				<i>p</i> (same):	0,08111
Levene's test, from medians				<i>p</i> (same):	0,2988
Welch <i>F</i> test in the case of unequal variances: <i>F</i> =232,6, df=4,081, <i>p</i> =6,245E-05					
72 horas					
Test for equal means					
	Sum of sqrs	df	Mean square	<i>F</i>	<i>p</i> (same)
Between groups:	0,586042	2	0,293021	19,92	0,0004951
Within groups:	0,132396	9	0,0147107		Permutation <i>p</i> (n=99999)
Total:	0,718439	11			0,00084
<i>omega</i> <sup>2</sup> :	0,7592				
Levene's test for homogeneity of variance, from means				<i>p</i> (same):	0,1042
Levene's test, from medians				<i>p</i> (same):	0,1421
Welch <i>F</i> test in the case of unequal variances: <i>F</i> =36,73, df=4,366, <i>p</i> =0,001858					

## Apêndice 5

Tabela ANOVA - MTT - VERO					
24 horas					
<b>Test for equal means</b>					
	<b>Sum of sqrs</b>	<b>df</b>	<b>Mean square</b>	<b>F</b>	<b>p (same)</b>
<b>Between groups:</b>	2,00752	2	1,00376	27,19	0,0001531
<b>Within groups:</b>	0,33219	9	0,03691		<b>Permutation p (n=99999)</b>
<b>Total:</b>	2,33971	11			0,00387
<b>omega<sup>2</sup>:</b>	0,8136				
<b>Levene's test for homogeneity of variance, from means</b>				<b>p (same):</b>	0,001346
<b>Levene's test, from medians</b>				<b>p (same):</b>	0,008489
<b>Welch F test in the case of unequal variances: F=74,6, df=4,008, p=0,000674</b>					
48 horas					
<b>Test for equal means</b>					
	<b>Sum of sqrs</b>	<b>df</b>	<b>Mean square</b>	<b>F</b>	<b>p (same)</b>
<b>Between groups:</b>	3,36637	2	1,68318	56,75	7,9E-06
<b>Within groups:</b>	0,266958	9	0,029662		<b>Permutation p (n=99999)</b>
<b>Total:</b>	3,63333	11			0,00569
<b>omega<sup>2</sup>:</b>	0,9028				
<b>Levene's test for homogeneity of variance, from means</b>				<b>p (same):</b>	0,005491
<b>Levene's test, from medians</b>				<b>p (same):</b>	0,01627
<b>Welch F test in the case of unequal variances: F=124,1, df=4,001, p=0,0002513</b>					
72 horas					
<b>Test for equal means</b>					
	<b>Sum of sqrs</b>	<b>df</b>	<b>Mean square</b>	<b>F</b>	<b>p (same)</b>
<b>Between groups:</b>	3,79723	2	1,89862	43	2,48E-05
<b>Within groups:</b>	0,397407	9	0,0441563		<b>Permutation p (n=99999)</b>
<b>Total:</b>	4,19464	11			0,00049
<b>omega<sup>2</sup>:</b>	0,875				
<b>Levene's test for homogeneity of variance, from means</b>				<b>p (same):</b>	0,05259
<b>Levene's test, from medians</b>				<b>p (same):</b>	0,2727
<b>Welch F test in the case of unequal variances: F=70,14, df=4,012, p=0,0007564</b>					