Adriana Del Monaco De Maria

**Estudo do revestimento de modelos de stents coronários
biorreabsorvíveis de PLLA com PLDLA/PLGA e ácido
hialurônico.**

Tese apresentada ao Instituto Dante
Pazzanese de Cardiologia – Entidade
Associada à Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências:

Programa de Medicina/Tecnologia e
Intervenção em Cardiologia

Orientador:

Prof. Dr. Aron José Pazin de Andrade

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na biblioteca do IDPC.

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

©reprodução autorizada pelo autor

Del Monaco, Adriana De Maria

Estudo do revestimento de modelos de stents coronários biorreabsorvíveis de PLLA com PLDLA/PLGA e ácido hialurônico / Adriana De Maria Del Monaco.

Tese(doutorado)--Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia Universidade de São Paulo

Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Aron José Pazin de Andrade

Descritores: 1. Biopolímeros. 2. *Stents* Farmacológicos. 3. Implantes Absorvíveis. 4. Materiais biocompatíveis.

DEDICATÓRIA:

Dedico aos meus queridos pais, familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

Aos meus professores, pelo auxílio em momentos muito importantes do nosso trabalho, pelas ideias, pela atenção, pelo carinho, pelas conversas, pela paciência e pelo exemplo de formação e de vida, Profa. Sônia Malmonge e Prof. Aron Andrade pela orientação e melhores conselhos. À Profa. Eliana Duek, Prof. Rodrigo Cunha, Prof. Everaldo Venâncio, Prof. José Carlos Moreira, Prof. Dr. Mario Hirata, à Química Cristina, aos técnicos, Wilson, Marília, Arnaldo, Robson, às secretárias Janeide, Patrícia e Valquíria pela ajuda e pela paciência.

Aos meus pais, Isabel e Magno por tudo o que fizeram por mim até hoje e pelo amor incondicional, ao meu irmão Rodrigo, pelo exemplo de força, dedicação e foco e pelo carinho, companhia e amor, ao meu namorado Gabriel e às minhas irmãs de coração Carolina, Lais, Lívia, Thainara e Sara, pelo apoio, força, carinho, amizade e paciência, e a toda a minha família pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus colegas, do laboratório e da faculdade, aos amigos do CEAC, Rosa, Bruno, Edir, Evandro, Jeison, Pérsio, Gustavo, e da BMEB, Bruno, Fernando, Claudia e Alencar, e aos meus queridos alunos, que tornaram o meu dia a dia muito mais agradável e alegre, além de ser a melhor companhia

possível dentro desta rotina que vivemos. Muito obrigada pelo apoio, pelo carinho e pela paciência de todos.

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein, 1879-1955)

*“Se, a princípio, a ideia não é absurda,
então não há esperança para ela.”*

(Albert Einstein, 1879-1955)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos: *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Referências: adaptado de *International committe of Medical Journals Editors* (Vancouver).

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos

Lista de Siglas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
1.1 A Doença Arterial Coronariana.....	1
1.2 A Angioplastia e o implante de stents.....	3
1.3 Biomateriais empregados na fabricação de stents.....	9
1.4 Biomateriais empregados no revestimento de stents.....	13
1.5 A matriz extracelular e o ácido hialurônico.....	14
1.6 PLDLA e PLGA com imobilização de ácido hialurônico.....	17
1.7 Esterilização.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22

3. MATERIAIS E METODOLOGIA.....	23
3.1 Materiais e equipamentos.....	23
3.2 Metodologia.....	24
3.2.1 Elaboração dos filmes.....	25
3.2.2 Desenvolvimento do revestimento: Enxertia do HA em matrizes de PLGA e PLDLA e confirmação do processo.....	26
3.2.3 Caracterização dos biomateriais.....	28
3.2.3.1 Microestrutura e características superficiais.....	28
3.2.3.2 Avaliação das propriedades térmicas.....	29
3.2.3.3 Avaliação das propriedades mecânicas.....	30
3.2.3.4 Caracterização para confirmação da enxertia de HA e HAADH.....	32
3.2.4 Preparo dos modelos: tubos e placas de PLLA.....	33
3.2.5 Revestimento dos modelos: tubos e placas de PLLA.....	33
3.2.6 Esterilização.....	34
3.2.7 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 Caracterização dos filmes de PLLA, PLDLA e PLGA.....	37

4.1.1 Microestrutura e características superficiais.....	37
4.1.2 Propriedades térmicas.....	43
4.1.3 Propriedades mecânicas.....	55
4.1.4 Confirmação da enxertia de HA: Intumescimento e molhabilidade.	59
 5. DISCUSSÃO.....	 69
5.1 Caracterização e propriedades.....	67
5.2 Esterilização.....	72
5.3 Confirmação da incorporação de HA.....	73
5.4 Considerações finais.....	77
 6. CONCLUSÕES.....	 79
ANEXO A - Gráficos dos resultados dos ensaios de tensão x deformação sob tração.....	 81
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 87

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura química do PLLA; B) PLDLA e C) PLGA (Motta, 2006 e 2007; Martins, 2014).	10
Figura 2: Reação de policondensação do PLLA, a partir do dímero cíclico do ácido láctico, com Sn(Oct) ₂ como catalisador (Motta e Duek, 2006).	12
Figura 3: Estrutura química do ácido hialurônico (Tzellos et al., 2009).	16
Figura 4: Fluxograma das etapas de desenvolvimento do projeto.	25
Figura 5: Corpos de prova empregados no ensaio de tensão x deformação sob tração: A) PLLA; B) PLGA e C) PLDLA (Onde: NE: não esterilizado, UV: esterilizado por ultravioleta e PL: esterilizado por Plasma).	31
Figura 6: Imagens das superfícies dos filmes obtidas por microscopia óptica por luz transmitida (aumento 200x): A) PLLA superfície ar; B) PLLA superfície vidro; C) PLLA superfície ar esterilizada por UV; D) PLLA superfície vidro esterilizada por UV; E) PLLA superfície ar esterilizada por Plasma e F) PLLA superfície vidro esterilizada por Plasma.	39

Figura 7: Imagens das superfícies dos filmes obtidas por microscopia óptica por luz transmitida (aumento 200x): A) PLDLA superfície ar; B) PLDLA superfície vidro; C) PLDLA superfície ar esterilizada por UV; D) PLDLA superfície vidro esterilizada por UV; E) PLDLA superfície ar esterilizada por Plasma; F) PLDLA superfície vidro esterilizada por plasma; G) PLDLA-HA e H) PLDLA-HAADH. 40

Figura 8: Imagens das superfícies dos filmes obtidas por microscopia óptica por luz transmitida (aumento 200x): A) PLGA superfície ar; B) PLGA superfície vidro; C) PLGA superfície ar esterilizada por UV; D) PLGA superfície vidro esterilizada por UV; E) PLGA superfície ar esterilizada por plasma; F) PLGA superfície vidro esterilizada por plasma; G) PLGA-HA e H) PLGA-HAADH. 41

Figura 9: Análises obtidas por espectroscopia FTIR para as amostras apresentadas na legenda. 42

Figura 10: Curvas de TGA para PLLA sem esterilização, PLLA com esterilização por UV e PLLA com esterilização por plasma. 44

Figura 11: Curvas de TGA para PLDLA sem esterilização, PLDLA com esterilização por UV e PLDLA com esterilização por plasma. 45

Figura 12: Curvas de TGA para PLGA sem esterilização, PLGA com 46

esterilização por UV e PLGA com esterilização por plasma.

Figura 13: Curvas de TGA: A) PLDLA controle. B) PLDLA com HA. C) PLDLA com HA e ADH. 47

Figura 14: Curvas de TGA: A) PLGA controle. B) PLGA com HA. C) PLGA com HA e ADH. 48

Figura 15: Curvas de DSC para PLLA sem esterilização, PLLA com esterilização por UV e PLLA com esterilização por plasma. 50

Figura 16: Curvas de DSC para PLDLA sem esterilização, PLDLA com esterilização por UV e PLDLA com esterilização por plasma. 51

Figura 17: Curvas de DSC para PLGA sem esterilização, PLGA com esterilização por UV e PLGA com esterilização por plasma. 52

Figura 18: Curvas DSC: A) PLDLA com HA. B) PLDLA com HA e ADH. 53

Figura 19: Curvas DSC: A) PLGA com HA. B) PLGA com HA e ADH. 54

Figura 20: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: Módulo elástico. 56

Figura 21: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: 56

Tensão na ruptura.

Figura 22: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: 57

Deformação na ruptura.

Figura 23: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: 57

Tensão no escoamento.

Figura 24: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: 58

Deformação no escoamento.

Figura 25: Valores de dureza Shore A dos polímeros PLLA, PLDLA e 59

PLGA antes e após a esterilização por UV e Plasma.

Figura 26: Intumescimento: Valores de % de intumescimento das 60

amostras em água em função do tempo.

Figura 27: Intumescimento: Fotografia dos corpos de prova utilizados 60

no ensaio, no tempo de 3 dias. A) PLGA controle; B) PLGA-HA C) PLGA-HAADH D) PLDLA controle E) PLDLA-HA F) PLDLA-HAADH.

Figura 28: Intumescimento: Microscopia óptica dos corpos de prova 61

utilizados no ensaio, no tempo de 3 dias (aumento 200x). A) PLGA controle; B) PLGA-HA C) PLGA-HAADH D) PLDLA controle E) PLDLA-HA F) PLDLA-HAADH.

Figura 29: Valores médios dos ângulos de contato entre gotícula de água e superfície ar dos polímeros PLLA, PLDLA e PLGA, antes e após esterilização, por UV e Plasma. 63

Figura 30: Valores médios dos ângulos de contato entre gotícula de água e superfície vidro dos polímeros PLLA, PLDLA e PLGA, antes e após esterilização, por UV e Plasma. 63

Figura 31: Valores médios dos ângulos de contato entre gotícula de água e superfície ar e vidro dos polímeros PLGA, PLGA-HA e PLGA-HAADH. 64

Figura 32: Valores médios dos ângulos de contato entre gotícula de água e superfície ar e vidro dos polímeros PLDLA, PLDLA-HA e PLDLA-HAADH. 65

Figura 33: Fotografias dos ângulos de contato entre gotícula de água e superfície vidro dos polímeros A) PLGA controle B) PLGA-HA C) PLDLA controle D) PLDLA-HA E e F) PLGA-HAADH e G) PLDLA- HAADH. 66

Figura 34: A) Fotografia dos tubos de PLLA antes e após o revestimento em comparação com um stent coronário comercial (Cronus® - Scitech); A1) PLLA revestido com PLDLA; A2) stent metálico Cronus®; A3) PLLA revestido com PLGA; A4) stent metálico Cronus® 68

expandido A5) PLLA sem revestimento; B) Estereomicroscopia com medidas do tubo de PLLA sem revestimento.

Figura 35: Reações químicas da metodologia elaborada por Park et al., 2009, para enxertia do HA no PLGA: A) Modificação do HA com ADH B) Adição de NHS ao PLGA C) Formação do PLGA-HAADH. 76

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Valores de espessura em milímetros dos filmes obtidos por evaporação de solvente.	38
Tabela 2: Dados obtidos a partir da curva de TGA: Temperaturas de degradação, para os polímeros estudados e para os polímeros com enxertia de HA.	49
Tabela 3: Dados obtidos a partir da curva de DSC para os polímeros estudados e para os polímeros com enxertia de HA.	55
Tabela 4: Valores de espessura em milímetros dos filmes antes e após o intumescimento.	62
Tabela 5: Valores de espessura, em milímetros, dos filmes, antes e após o revestimento por <i>dip coating</i> .	67

LISTA DE SÍMBOLOS

%T	Transmitância
σ_e	Tensão no escoamento
ε_e	Deformação no escoamento
σ_r	Tensão na ruptura
ε_r	Deformação na ruptura
°	Graus (ângulo)
°C	Graus Celsius (unidade de temperatura)
atm	Atmosferas (unidade de pressão)
cm ⁻¹	Unidade de comprimento de onda
Da	Daltons (unidade de massa atômica)
E	Módulo elástico
h	Horas (unidade de tempo)
kDa	Kilo-Daltons (unidade de massa atômica)
mg	Miligramas (unidade de massa)
min	Minutos (unidade de tempo)
mL	Mililitros (unidade de volume)
mm	milímetros

mmHg	Milímetros de mercúrio (unidade de pressão)
MPa	Mega Pascal (unidade de pressão)
N	Newton (unidade de força)
nm	Nanômetros (unidade de comprimento)
Pa	Pascal (unidade de pressão)
T _c	Temperatura de cristalização
T _f	Temperatura de fusão
T _g	Temperatura de transição vítrea
x	por

LISTA DE SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADH	Dihidrazida adípica
BMS	Stent metálico (<i>Bare metal stents</i>)
BVS	Stent biorreabsorvível (<i>Bioresorbable vascular scaffold</i>)
CEAC	Centro de Engenharia em Assistência Circulatória
CO ₂	Dióxido de carbono
CPs	Corpos de prova
DAC	Doença arterial coronariana
DCC	N,N-diciclohexil carbodiimida
DES	Stent farmacológico (<i>drug eluting stent</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
DSC	Análise térmica diferencial de varredura (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EtO	Óxido de etileno

FTIR	Espectrometria infra-vermelho por transformada de Fourier
GAGs	Glicosaminoglicanos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HA	Ácido hialurônico (<i>hyaluronic acid</i>)
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
ISO	<i>Organização Internacional para Normatizações</i> (<i>International Organization for Standardization</i>)
LB	Luria Bertami
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (<i>low density lipoproteins</i>)
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MM	Massa molecular
MO	Microscopia óptica
NE	Não esterilizado
NHS	<i>N-Hidroxysuccinimida</i>
PBMA	Poli(n-butil metacrilato)
PC	Poli(fosforilcolina)

PCL	Poli(caprolactona)
PEG-NH ₂	Poli(etilenoglicol)-amida
PEI	Poli(etilenoimina)
PEVA	Poli(etileno-co-vinilacetato)
PGA	Poli(ácido glicólico)
pH	Potencial hidrogeniônico
PHBV	Poli(hidroxi–butirato–co-valerato)
PLA	Poli(ácido lático)
PLDLA	Poli(L-D-ácido lático)
PLDLA-HA	Poli(L-D-ácido lático)-ácido hialurônico
PLDLA-HAADH	Poli(L-D-ácido lático)-ácido hialurônico-ADH
PLDLGA	poli(L-D-ácido lático-co-ácido glicólico)
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PLGA-HA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)-ácido hialurônico
PLGA-HAADH	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) -ácido hialurônico-ADH
PLLA	Poli(L-ácido lático)
PSIBS	Poli(estireno-b-isobutileno-b-estireno)

PUC-SP	Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
PVDF-HFP	Poli(vinilideno fluorido hexafluorpropileno)
PVP	Poli(vinilpirrolidona)
SCA	Síndrome coronariana aguda
Sn(Oct) ₂	2-etil-hexanoato de estanho II
TGA	Análise termogavimétrica (<i>Termogavimetric analysis</i>)
UFABC	Universidade Federal do ABC
UV	Ultra violeta

Resumo

Del Monaco, A, D M.: Estudo do revestimento de modelos de stents coronários biorreabsorvíveis de PLLA com PLDLA/PLGA e ácido hialurônico. Tese (Doutorado) – Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A doença arterial coronariana vem sendo a maior causa de mortalidade no mundo, a angioplastia com implante de stent é uma estratégia importante nestes casos. Estudos apontam a biodegradabilidade, imobilização de antiproliferativos e moléculas bioativas nos stents, como características das futuras gerações destes dispositivos. Dentre estas, o ácido hialurônico contribui para a diminuição da agregação e proliferação de células entre as camadas da artéria e o dispositivo implantado. Foram desenvolvidos modelos de stents coronários biorreabsorvíveis de poli(-L-ácido láctico) (PLLA) com enxertia de ácido hialurônico (HA) em poli(-ácido láctico co-ácido glicólico) (PLGA) e poli(L-D-ácido láctico) (PLDLA). Os modelos foram caracterizados quanto suas propriedades térmicas, mecânicas e de superfície. O PLDLA e PLGA com enxertia de HA modificado com dihidrazida adípica (ADH) apresentaram características de superfície mais hidrofílicas, ideais para material de revestimento dos dispositivos. Desta forma, este trabalho possibilitou o desenvolvimento dos modelos físicos biorreabsorvíveis, com dimensões semelhantes aos stents coronários, feitos de PLLA, revestidos com PLGA e PLDLA com enxertia de HA e HAADH, e estáveis aos processos de esterilização por radiação ultravioleta e plasma de peróxido de hidrogênio.

Palavras chave: Biopolímeros, stents biorreabsorvíveis, PLDLA, PLGA, HA.

Abstract

Del Monaco, A D M.: Study of bioresorbable coronary PLLA stents models coating with PLDLA/PLGA and hialurônico acid. – Dante Pazzanese Institute of Cardiology, São Paulo University, São Paulo, 2017.

Coronary artery disease has been world's leading cause of death and angioplasty stent implantation is an important strategy in these cases. Studies indicate that the biodegradability, immobilization of antiproliferatives and bioactive molecules in stents are characteristics of future generations of these medical devices. Amongst them, hyaluronic acid (HA) contributes to the decrease of the aggregation and proliferation of cells between artery layers and implanted device. For this purpose, poly (L-lactic acid) (PLLA) bioresorbable coronary stents with HA grafting in poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) and poly (LD- (PLDLA) were developed. The models were characterized as their thermal, mechanical and surface properties. PLDLA and PLGA with adipic dihydrazide (ADH) modified HA grafting presented more hydrophilic surface characteristics, ideal as coating material of this devices. This project allowed the development of bioresorbable physical models with similar dimensions to coronary stents, made of PLLA, coated with PLGA and PLDLA with hyaluronic acid grafting, stable to ultraviolet radiation and plasma sterilization with hydrogen peroxide processes.

Describers: Polimeric biomaterials, Bioresorbable stents, PLDLA, PLGA, HA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 A Doença Arterial Coronariana.

A doença arterial coronariana (DAC) continua sendo a principal causa de mortalidade no mundo, e no Brasil não é diferente, sendo responsável por 29,4% das mortes por ano em todo país. Estes dados colocam o país entre os 10 com maior taxa de mortalidade devido à DAC. Principalmente nas regiões mais desenvolvidas, vem sendo registrada uma pequena redução no número de casos, porém essa redução se deve à adoção de hábitos de vida mais saudáveis, melhor controle dos fatores de risco e maior conhecimento da fisiopatologia da doença (Abu-Assi et al., 2015; Gomes, 2016; Lotufo e Lolio, 1994; Mansur et al., 1996; Pyörälä et al., 1994).

A DAC é uma patologia multifatorial e seu perfil inflamatório foi bem traçado nas últimas décadas, assim como o conhecimento sobre o papel da inflamação na patogênese da aterosclerose coronariana e nas síndromes coronarianas estáveis e instáveis. O processo é acompanhado de aumento do transporte da LDL colesterol, da língua inglesa *low density lipoprotein*, que são lipoproteínas de baixa densidade, para a camada íntima arterial, seguindo-se do acúmulo dessas lipoproteínas, e formação de partículas e micelas compactas ou vesículas maiores denominadas de lipossomos extracelulares. O efeito citotóxico das lipoproteínas ocasiona disfunção endotelial, traduzindo-se em hiperplasia da lâmina basal a qual se destaca do endotélio e, ainda, proliferação e reorganização da matriz extracelular. Outra consequência do efeito citotóxico é o estímulo do endotélio para a produção e liberação de quimiotáticos e moléculas de adesão para leucócitos na superfície endotelial.

Assim, este acúmulo de células mononucleares é modulado pelo excesso de LDL colesterol na região subendotelial, que gera a expressão de marcadores inflamatórios e de adesão no endotélio vascular. Este ambiente inflamatório promove migração e proliferação de células musculares lisas e a formação de tecido fibroso na lesão, que se torna coberta por uma cápsula fibrosa revestindo o núcleo lipídico e o tecido necrótico (Entman e Ballantine, 1993; Libby et al., 1996; Morel et al., 1984; Ross, 1999; Simionescu et al., 1990).

O perfil inflamatório possibilita a identificação de diversos marcadores para a DAC, sendo os mais utilizados: Proteína C Reativa, homocisteína, ácido úrico, fibrinogênio e até o aumento do número de leucócitos no sangue periférico. Além do perfil inflamatório, existem vários fatores de risco que determinam a multifatorialidade da DAC, entre eles os principais são: tabagismo, dislipidemias, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, e antecedentes familiares, sedentarismo e ansiedade (Cannon et al., 2001; Friedman et al., 1974).

Além da multifatorialidade, pode-se classificar a fisiopatologia da DAC em alterações vasculares coronárias derivadas de três componentes fundamentais: o primeiro é a disfunção endotelial, que se instala precocemente, com alteração da reatividade do vaso; o segundo a perda das propriedades antitrombóticas naturais e da permeabilidade seletiva do endotélio; o terceiro é a obstrução da luz do vaso pela placa aterosclerótica e complicação trombótica no local da lesão. Todos são capazes de causar DAC, mas frequentemente ocorrem ao mesmo tempo (Da Luz et al., 1999; Sionis et al., 2015).

A DAC causa um desequilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio pelo miocárdio e consequentes alterações em qualquer ponto da circulação

coronária, desde a origem das artérias coronárias até distúrbios da microcirculação, gerando isquemia. A principal causa de insuficiência coronariana é a redução do fluxo coronário em consequência de um obstáculo fixo causado por uma placa aterosclerótica nos vasos. Uma redução de 50% na área do lúmen vascular, associada a um aumento importante do consumo de oxigênio já é suficiente para provocar isquemia miocárdica, que será, geralmente, manifestada por *angina pectoris* para esforços, e sua intensidade pode variar quanto maior for a redução do lúmen vascular (Braunwald, 2005).

O paciente que apresenta síndrome coronariana aguda (SCA) é clinicamente classificado como correspondente a pelo menos um episódio de angina em repouso, por mais de 20 minutos, e eletrocardiograma com alterações indicativas de DAC: como inversão da onda T, indicativo de isquemia, supra-desnívelamento do segmento ST, indicativo de corrente de lesão e surgimento da onda Q, de necrose celular. Já o paciente com DAC crônico é clinicamente identificado como aquele que possui alterações em exames coronariográficos nos últimos seis meses e angina estável (Esteban-Torrella et al., 2015; Hernández et al., 2015; Souza et al., 2008).

1.2 A Angioplastia e o implante de stents.

A angioplastia é um procedimento realizado de forma minimamente invasiva, como tratamento indicado para desobstrução de artérias coronárias com estenose. O acesso é realizado via cateterismo, onde a insuflação de um balão, por dentro da placa de ateroma, contra as paredes do vaso, desobstruindo a artéria lesada e restabelecendo o fluxo sanguíneo. Esta

técnica baseia-se na possibilidade de regressão do um estreitamento aterosclerótico, que foi observada ocasionalmente por Dotter na década de 60, onde o restabelecimento do fluxo de uma artéria ilíaca ocorreu pela passagem de um cateter diagnóstico. O fenômeno observado deu origem ao conceito de dilatação vascular para tratamento de estenoses (Gottschall, 2009; Shepherd et al., 1987).

Após o desenvolvimento do cateter balão, sua utilização em angioplastia foi sendo aprimorada nos anos seguintes para aplicações em lesões periféricas. No ano de 1974, o engenheiro Hopff desenvolveu balões com materiais de diferentes complacências e trabalhou na sua miniaturização, o que possibilitou sua aplicação em angioplastia coronariana. Já em 1976, foram realizados os primeiros procedimentos em humanos, com a equipe de Gruentzig, nos Estados Unidos (Gottschall, 2009; Shepherd et al., 1987).

Uma grande questão enfrentada neste tipo de tratamento são os casos de reestenose recorrente, processo semelhante ao da estenose, descrito no item 1.1. Este processo ocorre de forma que a agregação plaquetária, a proliferação celular e o remodelamento negativo da artéria acabam por obstruir, novamente, a passagem do sangue pelo vaso. Isto pode ocorrer tanto de forma aguda, dias após o procedimento, quanto até 6 meses após, ou mais. Por anos, a reestenose representou um dos maiores desafios a serem superados na angioplastia transluminal coronária. Dentro deste cenário, a agregação plaquetária pode ser tratada clinicamente, com a administração de medicamentos antiagregantes, tais como Ácido Acetilsalicílico (AAS – Bayer®) e o Bissulfato de Clopidogrel (Sanofi-Aventis®). Já o problema do remodelamento negativo pode ser solucionado mecanicamente, com a

utilização dos stents (Myler e Stertz, 1994; Newby e Zaltsman, 2000; Shepherd e Vlieststra, 1987; Wolf et al., 1996).

Assim, desde os anos 80, a angioplastia com implante de stent é uma estratégia importante no tratamento da SCA que revolucionou a cardiologia intervencionista (Sigwart, 2007).

O nome destes dispositivos é uma referência ao Dr. Charles Stent, cirurgião dentista inglês, que desenvolveu em 1856 uma liga metálica para uso em odontologia. Em 1916, uma equipe de cirurgiões plásticos holandeses utilizou este material na composição de um suporte para crescimento de tecido em uma reconstrução facial, assim, nomearam o dispositivo em homenagem ao seu idealizador. Desta maneira, os stents, começaram a ser definidos como suportes para crescimento de tecidos e se tornaram comuns em diversas áreas da medicina, como urologia e gastroenterologia. O conceito de stent na medicina estava relacionado a suporte para crescimento de tecidos, porém, não necessariamente em forma de tubo. A ideia de um suporte tubular para uso em cardiologia surgiu em 1966 e somente na década de 80, o dispositivo stent chegou à cardiologia intervencionista. Na cardiologia, ganhou grande importância com diversas aplicações na desobstrução de artérias: carótidas, ilíacas, periféricas, coronárias e até nas valvoplastias, com stents valvados (Gottschall, 2009; Mani et al., 2007; Myler e Stertz, 1994).

Uma das primeiras experiências foi o implante de stents metálicos expansíveis pela equipe de Palmaz e colaboradores em 1984, que utilizou dispositivos de aço inoxidável contidos por uma membrana, removida após o posicionamento do mesmo no interior da placa de ateroma, antes da expansão

com o balão. Este processo foi um passo muito importante no tratamento das coronariopatias. O primeiro implante de stent coronário no Brasil foi realizado em 1987, no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), pela equipe liderada pelo Dr. José Eduardo Sousa (Abizaid, 2011; Sigwart, 2007; Taylor, 1994).

Iniciava-se a era dos stents metálicos, da língua inglesa: *bare-metal stents* (BMS), que solucionaram a questão do remodelamento negativo, reação sofrida pelas artérias à dilatação com o balão. Porém, o processo de reestenose ainda não estava totalmente controlado, pois não havia, no dispositivo, nenhuma forma de tratamento para a hiperplasia intimal, ou seja, a proliferação celular devida ao processo inflamatório local causado pela própria coronariopatia, e acentuado pela presença do stent (Sigwart, 2007; Taylor, 1994).

Este processo só foi modificado com o uso de fármacos antiproliferativos associados ao dispositivo, por meio do revestimento com materiais biocompatíveis carregadores de drogas. Yamawaki e colaboradores foram os primeiros a realizar a incorporação de moléculas com efeito antiproliferativo em stents implantados em modelo porcino, mostrando esta associação como um dos mais importantes fatores no desenvolvimento das gerações futuras destes dispositivos, que se mantém até os dias de hoje (Colombo et al., 2003; Yamawaki et al., 1998; Zurakowski et al., 2015).

Surge então, a segunda geração de stents, os farmacológicos, da língua inglesa: *drug-eluting stents* (DES). Diversos tipos de medicamentos antiproliferativos podem ser utilizados: Rapamicina (Sirolimus - Pfizer®),

Everolimus (Afinitor - Novartis®), Zotarolimus (ABT-578 - Endeavor®), Paclitaxel (Taxol - BMS®). Estes são depositados ou incorporados em uma matriz polimérica que reveste o stent metálico, geralmente constituída de polímeros da família dos poli(-ácidos lácticos). Em 1999, foi realizado o primeiro implante em humano de um stent revestido no mundo, com Sirolimus, no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, equipe comandada também pelo Dr. José Eduardo Sousa (Abizaid, 2011; Martin e Boyle, 2011; Pendyala et al., 2009; Sigwart, 2007).

Em outubro de 2006, Nordman e colaboradores apresentaram uma meta-análise indicando a maior mortalidade nos pacientes submetidos a implante de stents revestidos em relação aos metálicos, de 0,6% ao ano. Porém, em 2008, Mauri e colaboradores demonstraram o contrário, relacionando o aumento encontrado no estudo anterior com o retardo no processo de endotelização devido à presença dos antiproliferativos no revestimento do stent. Esta questão ainda continua, e acaba por ser potencializada pela chegada da terceira geração de stents, os biorreabsorvíveis (Colombo et al., 2003; Mauri et al., 2008; Nordmann et al., 2006).

Os primeiros stents biorreabsorvíveis, da língua inglesa *bioresorbable vascular scaffold* (BVS), foram desenvolvidos por Tamai e colaboradores, no início dos anos 2000. São feitos de materiais poliméricos biocompatíveis e biorreabsorvíveis. Os principais polímeros utilizados no desenvolvimento de stents biorreabsorvíveis são os mesmos utilizados no revestimento dos stents farmacológicos, são eles Poli(L-ácido láctico) e Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLLA e PLGA). Os stents biorreabsorvíveis são dispositivos temporários que oferecem suporte mecânico transitório, além da incorporação

de antiproliferativos, como nos de segunda geração, sendo totalmente degradados e absorvidos pelo organismo em um tempo médio de 2 a 3 anos. Mesmo período indicado por Nordman, em 2006, como de maior mortalidade para os pacientes com implantes de stents farmacológicos (Abizaid et al., 2015; Farag et al., 2016; Nordmann et al., 2006; Onuma et al., 2011; Tamai et al., 2000).

A revisão feita por Mani e colaboradores aponta diversos focos a serem buscados no desenvolvimento de stents: hemocompatibilidade, hidrofobicidade, propriedades anti-inflamatórias, conformabilidade de superfície, fácil esterilização, imobilização de fármacos, e por fim, apontam a biodegradabilidade como uma das principais propriedades das futuras gerações destes dispositivos. Os primeiros stents biorreabsorvíveis comercializados foram os do laboratório Abbot® em 2011 e liberados para uso no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2014, e os primeiros procedimentos de implante destes dispositivos foram realizados pela equipe do Dr. Alexandre Abizaid, também no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (Abizaid et al., 2015; Giessen et al., 1996; Kraak et al., 2015; Lakovou et al., 2005; Lincoff et al., 1997; Mani et al., 2007; Newby et al., 2000; Onuma et al., 2011; Taylor et al., 1996; Zurakowski et al., 2015).

1.3 Biomateriais empregados na fabricação de stents.

Biocompatibilidade implica na aceitação de um implante pelos tecidos vizinhos e pelo organismo de um modo geral, devendo este, ser compatível química e funcionalmente. A maioria dos tecidos vivos estruturais são compostos macromoleculares, por isso os compostos poliméricos sintéticos

são bastante atrativos para o desenvolvimento de novos biomateriais (Cheng e Pun, 2015; Feng et al., 1983; Shogren, 1997).

Os biomateriais têm conquistado atenção clínica nas últimas décadas devido à sua aceitação em organismos vivos e têm sido usados como elementos de fixação, em biomateriais para reposição de ossos, como fios de sutura e matrizes de encapsulamento de fármacos em sistemas de liberação controlada (Lin et al., 2003; Schneider, 1972; Sodergard et al., 2002; Slomkowski et al., 1998; Uhrich et al., 1999; Vert et al., 1981).

A primeira geração de stents metálicos (BMS) é composta de aço 316L, ou de uma liga de cromo e cobalto. Esta última possui melhor biocompatibilidade devido a menor quantidade de níquel em comparação aos de aço (Khan et al., 2012; Lange et al., 2010; Yin et al., 2014), são exemplos:

- Cypher[®] (Cypher Select[®] - Cordis Corporation, FL, USA).
- Taxus[®] (Express/ Liberté[®] - Boston Scientific, MA, USA).
- Endeavor[®] (Resolute[®] - Medtronic, MN, USA).
- Xience V[®] (Xience PRIME[®]; Abbott Laboratories, IL, USA).
- Promus[®] (Promus Element[®], Boston Scientific MA, USA).

Outros materiais também são utilizados, como Nitinol, da língua inglesa: *Nickel Titanium-Naval Ordnance Laboratory*, uma liga que contém Níquel e Titânio e possui memória de forma, ou uma liga de Cromo e Platina utilizada em dispositivos (Khan et al., 2012, Mani et al., 2007):

As plataformas biorreabsorvíveis surgiram com os stents de Tamai, 2000. Dentre os polímeros biorreabsorvíveis mais utilizados destacam-se: poli(L-ácido lático) (PLLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e poli(L-D-ácido lático) (PLDLA), cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura

1. Os monômeros têm disponibilidade comercial como matéria prima e já possuem normatização adotada para uso na área biomédica.

Figura 1: A) Estrutura química do PLLA B) PLDLA C) PLGA (Motta, 2007 e 2006; Martins, 2014)

Estes biomateriais têm sido utilizados a mais de três décadas tanto por sua biocompatibilidade quanto pelas propriedades não imunogênicas e não tóxicas. Ao se degradarem, geram como produto o ácido lático que é um composto natural presente em todos os animais (Vert et al., 1981).

A condição mais importante para a biodegradação dos sistemas poliméricos é a presença de ligações hidrolisáveis e/ou oxidáveis ao longo da cadeia principal. A taxa de hidrólise é dependente da composição e comprimento da sequência, além de fatores como cristalinidade e orientação das cadeias do polímero (Lostocco et al., 1998). Por definição na língua portuguesa, os termos “Bioabsorvível” e “Biorreabsorvível” se diferem conceitualmente. O primeiro representa a classe de materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer

clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição da sua massa molecular, como o caso do ácido hialurônico, por exemplo. Já o segundo trata dos materiais poliméricos que apresentam degradação por meio da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*, além de serem totalmente eliminados e seus subprodutos de degradação, sem efeitos colaterais ou alterações metabólicas, ou seja, participam diretamente em algum momento da respiração celular, por exemplo: glicólise, ciclo de Krebs, cadeia respiratória, fosforilação oxidativa. Desta forma, são metabolizados pelas células. Como exemplos, tem-se: PLLA, PLGA e PLDLA (Duek et al., 1999).

Stack e colaboradores foram os primeiros a realizar implantes de stents biorreabsorvíveis em modelos animais experimentais feitos de PLLA. Por outro lado, Colombo e colaboradores apresentaram algumas restrições à utilização de alguns materiais para confecção dos stents biorreabsorvíveis: O poli(ácido glicólico) (PGA) está bastante associado à formação de trombos; Os poli(L-D-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLDLGA), Poli(caprolactona) (PCL), poli(hidroxi-butirato-co-valerato) (PHBV) e poli(ortoester) estão associados a importantes respostas inflamatórias, com proliferação neointimal, extensiva infiltração de leucócitos, linfócitos, monócitos e eosinófilos além de células multinucleadas gigantes e evidências de necrose e formação de pseudoaneurismas (Lincoff et al., 1997; Stack et al., 1998; Susawa et al., 1993; Zurakowski et al., 2015).

Lincoff e colaboradores demonstraram que os stents fabricados com PLLA de baixa distribuição de massa molar (~80 kDa) apresentavam uma maior resposta inflamatória do que os feitos com PLLA de maior distribuição de massa molar (~321 kDa), além de O'Brien e colaboradores apontarem este

material como grande promissor para esta aplicação (Charpentier et al., 2015; Lincoff et al., 1997; O'Brien et al., 2015). Devido a esta questão, para o presente trabalho, foi utilizado o PLLA, gentilmente cedido pelo Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP), sintetizado por abertura de anel do dímero cíclico do ácido láctico, ao invés da técnica de policondensação direta do ácido láctico. Desta forma, obtém-se uma distribuição de massa molar mais elevada, a reação pode ser observada na Figura 2. Para esta, o catalisador utilizado é o 2-etil-hexanoato de estanho II ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), liberado para o uso médico pelos órgãos regulatórios (Motta 2006, Rezende et al., 2013).

Figura 2: Reação de polimerização do PLLA, a partir do dímero cíclico do ácido láctico, com $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ como catalisador (Motta & Duek, 2006).

O PLDLA para este trabalho também foi cedido pelo Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo e foi sintetizado por polimerização em massa por abertura de anel, catalisada também pelo $\text{Sn}(\text{Oct})_2$. Os monômeros L lactato e D, L lactato apresentam a proporção 70:30. E o PLGA foi obtido comercialmente, apresentando grau médico.

1.4 Biomateriais empregados no revestimento de stents.

A geração de stents farmacológicos utiliza estratégias para liberação de fármacos antiproliferativos, como os citados no item 1.2. As tecnologias de alteração de superfície dos stents podem ser, desde o tratamento do material com técnicas de ataque químico, eletrolítico, para a formação de poros, micro e nanoestruturados para melhorar a interface implante-tecido, até o recobrimento com metais, como ouro, e polímeros. Estes últimos são importantes, pois, com o revestimento, a plataforma metálica não entra em contato com o sistema biológico, ocorrendo uma redução no número de casos de reestenose.

Os polímeros para o revestimento de stents podem ser divididos em não biodegradáveis e bioabsorvíveis ou biorreabsorvíveis. Seguem os exemplos de materiais não biodegradáveis (Garg et al., 2010; Parker et al., 2011; Tamburino et al., 2009, Tan et al., 2013; Yin et al, 2014):

- Poli(fosforilcolina) (PC) (Endeavor[®]stent, Medtronic).
- Poli(vinilpirrolidona) (PVP) (BioLinx polymer system).
- Poli(etileno-co-vinilacetato) (PEVA) e Poli(n-butil metacrilato) (PBMA) (CYPHER[®] stent, Cordis).
- Poli(estireno-b-isobutileno-b-estireno) (PSIBS) (TAXUS[®]stent, Boston Scientific).
- PBMA e (vinilideno fluorido hexafluorpropileno) (PVDF-HFP) (Xience V[®]stent, Abbott Vascular; PROMUSTM Element[®], Boston Scientific).

Já os polímeros biorreabsorvíveis continuam em processo de estudo e aprovação pela agência regulatória norte americana *Food and Drug*

Administration (FDA), são eles (Abizaid, 2011; Garg et al., 2010; Parker et al., 2011; Tamburino et al., 2009; Yin et al, 2014):

- Poli(ácido láctico) (PLA), Poli(vinilpirrolidona) PVP, PCL e Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (Supralimus181 e Infinnium 181 stent, Sahajanand Medical Technologies®).
- Poli(L-ácido láctico) (PLLA) (Excel® stent, JW Medical System).
- poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) (Inspiron®, Scitech).

Desta forma, para o presente trabalho foram utilizados 3 polímeros distintos, com o objetivo de obtenção de um protótipo de stent composto por uma estrutura central mais rígida. Sendo o PLLA, de elevada distribuição de massa molar, utilizado na confecção desta mesma, que deverá apresentar maior resistência à solicitação mecânica, e os polímeros PLDLA e PLGA empregados para o revestimento onde ocorrerá a imobilização das moléculas de HA. Inicialmente o projeto avaliaria apenas o PLGA, porém, durante sua execução o PLDLA tornou-se, também, um potencial alvo deste estudo, e foi, desta forma, incluído nas avaliações.

1.5 A matriz extracelular e o ácido hialurônico.

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura que surgiu evolutivamente, a partir dos organismos pluricelulares, com a função de promover a estruturação dos tecidos, conferindo flexibilidade entre as células. Seus componentes principais são os glicosaminoglicanos (GAGS): proteínas unidas covalentemente a cadeias de polissacarídeos conhecidas como proteoglicanos; as proteínas fibrosas, como colágeno e elastina; e adesivas, como fibronectina

e laminina (James, 2005; Stevens, 2013). Variações na organização e composição destes componentes dão a conformidade específica de acordo com as propriedades necessárias de cada tecido. Assim, a matriz pode assumir importantes papéis na diferenciação, proliferação, migração e função celular (Turner et al., 1989).

Dentre os mais importantes componentes da MEC, está o ácido hialurônico, da língua inglesa *hyaluronic acid* (HA), que está presente em praticamente todos os tecidos e fluidos de organismos superiores, como no cordão umbilical, no líquido seminal, na cartilagem, entre outros. Sua estrutura química pode ser encontrada na Figura 3. Nos mamíferos, cerca de 50% de todo HA é encontrado nas camadas logo abaixo da epiderme (Cheng et al., 2011). Os polímeros de HA são sintetizados no lado citossólico da membrana celular pela enzima hialuronan-sintase. O processo de translocação dos polímeros de HA através da membrana celular não foi descrito na literatura, estas moléculas apresentam características bastante hidrofílicas (Hubbart et al., 1997).

Figura 3: Estrutura química do ácido hialurônico (Tzellos et al., 2009)

O HA é um glicosaminoglicano que está relacionado diretamente à diversas funções, entre elas a adesão e migração de leucócitos nos tecidos conectivos, principalmente linfócitos-T, que são importantes mediadores da resposta imunológica. Assim, o HA pode ter um papel importante na função das células T e sua interação com outros tecidos, principalmente durante o processo inflamatório (Evanko et al., 2012; Tzellos et al., 2009).

O HA é um dos compostos que atua como lubrificante no líquido sinovial. Estudos *in vitro* demonstraram que sua presença melhora a capacidade dos condrócitos de produzir matriz extracelular (Bland et al., 1984; McGinty, 1996). Portanto, o HA está diretamente relacionado a várias propriedades essenciais para a manutenção do equilíbrio homeostático e metabólico, atuando na circulação de nutrientes, hormônios e outros sinalizadores químicos (Junqueira et al., 2008). O HA desempenha um papel importante na cicatrização e participa da fixação das células e dos eventos de sinalização através da interação com os receptores da superfície celular. Outro aspecto explorado do HA, entre outros polissacarídeos carregados negativamente (tais como a heparina), é que eles também não apresentam atividades trombogênicas e têm sido bastante utilizados como agentes anticoagulantes. Assim, o HA apresenta interessantes resultados quando utilizado como material de revestimento de dispositivos para diminuir a agregação plaquetária, coagulação e deposição de plaquetas sobre um material.

Hidrogéis à base de polissacarídeo foram previamente utilizados por Thebaud e colaboradores para proporcionar suporte para MEC. Devido às suas características antiaderentes, o HA é um biomaterial adequado para reduzir a adesão de células nos dispositivos implantados. O HA pode ser encontrado nos

tecidos vasculares e próteses de válvulas cardíacas, com significativo potencial para produzir materiais biocompatíveis para engenharia de tecidos cardiovasculares. Além disso, por ser carregado com cargas negativas, pode ser facilmente integrado em camada por camada, para o revestimento de superfícies de dispositivos (Park et al., 2009).

Por fim, devido ao HA ser um importante componente a ser considerado no processo de restabelecimento das condições fisiológicas do endotélio após a angioplastia com implante de stent, o revestimento com HA se mostrou uma interessante estratégia neste sentido no presente estudo.

1.6 PLDLA e PLGA com imobilização de ácido hialurônico.

Enxertia de ácido hialurônico em polímeros biorreabsorvíveis vem sendo alvo de diversos estudos nos últimos anos. Arnal-Pastor e colaboradores desenvolveram revestimento em camadas, utilizando métodos de eletrodeposição de HA em PLLA, com aplicações biomédicas, principalmente em suportes para engenharia tecidual (Arnal-Pastor et al., 2013).

Zhao e colaboradores realizaram a modificação do PLLA com Poli(etilenoimina) PEI e deixando a superfície com terminais aminados carregados positivamente, o HA é uma molécula aniônica e vai sendo depositada de modo a formar um substrato com multicamadas eletrostaticamente sobrepostas. A metodologia apresentada por Zhao e colaboradores é realizada em pH 5, no qual ocorre esta interação, diferente do pH do meio fisiológico, que está próximo de 7,2 (Zhao et al., 2014).

Yoo e colaboradores imobilizaram HA em PLGA para aplicações em engenharia de tecidos realizando modificações químicas no PLGA com Poli(etilenoglicol)-amida (PEG-NH₂) e ativando o HA com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), obtendo melhores resultados em cultivo de tecido cartilaginoso. Porém, com esta metodologia, o HA é depositado de maneira superficial no PLGA, de modo que, em uma aplicação em stents, sua liberação para o meio fisiológico provavelmente não acompanharia a degradação do polímero (Yoo et al., 2005).

Outro protocolo, utilizado por Park e colaboradores utiliza a modificação do ácido hialurônico com dihidrazida adípica (ADH) e a adição de N-hidroxisuccinimida (NHS) ao PLGA para posterior reação entre os dois componentes modificados formando PLGA-HAADH, com objetivo de formar bicamadas para substrato em regeneração óssea guiada para aplicações em periodontia (Park et al., 2009).

Yin e colaboradores, em 2014, descreveram a importância do HA no recobrimento de stents e na liberação controlada de drogas e genes, além de sua interação biológica favorável ao endotélio e íntima média. Porém, o HA foi apenas depositado, não ligado quimicamente aos polímeros. Desta forma, sua liberação seria mais rápida e menos controlada. Farhatnia e colaboradores produziram stents metálicos recobertos por camadas poliméricas finas produzidas por uma combinação de *eletro-spray* e *dip-coating* na confecção de stents de pequeno calibre, para uso adulto e pediátrico (Charpentier et al., 2015; Farhatnia et al., 2015; O'Brien et al., 2015; Mani et al., 2007). Portanto, se mostrou necessário o estudo de modificações nos protocolos conhecidos para melhor aplicação no recobrimento de stents.

1.7 Esterilização.

Um grande problema ao se trabalhar com polímeros em bioengenharia é a esterilização. Por definição, o processo de esterilização deve possibilitar a inativação de uma ampla variedade de micro-organismos, entre eles os esporos bacterianos resistentes. Este processo se diferencia do de desinfecção devido à capacidade de destruir praticamente todas as formas de micro-organismos (Rutala, 1999).

A eficácia de um processo de esterilização depende de sua capacidade de eliminar os micro-organismos sem afetar as propriedades dos materiais do dispositivo a ser esterilizado. Desta forma, esta questão em materiais que são sensíveis às altas temperaturas, como é o caso da grande maioria dos polímeros, elimina a possibilidade de utilização de grande parte dos métodos consagrados para este processo. Dentre eles, a autoclave, estufa seca e úmida e radiação gama, são processos que atingem temperaturas superiores aos 100°C, maiores do que a temperatura de transição vítrea (T_g) dos polímeros estudados. Para os monômeros, as T_g 's são 56°C para o PLLA, 39°C para o PLDLA e 45°C para o PLGA. Superiores até a algumas das temperaturas de fusão (T_m), 177°C para o PLLA, 125°C para o PLDLA e 178°C para o PLGA. Os dados citados para o PLGA correspondem às temperaturas para o copolímero 70:30 (PLGA/PLLA), utilizado no presente projeto. (Carvalho, 2002; Duek et al., 1999; Erbetta et al., 2011; Ignatius et al., 1996; Rezende et al., 2005; Santos et al., 2007; Yin et al., 2014; Zhang et al., 1995).

Nos métodos utilizados atualmente são encontradas algumas limitações. Na esterilização por radiação ionizante podem ser produzidas alterações químicas em alguns materiais, principalmente em biomateriais

poliméricos. Já os esterilizantes gasosos apresentam crescente utilização em dispositivos incompatíveis com o calor úmido ou calor seco. Dentre eles, o Óxido de Etileno (EtO) e o Formaldeído são os mais usados. Porém, apresentam limitações como problemas associados à toxicidade e difícil remoção de seus resíduos após a finalização do processo, o que pode comprometer a eficácia e segurança. Já as soluções químicas de Glutaraldeído e Formaldeído não são recomendados devido ao processo de remoção dos resíduos da solução esterilizante altamente tóxica e corrosiva, causando alterações químicas nos materiais, principalmente em biopolímeros, além de baixíssima segurança durante o processo (Dallan, 2005; Ratner et al., 1996).

Dentre os métodos alternativos em desenvolvimento para esterilização segura de materiais termo e quimiossensíveis, estão a radiação ultravioleta (UV) e o plasma de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂).

A radiação ultravioleta tem efeito microbiocida apenas quando utilizada com intensidade e tempo de exposição suficiente. Apresenta diversas aplicações como na esterilização do ar, superfícies e em embalagens nas indústrias alimentícia e farmacêutica. As comprimentos de ondas inferiores a 200 nm são ineficientes para esta aplicação. Já as radiações na faixa de 210 e 330 nm podem ser consideradas eficientes como germicidas, por serem absorvidas pelas proteínas e ácidos nucleicos, provocando o rompimento de cromossomos, mutações genéticas e inativação de enzimas que levam a morte celular (Cardoso, 2007). Em geral, a radiação ultravioleta tem se mostrado como uma forma mais rápida, confiável, efetiva, econômica e ambientalmente segura no tratamento de superfícies e líquidos (Abreu et al., 2004).

A esterilização por plasma de hidrogênio (STERRAD® - J&J) utiliza uma combinação de plasma e vapor de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), a baixa temperatura e sem apresentar resíduos tóxicos. O Peróxido de Hidrogênio é bactericida, viruscida, tuberculiscida, esporocida e fungicida e tem ação por meio da produção de radicais livres que lesam membranas lipídicas, DNA e outros componentes celulares essenciais. O ciclo de esterilização STERRAD® consiste na injeção de vapor de peróxido de hidrogênio na câmara de tratamento e emissão de micro-ondas que geram plasma com radicais livres que possuem a capacidade de desnaturar proteínas, levando à morte celular (Lerouge et al., 2012).

Diante do exposto, a inclusão desta etapa no presente projeto teve sua importância na avaliação das possíveis alterações em propriedades químicas e mecânicas, nos polímeros biocompatíveis de interesse, devido aos processos de esterilização, determinando as melhores estratégias de escolha entre as alternativas disponíveis para este processo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral.

Desenvolver modelos físicos biorreabsorvíveis, com dimensões semelhantes aos stents coronários, de PLLA, revestidos com seu copolímero PLGA e/ou PLDLA enxertados com ácido hialurônico (HA). Avaliar a estabilidade dos modelos aos processos alternativos de esterilização.

2.2. Objetivos Específicos.

- Elaborar modelos físicos de PLLA;
- Incorporar HA em matrizes de PLGA e PLDLA por enxertia;
- Desenvolver processo de revestimento dos modelos de PLLA com PLGA-HA e PLDLA-HA;
- Estudar a estabilidade dos modelos aos processos de esterilização por radiação UV e plasma de peróxido de Hidrogênio.
- Validar os processos de esterilização de acordo com as normas aplicáveis.

3. MATERIAIS E METODOLOGIA

Este capítulo foi dividido em duas seções principais. A primeira lista os materiais e equipamentos utilizados no projeto, item 3.1, e a segunda descreve a metodologia adotada para elaboração, caracterização, revestimento e esterilização dos modelos desenvolvidos, item 3.2.

3.1 Materiais e equipamentos.

- PLLA – massa molar em torno de 140.000 Da (Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo)
- PLDLA – massa molar em torno de 100.000-160.000 Da (Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo)
- PLGA 70:30 – massa molar em torno de 66.000 Da (grau de pureza 99%) (PURAC[®])
- HA – massa molar em torno de 130.000 Da (Sigma Aldrich[®])
- Câmara de esterilização por plasma (Sterrad System[®] - Johnson & Johnson[®])
- Câmara de esterilização por radiação UV (Trox do Brasil[®])
- Estereomicroscópio (Physis[®] SZ40)
- Microscópio óptico (MO) (Nikon Instruments[®])
- Micrômetro digital (Scarret[®]-796)
- Espectrômetro infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Variant-Agilent[®] 640-IR FT-IR)

- Análise termogravimétrica (TGA) (TA Instruments[®], TGA Q500)
- Análise térmica diferencial (DSC) (TA Instruments[®], Q-series)
- Equipamento para ensaios mecânicos MTS TRYTON 250[®]
- Equipamento universal de ensaios mecânicos (Instron[®] 3369)
- Durômetro (HT- 6510^a - na escala Shore-A)
- Balança analítica (Shimadzu[®] AW220)
- Tensiômetro (Attension[®] e o software Contact Angle[®])
- Membrana de diálise (*cut off* 14.000 Da)

3.2 Metodologia.

As etapas adotadas para o desenvolvimento do presente projeto seguem o fluxograma apresentado na Figura 4, a seguir. A metodologia descrita segue os itens descritos no fluxograma, que parte de três matérias diferentes: PLLA para a estrutura central do dispositivo; PLDLA e PLGA para a incorporação de ácido hialurônico e revestimento. Os três materiais foram estudados quanto a sua estabilidade aos processos de esterilização.

Figura 4: Fluxograma das etapas de desenvolvimento do projeto.

3.2.1 Elaboração dos filmes.

Nesta subseção, são apresentadas as metodologias para elaboração dos filmes de PLLA, material candidato para estrutura central do dispositivo, e dos filmes de PLDLA e PLGA, materiais candidatos a revestimento e, portanto, utilizados para tentativa de enxertia do ácido hialurônico.

A) PLLA.

Foram obtidos filmes do polímero PLLA utilizando o método da evaporação de solvente, onde 2,5 g do polímero foi dissolvido em 50 ml de clorofórmio sob agitação constante e à temperatura ambiente por 1 hora. Após completa dissolução, foram depositados em placas de Petri, previamente silanizadas para facilitar a posterior remoção do filme formado. A silanização da

placa foi realizada com óleo de silicone em estufa à 200°C por 2 horas, seguido do resfriamento e remoção do excesso do óleo com lavagem superficial com detergente.

As placas contendo a solução foram deixadas em capela com exaustão, à temperatura ambiente e, após completa evaporação do solvente, tempo médio de 3 a 4 dias, os filmes foram removidos das placas armazenados sob vácuo à temperatura ambiente.

B) PLDLA e PLGA.

Para obtenção dos filmes do copolímero PLGA (70:30) e PLDLA, foram empregados polímeros em *pellets*. Todos os filmes foram obtidos pelo método de evaporação de solvente de acordo com a metodologia descrita no item anterior, 3.2.1-A. Após completa evaporação do solvente, tempo médio, também, de 3 a 4 dias em câmara de segurança com exaustão, os filmes foram armazenados em câmara de vácuo à temperatura ambiente.

3.2.2 Desenvolvimento do revestimento: Enxertia do HA em matrizes de PLGA e PLDLA e confirmação do processo.

Nesta subseção, serão apresentados dois protocolos diferentes, descritos a seguir, para a tentativa de enxertia de HA nos polímeros PLDLA e PLGA, que serão posteriormente usados para o revestimento do PLLA.

A) Enxertia de HA em PLDLA (PLDLA-HA) e PLGA (PLGA-HA).

Para este protocolo, foi tomado como ponto de partida a ativação do PLDLA e PLGA com N,N-diciclohexil carbodiimida (DCC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) e posterior enxertia do HA no PLDLA e PLGA ativado.

O PLDLA e o PLGA, 250 mg, de cada um dos polímeros, foram dissolvidos, separadamente em mistura de 5mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 3,1 mg DCC e 1,73 mg NHS. O HA foi dissolvido em DMSO (5 mg/5 mL). Após a completa dissolução dos polímeros em cada uma das soluções de PLGA e PLDLA, separadamente, foram misturadas a solução de HA para a reação a temperatura de 40°C por 24 horas, sob agitação constante. Após a reação, os produtos foram dialisados em água deionizada sob agitação à temperatura ambiente por 2 dias, empregando membrana de diálise (*cut off* 14.000 Da). Em seguida, os produtos foram ressuspensos em 2 ml de clorofórmio e, após homogeneização, foram obtidos filmes por evaporação de solvente, como descrito em 3.2.1.

B) Enxertia de HAADH nas matrizes PLDLA (PLDLA-HAADH) e PLGA (PLGA-HAADH).

O segundo protocolo utilizado envolveu a modificação química do HA com dihidrazida adípica (ADH), ativação do PLDLA e PLGA com DCC e NHS e posterior enxertia do HAADH no PLDLA e PLGA ativado. (Park, 2009)

Desta forma, foi realizada a dissolução do HA em água destilada para obtenção de solução com concentração 5 mg/mL. Em seguida foi adicionado excesso molar (20 – 30 vezes) de ADH, com valor de pH ajustado para 4,8-5,0.

Após aproximadamente 2 horas a reação foi encerrada ajustando-se o valor do pH para 7,0. O HA modificado foi purificado por diálise para obtenção de HA-ADH sólido, mesmas condições do item 3.2.2-A.

O PLDLA e o PLGA também foram dissolvidos separadamente em mistura de DMSO, DCC e NHS, nas mesmas concentrações do item 3.2.2-A. Outra solução de HA-ADH em DMSO (5 mg/5mL) foi preparada. Após a completa dissolução dos PLDLA e PLGA, os 5 mL destas soluções foram misturados com os 5 mL das soluções de HAADH para reação a temperatura de 40°C por 24 horas sob agitação constante. Após a reação, os produtos foram dialisados em água deionizada sob agitação à temperatura ambiente por 2 dias, empregando membrana de diálise (*cut off* 14000 Da). Os produtos também foram ressuspensos em clorofórmio 2 mL e, após homogeneização, foram obtidos filmes por evaporação de solvente, como descrito em 3.2.1.

3.2.3 Caracterização dos biomateriais.

Nesta subseção, serão descritas as metodologias para caracterização microestrutural, propriedades térmicas e mecânicas dos filmes de PLLA, PLDLA e PLGA, bem como dos filmes PLDLA-HA, PLDLA-HAADH e PLGA-HA, PLGA-HAADH.

3.2.3.1 Microestrutura e características superficiais.

A) Análise macro e microscópica.

Os filmes foram documentados fotograficamente por estereomicroscopia e microscopia óptica (MO), para reconhecimento das características superficiais macro e microscópicas das amostras de filmes de PLLA, PLGA e PLDLA de forma individual, antes e após os processos estudados para enxertia do HA.

B) Espessura.

As amostras tiveram suas espessuras obtidas por micrômetro digital. Foram realizadas 5 medidas em regiões distintas de cada um dos filmes, onde foram calculadas as médias acrescidas de desvio padrão. As medidas também foram tomadas para os filmes antes e após o experimento de intumescimento, descrito no item 3.2.3.4-A, e antes e após o revestimento com PLDLA e PLGA, descrito no item 3.2.5.

C) Espectrometria infravermelho por Transformada de Fourier.

Outra análise realizada foi a de espectrometria infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) avaliando o perfil dos espectros vibracionais ativos entre 400 e 4000 cm^{-1} , por transmitância e refletância especular e difusa.

3.2.3.2 Avaliação das propriedades térmicas.

A) Análise termogravimétrica.

As propriedades térmicas foram avaliadas por análise termogravimétrica (TGA), que foi realizada empregando atmosfera inerte com fluxo de Nitrogênio com vazão de 20 ml/min, com varredura partindo da temperatura ambiente até 600°C com taxa de aquecimento de 10°C por minuto.

B) Análise térmica diferencial calorimétrica por varredura.

A análise térmica diferencial calorimétrica por varredura (DSC) é realizada com as amostras submetidas ao ciclo aquecimento-resfriamento-aquecimento, com taxa de aquecimento de 10°C por minuto e de resfriamento de 5°C por minuto em atmosfera inerte de Nitrogênio com vazão de 20 ml/min.

3.2.3.3 Avaliação de propriedades mecânicas.

A) Teste de tensão e deformação sob tração.

As propriedades mecânicas foram avaliadas por teste de tensão x deformação sob tração em corpos de prova (CPs) obtidos a partir do corte dos filmes preparados. O corte foi realizado em prensa hidráulica com molde específico, como apresentado na Figura 5, a seguir. Os CPs tiveram suas dimensões obtidas por micrômetro digital (Scarret[®] -796). Os ensaios de tensão x deformação sob tração dos filmes de PLLA foram realizados no equipamento MTS TRYTON 250[®] à velocidade de 100 mm/min. Já os ensaios dos filmes de PLDLA e PLGA foram realizados em equipamento universal de ensaios (Instron[®] 3369) à velocidade 500 mm/min, pois o equipamento MTS

não permitiu a medida de elongação máxima, que para estes polímeros, foi superior a 50 mm.

Figura 5: Corpos de prova empregados no ensaio de tensão x deformação sob tração
A) PLLA B) PLGA C) PLDLA (Onde: NE: não esterilizado, UV: esterilizado por ultravioleta e PL: esterilizado por plasma)

B) Dureza na escala Shore-A.

Para análise de dureza foi utilizado o durômetro na escala Shore-A, pressionando-se o durômetro contra a superfície dos corpos de prova dos materiais, à 90° contra a superfície do corpo de provas, para aquisição das medidas. Foram realizadas 5 medidas em regiões distintas dos filmes e tomadas as médias acrescidas de desvio padrão.

3.2.3.4 Caracterização para confirmação da enxertia de HA e HAADH.

Para avaliação da superfície dos filmes e confirmação da enxertia de HA e HAADH pelos processos realizados, as amostras obtidas através dos protocolos descritos em 3.2.2 foram submetidas às análises de MO, FTIR, conforme metodologia já descrita no item 3.2.3.1.

A) Intumescimento

Adicionalmente, foi avaliado o intumescimento em água deionizada e a análise de molhabilidade à água por ângulo de contato. Para avaliação do intumescimento, três corpos de prova (CPs) de cada filme (PLDLA e PLGA, com e sem HA e HAADH) foram pesados e imersos em água deionizada. Cada um dos CPs foi pesado novamente após 15, 30, 45 e 60 minutos e após 24 horas em contato com água deionizada. Foram tomadas as médias e desvio padrão para apresentação destes resultados, em porcentagem em massa de água na amostra.

B) Molhabilidade

As amostras foram avaliadas quanto ao ângulo de contato para caracterização da molhabilidade, empregando um tensiômetro (Attension® e o software Contact Angle®). O equipamento captou 20 imagens, uma a cada segundo, e o ângulo de contato determinado para cada imagem. A molhabilidade foi definida em termos da média obtida das medidas dos lados

esquerdo e direito dos ângulos de contato (θ), após a estabilização, acrescidos dos desvios padrão.

3.2.4 Preparo dos modelos: tubos e placas de PLLA.

PLLA na forma de placas ou tubos foram utilizados como estrutura interna do modelo de stent. O modelo consiste de tais estruturas revestidas por camada de PLDLA ou PLGA enxertada com HA.

Amostras de tubos de PLLA foram preparadas pelo método *dip coating*, isto é, deposição de filme do polímero na superfície de cilindros metálicos guia com diâmetro adequado, da ordem de 2 a 5 mm, aproximando-se das dimensões de um stent coronariano.

A deposição do filme foi realizada através do mergulho do cilindro em solução do polímero, seguido de evaporação do solvente, mesmo processo utilizado na confecção dos filmes. O procedimento foi repetido o número de vezes necessário para obtenção da espessura desejada para o tubo.

3.2.5 Revestimento dos modelos: tubos e placas de PLLA.

Após a confecção da camada interna de PLLA, prosseguiu-se com o revestimento com PLGA ou PLDLA para estudos sobre a escolha do melhor biomaterial a ser utilizado como revestimento do protótipo, além da determinação da metodologia de revestimento para a fabricação e caracterização do protótipo.

O método utilizado também foi o *dip coating* conforme descrito no item 3.2.4, porém foi realizado apenas um ciclo de imersão, depositando apenas uma camada de PLDLA ou PLGA nas matrizes de PLLA.

3.2.6 Esterilização.

Nesta subseção, serão apresentadas as metodologias para esterilização por radiação ultravioleta, plasma de peróxido de hidrogênio e os estudos *in vitro* para validação dos processos.

A) Esterilização por radiação ultravioleta.

Foram utilizadas câmaras de segurança equipadas com lâmpadas de emissão ultravioleta utilizadas para esterilização. Os filmes foram expostos à radiação por 1 hora e 30 minutos em cada face, em contato direto com a radiação. Após este período, os filmes voltaram a ser armazenados em câmara de vácuo em temperatura ambiente até serem testados.

B) Esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio.

Os filmes foram submetidos à esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio por 45 minutos em câmara de plasma (Sterrad System[®] - Johnson & Johnson[®]), de acordo com as orientações do fabricante: os filmes, dispostos em embalagens específicas, permeáveis, de polipropileno no interior do equipamento, passaram pelo primeiro ciclo em vácuo a 0,3 mmHg por 10

minutos à temperatura ambiente; Segundo ciclo com a injeção de peróxido de hidrogênio 58% por 6 minutos; Terceiro ciclo com a difusão do peróxido de hidrogênio por 12 minutos; Quarto ciclo com a emissão de micro-ondas para formação do plasma por 12 minutos, podendo atingir a temperatura máxima de 50°C; Quinto ciclo composto de séries de ventilação, vácuo e repressurização até atingir atmosfera e temperatura ambiente por aproximadamente 5 minutos. Após este período, os filmes voltaram a ser armazenados em câmara de vácuo à temperatura ambiente até serem testados.

C) Estudos *in vitro*: Confirmação da esterilidade.

Os corpos de prova cilíndricos de PLLA, revestidos com PLDLA ou PLGA, após passarem pelos processos de esterilização por plasma ou UV, foram cultivados em tubos de polipropileno em 2,5 ml de meio de cultura Luria-Bertami (LB) (Sigma Chemical Company®) em incubadora com agitação a 37°C por 24 horas. Os controles positivos foram feitos com corpos de prova não esterilizados e os controles negativos com meio de cultura estéril. Estes estudos foram adaptados das normas **ISO11135:2007** e **ABNT NBR15245:2005**, que se referem ao método do óxido de etileno, utilizado atualmente na esterilização destes dispositivos.

3.2.7 Análise estatística.

O programa SPSS (Release 8.0, Standard Version, 1997) foi empregado. Todos os resultados serão apresentados como a média aritmética acrescida do desvio padrão.

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas após análise de variância (One-Way ANOVA) seguida do teste Mann-Whitney. Valores de $p > 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

Este capítulo descreve os resultados obtidos para as etapas descritas no capítulo 3. As análises dos mesmos encontram-se no capítulo 5 – Discussão.

4.1 Caracterização dos filmes de PLLA, PLDLA e PLGA.

4.1.1 Microestrutura e características superficiais.

A) Aspecto macroscópico.

O aspecto macroscópico dos filmes pode ser observado na fotografia dos corpos de prova que foram preparados para uso no ensaio de tensão x deformação sob tração, apresentada na Figura 5. Pela imagem é possível observar a diferença de transparência entre os filmes. O filme de PLLA apresentou-se translúcido, esbranquiçado e relativamente mais rígido do que o PLDLA e PLGA, que são filmes transparentes e maleáveis. Na mesma figura é possível ainda observar que os filmes não apresentaram diferenças macroscópicas quando comparados antes da esterilização e após esterilização por UV e por plasma.

B) Espessura.

As amostras tiveram suas espessuras medidas por micrômetro digital, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de espessura, em milímetros, dos filmes obtidos por evaporação de solvente.

Espessura [mm]:	PLLA	PLDLA	PLGA
Média	0,51	0,42	0,38
Desvio padrão	0,05	0,06	0,03

C) Microscopia.

As Figuras 6, 7 e 8, apresentam imagens obtidas por microscopia óptica com luz transmitida dos filmes em estudo. Como foi observada diferença na textura dos filmes entre as superfícies que ficaram em contato com o ar e com o vidro durante a evaporação do solvente, cada uma das superfícies foi caracterizada. As Figuras 7 e 8 também apresentam as imagens para os filmes PLDLA-HA, PLDLA-HAADH, PLGA-HA e PLGA-HAADH.

Figura 6: Imagens das superfícies, obtidas por microscopia óptica de luz transmitida (aumento 200x) A; PLLA superfície ar; B) PLLA superfície vidro; C) PLLA superfície ar esterilizada por UV; D) PLLA superfície vidro esterilizada por UV; E) PLLA superfície ar esterilizada por plasma e F) PLLA superfície vidro esterilizada por plasma.

Figura 7: Imagens das superfícies dos filmes obtidas por microscopia óptica de luz transmitida (aumento 200x): A) PLDLA superfície ar; B) PLDLA superfície vidro; C) PLDLA superfície ar esterilizada por UV; D) PLDLA superfície vidro esterilizada por UV; E) PLDLA superfície ar esterilizada por plasma; F) PLDLA superfície vidro esterilizada por plasma; G) PLDLA-HA e H) PLDLA-HAADH.

Figura 8: Imagens das superfícies dos filmes obtidas por microscopia ópticas de luz transmitida (aumento 200x): A) PLGA superfície ar; B) PLGA superfície vidro; C) PLGA superfície ar esterilizada por UV; D) PLGA superfície vidro esterilizada por UV; E) PLGA superfície ar esterilizada por plasma; F) PLGA superfície vidro esterilizada por plasma; G) PLGA-HA e H) PLGA-HAADH.

D) Espectrometria infravermelho por Transformada de Fourier.

Os resultados do FTIR são apresentados na Figura 9, os espectros obtidos para as amostras de PLGA e PLDLA foram comparadas com os espectros das amostras com enxertia de HA e HAADH e com o espectro do HA puro. A seta indica um pico característico da molécula de água.

Figura 9: Análises obtidas por espectroscopia FTIR para as amostras apresentadas na legenda.

Não foi possível observar diferenças entre os padrões de picos das amostras PLDLA e PLDLA-HA, e entre PLGA e PLGA-HA. Porém, para as amostras que apresentam ADH, é possível identificar um pico entre 650 e 700 cm^{-1} , também identificado na amostra de HA puro, que pode estar relacionado com a absorção de água. Por este método, não foi possível a identificação da presença de HA nas amostras, provavelmente devido a questões de sensibilidade do mesmo, já que a quantidade de HA incorporada é pequena.

4.1.2 Propriedades térmicas.

A) Análise termogravimétrica.

As propriedades térmicas avaliadas por análise termogravimétrica (TGA) estão apresentadas nas Figuras 10 a 14, que compreendem aos gráficos de percentual de massa em função da temperatura.

As Figuras 10, 11 e 12 apresentam as curvas de TGA para os polímeros estudados PLLA, PLDLA e PLGA, antes e após esterilização com UV e plasma. Além destas, nas Figuras 13 e 14, podem ser observados as curvas para as amostras de PLDLA e PLGA com a enxertia de HA e HAADH, respectivamente.

A partir das curvas de TGA foram determinadas as temperaturas de degradação para cada polímero, apresentadas na Tabela 2.

Figura 10: Curvas de TGA para PLLA sem esterilização, PLLA com esterilização por UV e PLLA com esterilização por plasma.

Figura 11: Curvas de TGA para PLDLA sem esterilização, PLDLA com esterilização por UV e PLDLA com esterilização por plasma.

Figura 12: Curvas de TGA para PLGA sem esterilização, PLGA com esterilização por UV e PLGA com esterilização por plasma.

Figura 13: Curvas de TGA: A) PLDLA controle. B) PLDLA com HA. C) PLDLA com HA e ADH.

Figura 14: Curvas de TGA: A) PLGA controle. B) PLGA com HA. C) PLGA com HA e ADH.

Tabela 2: Dados obtidos a partir da curva de TGA: Temperaturas de degradação, para os polímeros estudados e para os polímeros com enxertia de HA.

Polímero:	Perde água (Temperatura °C)	Temperatura de degradação [°C]
PLLA	Não	350,00
PLDLA	Não	350,00
PLDLA-HA	Sim (89,79)	316,80
PLDLA-HAADH	Sim (95,27)	332,94
PLGA	Não	360,15
PLGA-HA	Sim (96,42)	338,17
PLGA-HAADH	Sim (92.29)	318,96

B) Análise térmica diferencial calorimétrica por varredura.

As análises térmicas diferenciais (DSC) apresentaram os resultados mostrados nos gráficos, das Figuras 15, 16 e 17, para o PLLA, PLDLA e PLGA, antes e após a esterilização por UV e plasma, respectivamente.

Também foram realizadas análises de DSC para as amostras PLDLA e PLGA com enxertia de HA e HAADH, apresentados nas últimas Figuras 18 e 19. É possível observar, para as amostras com HA, a presença de um pico por volta de 100°C, característico da presença de água nas amostras.

A partir das curvas de DSC foi possível determinar as temperaturas de transição vítrea (T_g), cristalização (T_c) e fusão (T_f) para os polímeros antes e após a esterilização. Os valores estão apresentados na Tabela 3.

Figura 15: Curvas de DSC para PLLA sem esterilização, PLLA com esterilização por UV e PLLA com esterilização por plasma.

Figura 16: Curvas de DSC para PLDLA sem esterilização, PLDLA com esterilização por UV e PLDLA com esterilização por plasma.

Figura 17: Curvas de DSC para PLGA sem esterilização, PLGA com esterilização por UV e PLGA com esterilização por plasma.

Figura 18: Curvas de DSC: A) PLDLA com HA e B) PLDLA com HA e ADH.

Figura 19: Curvas de DSC: A) PLGA com HA e B) PLGA com HA e ADH.

Tabela 3: Dados obtidos a partir da curva de DSC para os polímeros estudados e para os polímeros com enxertia de HA.

Polímero:	Temperatura de cristalização [°C]	Temperatura de transição vítrea [°C]	Temperatura de fusão 1 [°C]	Temperatura de fusão 2 [°C]
PLLA	124,36	50,10	156,25	NA
PLLA UV	124,12	50,11	151,84	NA
PLLA Plasma	125,07	50,08	150,91	NA
PLDLA	NA	49,80	NA	NA
PLDLA UV	NA	50,62	NA	NA
PLDLA Plasma	NA	50,63	NA	NA
PLDLA-HÁ	NA	52,70	NA	NA
PLDLA-HAADH	NA	53,62	NA	NA
PLGA	NA	50,97	NA	NA
PLGA UV	NA	50,58	NA	NA
PLGA Plasma	NA	50,57	NA	NA
PLGA-HA	119,95	55,26	147,83	157,60
PLGA-HAADH	123,54	54,60	147,84	156,94

4.1.3 Propriedades mecânicas.

A) Teste de tensão e deformação sob tração.

Os corpos de prova para os ensaios de tração foram obtidos a partir do corte dos filmes empregando molde e prensa hidráulica, apresentados na Figura 5.

As Figuras 20 a 24 mostram os valores de módulo elástico (E), tensão (σ_e , ϵ_e) e deformação no escoamento, bem como tensão (σ_r , ϵ_r) e deformação

na ruptura, foram determinados pelo software de aquisição de dados do próprio fabricante dos equipamentos. Foram determinados os valores médios e desvios padrões para cada amostra e a avaliação da diferença entre os grupos foi realizada por análise de variância e foi considerado um intervalo de

confiança de $p < 0,05$.

Figura 20: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: Módulo elástico.

Figura 21: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: Tensão na ruptura.

Figura 22: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: Deformação na ruptura.

Figura 23: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: Tensão no escoamento.

Figura 24: Gráfico do ensaio de tensão x deformação sob tração: Deformação no escoamento.

Os gráficos dos ensaios de tensão x deformação sob tração estão no Anexo A.

B) Dureza na escala Shore-A.

Os valores de dureza na escala Shore-A estão apresentados na Figura 25, são apresentadas as médias das 5 medidas obtidas, acrescidas dos desvios padrões. A avaliação da diferença entre os grupos foi realizada por análise de variância e foi considerado um intervalo de confiança de $p < 0,05$.

Figura 25: Valores de dureza Shore A dos polímeros PLLA, PLDLA e PLGA antes e após esterilização por UV e Plasma.

4.1.4 Confirmação da enxertia de HA: Intumescimento e molhabilidade.

Os valores de intumescimento dos polímeros em água deionizada são apresentados na Figura 26, onde é possível observar um maior aumento da absorção de água nos filmes enxertados com HA e HAADH. Também é possível observar mudança na transparência dos filmes após 1 dia de intumescimento, conforme Figura 27, onde os filmes de PLDLA-HAADH e PLGA-HAADH apresentaram um aspecto esbranquiçado bem acentuado, enquanto este comportamento não foi acentuado no PLGA-HA e PLDLA-HA.

Os controles aparentemente não apresentam alterações, que permaneceram com aspecto transparente como antes de serem submetidos ao ensaio.

Figura 26: Intumescimento: Valores de % de intumescimento das amostras em água em função do tempo.

Figura 27: Intumescimento: Fotografia dos corpos de prova utilizados no ensaio, no tempo de 3 dias. A) PLGA controle B) PLGA-HA C) PLGA-HAADH D) PLDLA controle E) PLDLA-HA F) PLDLA- HAADH.

As imagens de microscopia óptica dos filmes, antes e após o intumescimento, foram obtidas conforme descrito no item 3.2.3.1-A. Também foi possível reconhecer as alterações por MO, mais acentuadas nas amostras PLDLA-HAADH e PLGA-HAADH, apresentadas na Figura 28.

Figura 28: Intumescimento: Microscopia óptica dos corpos de prova utilizados no ensaio, no tempo de 3 dias (aumento de 200x): A) PLGA controle; B) PLGA-HA; C) PLGA-HAADH; D) PLDLA controle; E) PLDLA-HA e F) PLDLA- HAADH.

A Tabela 4 apresenta os valores de espessura dos filmes apresentados antes e após o experimento. Não foi possível observar aumento da espessura dos filmes após o intumescimento para nenhuma das amostras estudadas.

Tabela 4: Valores de espessura, em milímetros, dos filmes, antes e após o intumescimento.

Espessura [mm]:	PLDLA controle	PLDLA-HA	PLDLA-HAADH	PLGA controle	PLGA-HA	PLGA-HAADH
Antes (Média)	0,041	0,032	0,073	0,042	0,012	0,054
Antes (Desvio padrão)	0,005	0,006	0,003	0,003	0,002	0,004
Após (Média)	0,042	0,029	0,074	0,042	0,013	0,055
Após (Desvio padrão)	0,004	0,005	0,003	0,004	0,003	0,007

Medidas do ângulo de contato entre uma gotícula de líquido e a superfície do polímero permitem avaliar a molhabilidade da superfície ao líquido em questão. Neste estudo foi utilizada água deionizada, o que permitiu avaliar a afinidade das superfícies pela água, isto é, a hidrofobicidade do material.

Os valores de ângulo de contato entre gotícula de água deionizada e a superfície dos polímeros em estudo são apresentados nas Figuras 29 e 30, que compreendem as médias, entre os ângulos, esquerdo e direito, tomados depois da estabilização da gotícula depositada sobre a superfície, acrescidas de desvio padrão e análise de variância, para verificar a existência de diferenças entre os grupos, para um intervalo de confiança de $p < 0,05$. Não foi possível observar diferenças significativas nas médias dos ângulos antes e após as esterilizações, tanto para a superfície ar dos filmes quanto para a superfície vidro.

Figura 29: Valores médios dos ângulos de contato entre gotícula de água deionizada e superfície ar dos polímeros PLLA, PLDLA e PLGA, antes e após esterilização, por UV e Plasma.

Figura 30: Valores médios dos ângulos de contato entre gotícula de água deionizada e superfície vidro dos polímeros PLLA, PLDLA e PLGA, antes e após esterilização, por UV e Plasma.

Por outro lado, foi possível observar diferenças significativas nos ângulos de contato antes e após a enxertia de HAADH, tanto para o PLDLA quanto para o PLGA, que obtiveram ângulo de contato zero, não mensurado pelo experimento, apresentado nas Figuras 31 e 32, observado também nas fotografias do experimento, apresentadas na Figura 33.

Figura 31: Valores médios dos ângulos de contato entre gotícula de água deionizada e superfícies ar e vidro dos polímeros PLGA, PLGA-HA e PLGA-HAADH.

Figura 32: Valores médios dos ângulos de contato entre gotícula de água deionizada e superfícies ar e vidro dos polímeros PLDLA, PLDLA-HA e PLDLA-HAADHDH.

Figura 33: Fotografias dos ângulos de contato entre gotícula de água deionizada e superfície vidro: A) para o PLGA controle; B) PLGA-HA; C) PLDLA controle; D) PLDLA-HA; E) e F) para o PLGA-HAADH e G) para o PLDLA-HAADH.

Por fim, após o revestimento das amostras de filmes e tubos de PLLA por *dip coating* com PLDLA e PLGA, descrito no item 3.2.4, as amostras de filmes e tubos de PLLA foram caracterizadas. As medidas de espessura, obtidas conforme metodologia descrita no item 3.2.3.1, são apresentadas na Tabela 5, e a fotografia e estereomicroscopia, com medidas tiradas pelo software do próprio equipamento, indicadas na imagem, na Figura 34. Na imagem A também é possível observar um stent metálico comercial (Crounus® - Scitech), para melhor visualização comparativa das dimensões dos modelos.

Tabela 5: Valores de espessura, em milímetros, dos filmes, antes e após o revestimento por *dip coating*;

Espessura [mm]:	PLLA+PLDLA	PLLA+PLGA
Antes (Média)	0,41	0,42
Antes (Desvio padrão)	0,05	0,06
Após (Média)	0,42	0,44
Após (Desvio padrão)	0,04	0,05

Figura 34: A) Fotografia dos tubos de PLLA antes e após o revestimento em comparação com um stent coronário comercial (Cronus® - Scitech): A1) PLLA revestido com PLDLA; A2) stent metálico Cronus®; A3) PLLA revestido com PLGA; A4) stent metálico Cronus® expandido; A5) PLLA sem revestimento e B) Estereomicroscopia com medidas do tubo de PLLA sem revestimento.

5. DISCUSSÃO

Neste capítulo, é apresentada a análise dos resultados obtidos. Foi realizada uma subdivisão, por questão didática, que não segue a numeração dos capítulos anteriores. O primeiro item, 5.1, refere-se às questões de caracterização superficiais, de propriedades mecânicas e térmicas, o item 5.2 trata das questões referentes aos processos de esterilização e o 5.3 dos dados relacionados à confirmação da incorporação de HA, e por último, as considerações finais estão no item 5.4.

5.1 Caracterização e propriedades.

O filme de PLLA obtido por evaporação de solvente apresentou coloração esbranquiçada, característico de polímero semicristalino. Já os filmes de PLDLA e PLGA apresentaram-se como transparentes, característica de polímeros amorfos.

Os filmes apresentaram valores de espessura entre 0,50 e 0,39 mm, com desvio padrão bem diminuto, o que comprova a uniformidade de espessura das amostras obtidas pelo método de evaporação de solvente.

As microestruturas dos filmes em estudo foram analisadas por diferentes técnicas. As imagens obtidas por microscopia óptica permitiram verificar que o filme de PLLA apresenta aspecto de polímero com alta cristalinidade, enquanto que os filmes de PLDLA e PLGA apresentaram aspectos de material amorfo, corroborando com estudos de Rezende, e colaboradores, 2003. Para todos os

filmes, foram analisadas as superfícies em contato com o ar e com o vidro, as quais não apresentaram diferenças significativas.

Os resultados das análises térmicas confirmam aqueles determinados por MO, isto é, de que o PLLA apresenta morfologia semicristalina, enquanto que o PLDLA e PLGA apresentam morfologia amorfa, já que, para o PLLA foi possível identificar temperatura de fusão bem definida e para o PLDLA e PLGA não foi possível identificar esta temperatura de fusão. Em outros estudos, Rezende e colaboradores, em 2005 e Erbetta e colaboradores em 2011, determinaram as temperaturas de fusão para membranas destes polímeros por análises térmicas. Desta forma, estudos complementares estão sendo realizados neste sentido.

Quanto ao comportamento mecânico, nos ensaios de tensão x deformação sob tração, não foi possível observar diferença significativa entre as amostras antes e após os processos de esterilização, mostrando que os mesmos não interferem nestas propriedades mecânicas, importantes principalmente para o material escolhido para fabricação, o corpo central do protótipo de stent, que deve apresentar resistência mecânica suficiente para evitar o fechamento do vaso sanguíneo. O PLLA apresentou os maiores valores para módulo elástico e tensão na ruptura, apresentando a maior resistência entre os materiais estudados.

Materiais poliméricos apresentam, de maneira geral, menor resistência mecânica quando comparados aos materiais metálicos (Nash et al., 2014). No desenvolvimento de stents poliméricos, este fato pode ser compensado na elaboração de desenhos específicos para os dispositivos ou sistemas de *clip*

durante a expansão no implante, que vem sendo alvo de pesquisa do Centro de Engenharia em Assistência Circulatória (CEAC) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) em parceria com a BioMechanical Engenharia Biomédica, no estudo e simulação computacional das propriedades mecânicas para aprimoramento do desenho do dispositivo.

O PLLA também apresentou os maiores valores de dureza na escala Shore-A. Os resultados obtidos para as propriedades mecânicas corroboram com as análises térmicas e caracterização microestrutural que mostraram o PLLA com características de material com maior cristalinidade.

Já os polímeros PLDLA e PLGA apresentaram valores menores, e muito próximos entre si, para módulo de elasticidade e tensão na ruptura, além de valores mais elevados do que PLLA para deformação no escoamento e na ruptura. Estes resultados estão em concordância com os das análises térmicas e caracterização microestrutural, que apresentou estes polímeros como materiais de estrutura predominantemente amorfa.

5.2 Esterilização.

Em relação à esterilização, nas avaliações por imagem, não foi possível observar nenhuma diferença significativa entre as amostras não esterilizadas e as submetidas aos diferentes processos de esterilização, por UV e por plasma.

Quanto à aparência dos filmes, não ficaram evidentes alterações de coloração e/ou transparência após a exposição dos mesmos aos processos de esterilização. Principalmente no caso da esterilização por UV, que é um tipo de

radiação conhecida por gerar amarelamento, o que, para materiais poliméricos, é um indicativo de processos de degradação, uma vez que a radiação UV pode interagir com as duplas ou triplas ligações químicas presentes nas cadeias poliméricas, facilitando a quebra das cadeias e gerando radicais livres que podem reagir formando grupos carbonila na cadeia principal (Lewis et al., 2004).

Também não foram encontradas diferenças significativas nas análises por TGA e DSC, nos padrões de picos que representam as temperaturas de fusão para as amostras antes e depois das esterilizações por plasma e UV. Com a determinação do ângulo de contato entre gotícula de água e a superfície dos polímeros em estudo, foi possível identificar que não ocorreram alterações significativas entre as amostras antes e após esterilização.

Ainda em relação aos processos de esterilização, foi confirmada a esterilidade das amostras, tanto para o processo por UV, quanto para a esterilização por plasma, seguindo a adequação às normas de segurança em esterilização por óxido de etileno: **ISO11135:2007** e **ABNT NBR 15245:2005**. Não foram descritas na literatura normas de segurança para esterilização com UV ou Plasma para aplicação em stents, devido a este fato, foram seguidas as normas para o óxido de etileno, que é amplamente utilizado nesta aplicação.

5.3 Confirmação da incorporação de HA.

As imagens obtidas por microscopia óptica dos filmes de PLDLA-HA, PLDLA-HAADH e PLGA-HA, PLGA-HAADH, apresentadas nas Figuras 7 e 8, indicam características de formação de domínios, onde os pontos mais escuros

provavelmente correspondem ao HA enxertado nos polímeros. A separação em domínios ocorre provavelmente devido às características hidrofílicas do HA e hidrofóbicas dos polímeros, PLGA e PLDLA, o que dificulta a mistura das cadeias poliméricas.

A análise por FTIR teve como objetivo comprovar a presença do HA nos filmes de PLDLA-HA, PLDLA-HAADH e PLGA-HA, PLGA-HAADH, porém, analisando os espectros obtidos, não foi possível tal observação. Uma hipótese é que, nos filmes em que ocorreu a enxertia do HA, a concentração deste é muito baixa. Como sugestão para a próxima etapa do trabalho, a análise poderá ser realizada empregando o recurso de microATR, que permite análise pontual na amostra sob ampliação, para tentativa de visualizar os domínios, nas regiões específicas dos filmes identificadas na microscopia, onde provavelmente correspondem as regiões com maior concentração de HA.

Para os filmes submetidos à enxertia de HA, pela análise de TGA, foi possível verificar que, para ambos os polímeros PLDLA e PLGA, os procedimentos de enxertia de HA resultaram em amostras com menor temperatura de degradação, conforme pode ser verificado na Tabela 2. Outro aspecto observado é a perda d'água, presente apenas nas amostras com HA e HAADH, pode ser mais um indicativo da enxertia. A presença de água se deve, provavelmente, ao fato de o HA ser bastante hidrofílico e absorver a umidade do ar durante a permanência da amostra fora da câmara de vácuo, durante a realização do experimento.

Já, pela análise de DSC, foi possível comprovar provável enxertia apenas para o caso do PLGA-HA e PLGA-HAADH, uma vez que para estes

filmes foi constatada a presença de pico de cristalização acima da TG do PLGA e dois picos de fusão, para temperaturas de aproximadamente 140°C e 157°C em ambas as amostras. Tais resultados serão mais explorados para confirmar a influência do HA na morfologia do PLGA. Uma hipótese é a da atuação do HA como agente nucleante.

Finalmente, a determinação de intumescimento e molhabilidade à água permitiram comprovar que foi possível enxertar HA em matrizes de PLDLA e PLGA. As curvas de intumescimento em água para os diferentes polímeros são mostradas na Figura 26. Nesta avaliação, foi possível observar que os polímeros com enxertia de HA apresentaram maior intumescimento do que os polímeros puros. É importante destacar que PLDLA-HA e PLDLA-HAADH apresentaram resultados de intumescimento superiores aos encontrados para PLGA-HA e PLGA-HAADH, podendo ser um fator a ser considerado na futura seleção do material para revestimento dos protótipos. Não foi possível identificar alterações de espessura significativas após este experimento que, neste caso, não seria uma reação interessante, caso ocorresse no dispositivo depois de implantado, por exemplo, pois os stents para aplicações em coronárias devem apresentar as menores espessuras possíveis.

Com relação à molhabilidade à água, medida por ângulo de contato, as amostras apresentam importantes diferenças, quando comparadas às amostras com enxertia de HA e HAADH e às amostras controle, isto é, polímeros não submetidos à enxertia. A Figura 33 deixa claro que os polímeros PLDLA-HAADH e PLGA-HAADH se mostraram mais hidrofílicas do que os controles, indicativos de sucesso na enxertia do HA, que apresenta

elevada característica hidrofílica, ao contrário dos materiais PLGA e PLDLA como descrevem Rezende e colaboradores, 2003.

O ADH tem a função de modificar o HA quimicamente, deixando radicais amina ligados à cadeia do HA, os quais, por sua vez, podem promover a ligação deste com o polímero matriz. Desta maneira, o HA estaria não apenas misturado ao polímero, mas ligado quimicamente, isto é, enxertado ao polímero matriz, como apresentado por Park e colaboradores na Figura 35 (Park et al., 2009). Desta forma, a enxertia do HA foi mais eficiente para o HA quimicamente modificado com ADH (PLDLA-HAADH e PLGA-HAADH), quando comparado aos polímeros que seguiram o protocolo que não passava por esta modificação (PLDLA-HA e PLGA-HA).

Figura 35: Reações químicas da metodologia elaborada por Park e colaboradores, 2009, para enxertia do HA no PLGA: A) Modificação do HA com ADH B) Adição de NHS ao PLGA C) Formação do PLGA-HAADH.

O processo de *dip coating* se mostrou interessante para os revestimentos estudados neste trabalho. Foi possível verificar a deposição de filmes de espessura bem reduzida, não detectada pelo método de medição do

micrômetro digital. Estudos complementares com microscopia eletrônica de varredura, por exemplo, serão de grande importância na caracterização da espessura dos filmes de revestimento depositados nos tubos e placas de PLLA.

5.4 Considerações finais.

Como sugestões para trabalhos futuros, em relação às propriedades mecânicas do material para a estrutura central do stent, serão realizados estudos para determinação da melhor composição, aliando as características mais rígidas do PLLA com seu copolímero PLDLA de características borrachosas, além de desenho e simulação computacional da estrutura do modelo para melhoria das propriedades mecânicas (colaboração: BioMechanical Engenharia Biomedica[®]).

Com relação ao revestimento, serão realizados os estudos de liberação do ácido hialurônico e degradação dos polímeros carregadores *in vitro* (colaboração: CEAC-IDPC, UFABC e PUC-SP)

Estes próximos resultados possibilitarão o início dos estudos de otimização dos processos de fabricação da estrutura central (extrusão e corte a laser ou impressão 3D) e dos revestimentos (*dip coating* ou eletrofiação).

Agradecimentos: À Profa. Dra. Eliana Duek e equipe do Laboratório de Biomateriais da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo por ceder os polímeros utilizados neste trabalho e auxiliar na caracterização.

À Profa. Dra. Sônia Maria Malmonge pela coorientação e equipe da Universidade Federal do ABC pelo auxílio na realização dos os experimentos do presente projeto.

À CAPES pelo apoio financeiro durante o projeto.

6. CONCLUSÕES

Quanto à microestrutura, foi possível identificar que o filme de PLLA, obtido pelo processo de evaporação de solvente nas condições empregadas neste trabalho, apresenta aspecto de polímero com alta cristalinidade, enquanto que os filmes de PLDLA e PLGA apresentaram aspectos de material amorfo.

Quanto ao desempenho mecânico estrutural dos polímeros em estudo, o PLLA apresentou maiores valores de módulo elástico e maior resistência à tração do que os PLDLA e PLGA. Desta forma, é possível concluir que o PLLA apresenta características para uso como biomaterial na fabricação da estrutura central do stent, enquanto que os polímeros PLDLA e PLGA apresentam características para uso como biomaterial de revestimento de stent.

Foi possível concluir que não ocorrem alterações na microestrutura, propriedades térmicas e propriedades mecânicas dos materiais PLLA, PLDLA e PLGA após os processos de esterilização por UV e por plasma, indicando a estabilidade das amostras a estes processos. Também foi possível confirmar a esterilidade das amostras após os dois processos estudados, já na conformação de tubo, característica do protótipo.

Por fim, foi possível confirmar a enxertia do HA e HAADH nos polímeros PLDLA e PLGA através dos dois protocolos empregados. De forma indireta, pelos resultados de FTIR e TGA, com a detecção da presença de água nas

amostras com HA. De forma direta, com os resultados de molhabilidade e intumescimento, com valores superiores para os revestimentos com HAADH.

Desta forma, este trabalho possibilitou o desenvolvimento dos modelos físicos biorreabsorvíveis, com dimensões semelhantes aos stents coronários, feitos de PLLA, revestidos com PLGA e PLDLA com enxertia do HA e HAADH, estáveis aos processos de esterilização por radiação ultravioleta e plasma de peróxido de hidrogênio.

**ANEXO A – Gráficos dos resultados dos ensaios de tensão x
deformação sob tração.**

Gráfico 1: Resultados do ensaio de tensão x deformação sob tração: Gráfico tensão [MPa] x deformação [%] para o PLLA sem esterilização.

Gráfico 2: Resultados do ensaio de tensão x deformação sob tração: Gráfico tensão [MPa] x deformação [%] para o PLLA com esterilização por UV.

Gráfico 3: Resultados do ensaio de tensão x deformação sob tração: Gráfico tensão [MPa] x deformação [%] para o PLLA com esterilização por plasma.

Gráfico 4: Resultados do ensaio de tensão x deformação sob tração: Gráfico tensão [MPa] x deformação [%] para o PLDLA sem esterilização.

Gráfico 5: Resultados do ensaio de tensão x deformação sob tração: Gráfico tensão [MPa] x deformação [%] para o PLLA com esterilização por UV.

Gráfico 6: Resultados do ensaio de tensão x deformação sob tração: Gráfico tensão [MPa] x deformação [%] para o PLDLA com esterilização por plasma.

PLGA sem esterilização

Gráfico 7: Resultados do ensaio de tensão x deformação sob tração: Gráfico tensão [MPa] x deformação [%] para o PLGA sem esterilização.

PLGA UV

Gráfico 8: Resultados do ensaio de tensão x deformação sob tração: Gráfico tensão [MPa] x deformação [%] para o PLGA com esterilização por UV.

Gráfico 9: Resultados do ensaio de tensão x deformação sob tração: Gráfico tensão [MPa] x deformação [%] para o PLGA com esterilização por plasma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abizaid A C. Stents Farmacológicos: Avanços e Perspectivas. Novas Plataformas e Stents Bioabsorvíveis; a Questão do Polímero e Novos Fármacos. Tese de livre docência apresentada à Universidade de São Paulo –SP 2011.

Abizaid A, Ribamar Costa R J Jr, Bartorelli AL, Whitbourn R, van Geuns RJ, Chevalier B, Patel T, Seth A, Stuteville M, Dorange C, Cheong WF, Sudhir K, Serruys PW; The ABSORB EXTEND study: preliminary report of the twelve-month clinical outcomes in the first 512 patients enrolled. *EuroIntervention*. Apr;10(12):1396-401. doi: 10.4244/EIJV10I12A243, 2015.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - NBR15245 de 07/2005 Produtos para saúde - Validação e controle de rotina de esterilização por óxido de etileno.

Abreu, L. F.; Faria, J. A. F. Evaluation of a system for chemical sterilization of packages. *Packaging Technology and Science*, v. 17, p. 37-42, 2004.

Abu-Assi E, Castiñeira-Busto M, González-Salvado V, Raposeiras- Roubin S, Riziq-Yousef Abumuaileq R, Peña-Gil C, Rigueiro-Veloso P, Ocaranza R, García-Acuña JM, González-Juanatey JR. Coronary Artery Dominance and Long-term Prognosis in Patients With ST-segment Elevation Myocardial Infarction Treated With Primary Angioplasty. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. pii: S1885-5857(15)00217-0. doi: 10.1016/j.rec.2015.04.010, 2015.

Arnal-Pastor M C, Martínez R, M. Garnés P, Monleón-Pradas M, Lluch V A. Electrospun adherent–antiadherent bilayered membranes based on cross-linked hyaluronic acid for advanced tissue engineering applications. / *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 4086–4093, 2013.

Bland J H, Cooper S M; Osteoarthritis: a review of the cell biology involved and evidence for reversibility. Management rationally related to known Genesis and pathophysiology. *SeminArthritis Rheum* 14:106-133, 1984.

Braunwald E. Coronary blood flow and myocardial ischaemia. In: Braunwald E. Heart Disease - A textbook of cardiovascular medicine. Philadelphia, Elsevier Saunders 7a ed. 1103-1127, 2005.

Cannon CP, McCabe CH, Wilcox RG, Bentley JH, Braunwald E, for the OPUS-TIMI 16 Investigators. Association of White Blood Cell Count With Increased Mortality in Acute Myocardial Infarction and Unstable Angina Pectoris. *Am J Cardiol*; 87: 636-9, 2001.

Cardoso, C. F. Avaliação da esterilização de filme de polietileno com peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

Carvalho. K.C.N. A Esterilização. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campus de Dourado. 2002.

Charpentier E, Barna A, Guillevin L, Juliard JM. Fully bioresorbable drug-eluting coronary scaffolds: A review. *Arch Cardiovasc Dis*. 2015 Jun-Jul;108(6-7):385-97. doi: 10.1016/j.acvd.2015.03.009. Epub 2015 Jun 22. Review, 2015.

Cheng G, Swaidani S, Sharma M, Lauer ME, Hascall VC, Aronica MA. Hyaluronan deposition and correlation with inflammation in a murine ovalbumin model of asthma. *Matrix Biol.*, 30(2):126-34, 2011.

Cheng J, Pun SH. Polymeric biomaterials for cancer nanotechnology. *Biomater Sci*. 2015 Jul 16;3(7):891-3. doi: 10.1039/c5bm90025e. Epub 10. No abstract available, 2015.

Colombo A, Drzewiecki J, Banning A, Grube E, Hauptmann K, Silber S, et al. Randomized study to assess the effectiveness of slow and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions. *Circulation*; 108:788-94, 2003.

Da luz P L, Favarato D, Doença coronária crônica. *Arq Bras Cardiol* volume 72, (nº 1), 1999.

Dallan, P.R.M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da Pele. 2005. 194p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.

Duek, E. A. R.; Zavaglia, C. A. C.; Belangero, W. D. - Polymer, 40, p.6465, 1999.

Entman ML, Ballantyne CM. Inflammation in acute coronary syndrome. Circulation; 88: 800-803, 1993.

Erbetta, C. D. C. et al. - Síntese e caracterização térmica e química do copolímero Poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo) Polímeros, vol. 21, nº 5, p. 376-382, 2011.

Esteban-Torrella P, García de Guadiana-Romualdo L, Consuegra-Sánchez L, Dau-Villarreal D, Melgarejo-Moreno A, Albaladejo-Otón MD, Villegas-García M. Usefulness of copeptin in discarding non-ST elevation acute myocardial infarction in patients with acute chest pain and negative first troponin I. Med Intensiva. pii: S0210-5691(14)00262-9. doi: 10.1016/j.medin.2014.11.008, 2015.

Evanko SP, Potter-Perigo S, Bollyky PL, Nepom GT, Wight TN. Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration. Matrix Biol. Mar;31(2):90-100, 2012.

Farag M., Spinthakis N., Gorog D A., Prasad A., Sullivan K., Akhtar Z., Kukreja N., Srinivasan M. Use of bioresorbable vascular scaffold: a meta-analysis of patients with coronary artery disease. Open Heart;3:e000462. doi:10.1136/openhrt-2016-000462, 2016.

Farhatnia Y, Pang JH, Darbyshire A, Dee R, Tan A, Seifalian AM. Next generation covered stents made from nanocomposite materials: A complete assessment of uniformity, integrity and biomechanical properties. Nanomedicine. 31. pii:S1549-9634 (15) 00145-8. doi:10.1016/ j.nano.2015.07.002, 2015.

Feng, X. D.; Song, C. X.; Chen, W. Y. Synthesis and evaluation of biodegradable bock copolymers of e-caprolactone and DL lactide. Polymer Science, Polymer Letter Ed., v.21, p.593-600, 1983.

Friedman GD, Klatsky AL, Siegelaub AB. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med*; 290: 1275–8, 1974.

Garg S, Serruys P W, Coronary stents: looking forward, *J. Am. Coll. Cardiol.* 56 (10 Suppl.) S43–S78, 2010.

Giessen WV, Lincoff A, Schwartz R, Beusekom HV, Serruys P, Holmes D, et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation*; 94(7):1690–7, 1996.

Gomes, R. C. Doenças Cardiovasculares Causam Quase 30% das Mortes no País. Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>>. Acesso em: 20 novembro 2016.

Gottschall C. A. M. 1929-2009: 80 Anos de Cateterismo Cardíaco – uma História Dentro da História *Rev Bras Cardiol Invas*;17(2):246-68, 2009.

Hernández F, de la Torre-Hernández JM, Rumoroso Cuevas JR, García del Blanco B, Martínez-Sellés M, Trillo Nouche R. 2014 update on interventional cardiology. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2015 Apr;68(4):324-30. doi: 10.1016/j.rec.2014.12.009. Epub 2015.

Hubbart W C, M Johnson, H Gong, B T Gabelt, J A Peterson, R Sawhney, T Freddo, P L Kaufman. Intraocular pressure and outflow facility are unchanged following acute and chronic intra cameral chondroitinase ABC and hyaluronidase in monkeys. *Exp. Eye Res* 665: 177-190, 1997.

Ignatius, A. A.; Claes, L. E. – *Biomaterials*, 17, p.831, 1996.

ISO - International Organization for Standardization: ISO 11135-1:2007- Sterilization of health care products - Ethylene oxide - Part 1: Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices.

James A. Airway remodeling in Asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 11: 1-6, 2005.

Junqueira L C U, Carneiro J; *Biologia Celular e Molecular*. 8 edição, editor Guanabara Koohan, 2008.

Khan W, Farah S, Domb AJ. Drug eluting stents: developments and current status. *J Control Release*;161:703-12, 2012.

Kraak RP, Hassell ME, Grundeken MJ, et al. Initial experience and clinical evaluation of the Absorb bioresorbable vascular scaffold (BVS) in real-world practice: the AMC Single Centre Real World PCI Registry. *EuroIntervention*;10:1160–8, 2015.

Lakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, Ge L, Sangiorgi GM, Stankovic G, Airolidi F, Chieffo A, Montorfano M, Carlino M, Michev I, Corvaja N, Briguori C, Gerckens U, Grube E, Colombo A. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA*. May 4;293(17):2126-30, 2005.

Lange R. A., L.D. Hillis, Second-generation drug-eluting coronary stents, *N. Engl. J. Med*. 362 (18) 1728–1730, 2010.

Lerouge, S. Tabrizian, M. Wertheimer, M.R. Marchand, R. Yahia, L. Safety of plasma-based sterilization: Surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes. *Bio-Medical Materials and Engineering*, Volume 12, Number 1, pp. 3-13(11), 2002.

Lewis, Peter Rhys, Reynolds, K and Gagg, C, *Forensic Materials Engineering: Case studies*, CRC Press, 2004

Libby P, Ross R. Fuster V, Ross R, Topol EJ. Eds. Cytokines and growth regulatory molecules in Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. Vol. I. Philadelphia: Lippincott-Ravn: 585-94, 1996.

Lin, A. S. P.; Barrows, T. H.; Cartmell, S. H.; Guldborg, R. E. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials*, v.24, n.3, p.481-489, 2003.

Lincoff AM, Furst JG, Ellis SG, et al. Sustained local delivery of dexamethasone by a novel intravascular eluting stent to prevent restenosis in the porcine coronary injury model. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:808–816, 1997.

Lostocco, M. R.; Murphy, C. A.; Cameron, J. A.; Huang, S. J. The effects of primary structure on the degradation of poly(e-caprolactone) / poly(L-lactide) block copolymers. *Polymer degradation and Stability*, v.59, p.303-307, 1998.

Lotufo PA, Lolio CA - Coronary heart disease mortality trends in São Paulo, Brazil .*CVD Epidemiol Newsletter*; 49: 150-1, 1994.

Mani G., Marc D. Feldman, Devang Patel, C. Mauli Agrawal, Coronary stents: A materials perspective. 2007.

Mansur AP, Gonçalves EPS, Ramires JAF - Insuficiência coronária crônica.*RBM*; 53: 194-8. 1996.

Martin D. M., F.J. Boyle, Drug-eluting stents for coronary artery disease: a review, *Med. Eng. Phys.* 33 (2) 148–163, 2011.

Mauri L, Silbaugh TS, Wolf RE, Zelevinsky K, Lovett A, Zhou Z, et al. Long-term clinical outcomes after drug-eluting and bare-metal stenting in Massachussetts. *Circulation*;118(18):1817-27, 2008.

McGinty J B; Opetative arthroscopy. Lippincott- Raven, Second Edition: 109, 1996.

Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM - Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Artherosclerosis*; 4: 357-64, 1984.

Myler RK, Stertzer SH. Coronary and peripheral angioplasty: historical perspective. In: Topol EJ, editor. *Textbook of interventional cardiology*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. p. 171–85, 1994.

Nash W A, Potter M C. Resistência dos Materiais. Bookman Editora ed. 5, p 54, 2014.

Newby, A. C. and Zaltsman, A. B., Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. J. Pathol., 190: 300–309. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<300::AID-PATH596>3.0.CO;2-I, 2000.

Nordmann A, Briel M, Bucher HC. Mortality in randomized controlled trials comparing drug-eluting vs. bare metal stents in coronary artery disease: a meta-analysis. Eur Heart J;27(23):2784-814, 2006.

O'Brien B, Zafar H, Ibrahim A, Zafar J, Sharif F. Coronary Stent Materials and Coatings: A Technology and Performance Update. Ann Biomed Eng. 2015.

Onuma Y; Ormiston J; Serruys W P. Bioresorbable Scaffold Technologies. Circ J; 75: 509 – 520 2011.

Park J K, Yeom J, Oh E J, Reddy M, Kim J Y, Cho D, Lim H P, Kim N S, Park S W, Shin H, Yang D J, Park K B, Hahn S K. Guided bone regeneration by poly(lactic-co-glycolic acid) grafted hyaluronic acid bi-layer films for periodontal barrier applications. Acta Biomater 3354-3393, 2009.

Parker T, Dave V, Falotico V, Polymers for drug eluting stents, Curr. Pharm. Des. 16 (36) 3978–3988, 2011.

Pendyala L. K., X. Yin, J. Li, J.P. Chen, N. Chronos, D. Hou, The first-generation drug-eluting stents and coronary endothelial dysfunction, JACC Cardiovasc. Interv. 2 (12)1169–1177, 2009.

Pyörälä K, Backer G, Graham I, Poole-Wilson P, Wood D - Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension. Eur Heart J; 15: 1300-31, 1994.

Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E.; *An Introduction to materials in Medicine*. Academic Press: San Diego, 1^a Ed. 1996.

Rezende, C. A. et al. - Membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 15, n° 3, p. 232-238, 2005.

Rezende, C. A.; Duek, E. A. R. - Blendas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)/poli ácido láctico: degradação in vitro. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 13, nº 1, p. 36-44, 2003.

Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*; 340: 115-26, 1999.

Rutala, W. A. Draft guideline for selection and use of desinfetantes. *Am. Journal of Infectology Control*, 17 (1): 24-A-38-A, 1999.

Santos JR, A.R.; Wada, M.L.F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, p. 308-317, 2007.

Schneider, A. K. Polylactide sutures. U.S. Patent 3636956 to Ethicon Inc., Jan 1972.

Shepherd RFJ, Vlietstra RE. The history of balloon angioplasty. In: Vlietstra RE, Holmes DR, editors. *Percutaneous transluminal coronary angioplasty*. Philadelphia: F.A. Davis Company. p. 1–17, 1987.

Shogren, R. Water vapor permeability of biodegradable polymer. *Journal Environment Polymer Degradation*, v.5, n.2, p.91-95, 1997.

Sigwart, U., Coronary Stents: Growing Up?. *Journal of Interventional Cardiology*, 7: 115–116. doi: 10.1111/j.1540-8183.1994.tb00894.x, 2007.

Simionescu N, Mora R, Vasile E, Lupu F, Filip DA, Simionescu M – Prelesional modifications of the vessel wall in hyperlipidemicatherogenesis. Extracellular accumulation of modified and reassembled lipoproteins. *Ann N Y AcadSci*; 598: 1-16, 1990.

Sionis A, Ruiz-Nodar JM, Fernández-Ortiz A, Marín F, Abu-Assi E, Díaz-Castro O, Nuñez-Gil IJ, Lidón RM. Update on ischemic heart disease and intensive cardiac care. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 68(3):234-41. doi: 10.1016/j.rec.2014.11.008. Epub 2015 Feb 7, 2015.

Slomkowski, S.; Sosnowski, S.; Gadzinowski, M. Polyesters from lactides and ϵ -caprolactone. Dispersion polymerization versus polymerization in solution. *Polymer Degradation Stability*, v.59, p.153-160, 1998.

Sodergard, A.; Stolt, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, v.27, n.41, p.1123-1163, 2002.

Souza J R M, Oliveira R T, Blotta M H S L, Coelho O R. Níveis Séricos de Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-18 (IL-18) e Proteína C Reativa (PCR) na Síndrome Coronariana Aguda sem Supradesnívelamento do ST em Pacientes com Diabetes Tipo 2. *Arq Bras Cardiol*,90(2) 94-99, 2008.

Stack RE, Califf RM, Phillips HR, et al. Interventional cardiac catheterization at Duke Medical Center. *Am J Cardiol*. 1988;62(suppl F):3F 24F, 1988.

Stevens JW. Swarm Chondrosarcoma: A Continued Resource for Chondroblastic-Like Extracellular Matrix and Chondrosarcoma Biology Research. *Connect Tissue Res*.Jun 12. 2013.

Susawa T, Shiraki K, Shimizu Y. Biodegradable intracoronary stents in adult dogs. *J Am Coll Cardiol*. 1993;21:483A. Abstract, 1993.

Tamai H, Gaki K, Kyo E, Kosuga K, Kawashima A, Matsui S, et al. Initial and 6-month results of biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents in humans. *Circulation*;102(4): 399–404, 2000.

Tamburino C, Capodanno D, Evolution of stents: past, present and future, *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther*. 7 (5) 443–446, 2009.

Tan A, Farhatnia Y, de Mel A, et al. Inception to actualization: next generation coronary stent coatings incorporating nanotechnology. *J Biotechnol*;164:151-70, 2013.

Taylor A. Metals. In: Sigwart U, editor. Endoluminal stenting. London: W.B. Saunders Company Ltd. p. 28–33, 1996.

Turner D C, Flier L A, Carbonetto S; Identification of a cell surface protein involved in PC-12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen. *J Neurosci.* 9:3287-3296; 1989.

Tzellos, T. G. et al. Extrinsic aging in the human skin is associated with alterations in the expression of hyaluronic acid and its metabolizing enzymes. *Experimental Dermatology*, v. 18, n. 12, p. 1028-35, 2009.

Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem. Rev.*, v.11, p.3181-3198, 1999.

Vert, M., Chabot, F., Leray, J. L., Christel, P. Stereoregular bioresorbable polyesters for orthopedic surgery. *Makromolekulare Chemie*, v.5, p.30-41, 1981.

Wolf MG, Moliterno D, Lincoff A, Topol E. Restenosis: an open file. *Clin Cardiol*;19(5):347–56, 1996.

Yamawaki T, Shimokawa H, Kozai T. Intramural delivery of a specific tyrosine kinase inhibitor with biodegradable stent suppresses the restenotic changes of the coronary artery in pigs in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:780 –786, 1998.

Yin R., Yang D., Wu J., Nanoparticle Drug- and Gene-eluting Stents for the Prevention and Treatment of Coronary Restenosis. *Theranostics.* 4(2):175-200. doi: 10.7150/thno.7210, 2014.

Yoo H S et al. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 26 1925–1933, 2005.

Zhang, L.; Xiong, C.; Deng, X. – *J Appl Polym Sci*, 56, p.103,1995.

Zhao m y, Li L H, Li B, Zhou C R. LBL coating of type I collagen and hyaluronic acid on aminolyzed PLLA to enhance the cell-material interaction– *eXPRESS Polymer Letters* Vol.8, No.5 (2014) 322–335, 2014.

Żurkowski A, Buszman PP, Milewski KP, Janas A, Gorycki B, Kondys M, Gąsior P, Michalak M, Boxberger M, Peppas A, Granada JF, Buszman PE. Stenting and Adjunctive Delivery of Paclitaxel Via Balloon Coating Versus Durable Polymeric Matrix for De Novo Coronary Lesions: Clinical and Angiographic Results from the

Prospective Randomized Trial. J Interv Cardiol. 2015 Aug;28(4):348-57. doi: 10.1111/joic.12210, 2015.