

Adsorção de Fibronectina a Arcabouços de Polihidroxibutirato Aplicáveis à Engenharia Óssea

Roberta H. Mendonça, Rossana M. S. M. Thiré, Marysilvia F. da Costa,
PEMM-COPPE, UFRJ

Fernando C. S. Filho
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, UFRJ

Resumo: Fibronectina sérica humana foi adicionada à superfície de arcabouços de polihidroxibutirato (PHB) a fim de otimizar a adesão de osteoblastos humanos (HOB). Visando a criar sítios para a imobilização de fibronectina (FN), os arcabouços foram previamente tratados por meio de reação com etilenodiamina. O tratamento modificou a morfologia e a composição química dos arcabouços, possibilitando um aumento no teor de FN adsorvido à superfície. Imagens de AFM mostraram que as moléculas de FN assumiram conformações distintas, de acordo com a superfície na qual foi imobilizada. A FN adicionada aos arcabouços não modificados possivelmente assumiu uma conformação estendida, expondo os grupamentos RGD. Com isso, houve um aumento na adesão de HOB a estes materiais. Por outro lado, a FN na superfície dos arcabouços previamente tratados possivelmente apresentou-se na forma compacta, suprimindo a adesão de HOB.

Palavras-chave: Polihidroxibutirato, engenharia óssea, biomateriais, modificação de superfície.

Adsorption of Fibronectin onto Polyhydroxybutyrate Scaffolds Applied to Bone Engineering

Abstract: Human plasma fibronectin (FN) was adsorbed onto the surface of polyhydroxybutyrate (PHB) scaffolds with aim of improving adhesion of human osteoblasts (HOB). PHB scaffolds were modified via reaction with ethylenediamine in order to create sites for FN immobilization. Morphological and chemical composition changes were observed for treated scaffolds which led to an increase in the concentration of FN adsorbed onto scaffold surfaces. AFM images showed that FN molecules assumed distinct conformation according to the surface to which they were adsorbed. It is believed that the FN molecules added to non-treated scaffolds assumed an unfolded conformation owing to the exposure of their RGD domains, thus promoting an increased HOB adhesion. On the other hand, FN molecules which were added to the surface of previously treated scaffolds are believed to have assumed a folded conformation, hiding some RGD domains and inhibiting HOB adhesion.

Keywords: Polyhydroxybutyrate, bone engineering, biomaterials, surface modification.

Introdução

Atualmente, tem sido dada muita atenção à reconstrução de ossos humanos, uma vez que, o uso de enxertos ósseos em práticas clínicas tem apresentado alguns inconvenientes, como exemplificado em^[1]. A engenharia de tecidos ósseos pode, potencialmente, prover soluções para tais problemas com a utilização de arcabouços porosos temporários que tem por função sustentar e direcionar a formação do tecido ósseo^[2-4]. A seleção do material adequado para a confecção desses arcabouços é um critério importante, pois a natureza química do material tem influência sobre sua biocompatibilidade^[5]. Dentre os polímeros biodegradáveis que vêm sendo estudados para a produção de arcabouços, destaca-se o polihidroxibutirato (PHB). Trata-se de um po-

liéster natural de origem bacteriana, biocompatível a vários tipos celulares tais como osteoblastos, células epiteliais e condrócitos^[2,4,6,7].

O sucesso do uso de arcabouços em engenharia óssea depende da manutenção de uma interface apropriada à formação de tecido ósseo, visto que as propriedades de superfície, dos biomateriais e das células influenciam os eventos observados na interface célula-material resultando ou não na biocompatibilidade^[8]. A modificação de superfície dos biomateriais aparece como uma alternativa para regular os eventos interfaciais sem alterar suas propriedades mecânicas. Neste contexto, estratégias biomiméticas vêm sendo empregadas. A principal delas consiste na imobilização de proteínas ou peptídeos biologicamente ativos na superfície de biomateriais. A adsorção de fibronectina (FN), uma das

Autor para correspondência: Roberta H. Mendonça, PEMM/COPPE, UFRJ, Caixa Postal 68505, CEP: 21941-972, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
E-mail: robertahm@metalmat.ufrj.br

principais proteínas de matriz extracelular, e/ou de uma de suas seqüências de peptídeos RGD (arginina – glicina – ácido aspártico) à superfície dos biomateriais, por exemplo, pode promover a adesão celular mediada por integrinas^[4,8,9]. Os osteoblastos humanos (HOB) e seus precursores produzem fibronectina e interagem com esta proteína pela formação de adesões focais^[8]. Desta forma, as propriedades de superfície de arcabouços podem ser melhoradas através da biomimetização utilizando FN. No entanto, um dos pontos críticos da imobilização de FN é a conservação da sua bioatividade^[9].

A imobilização de proteínas na superfície de materiais poliméricos requer, freqüentemente, a presença de grupos funcionais específicos, tais como carboxila, amino e epóxi^[9]. Este processo é dependente da molhabilidade, da química de superfície e da topografia do substrato^[10]. Sendo assim, a preparação da superfície de polímeros para a imobilização de proteínas, em geral, envolve a ativação e/ou a inserção destes grupos funcionais específicos^[11]. Exemplos de ativação da superfície através de tratamentos químicos são encontrados na literatura^[6,12]. Thiré e colaboradores^[6] utilizaram um tratamento químico via úmida com base na aminólise por etilenodiamina para introduzir grupamentos amino e hidroxílicos na superfície de filmes de PHB. A aminólise envolveu a reação entre um grupo amino da diamina e o grupo éster do PHB ($-\text{COO}-$) para formar uma ligação covalente ($-\text{CONH}-$ e/ou $-\text{CONH}_2-$). O outro grupo amino não reagido ficou livre. Durante este processo, grupos hidroxilas (oriundos da reação de hidrólise) também foram incorporados à superfície do poliéster^[11,12].

O presente trabalho teve como objetivo ativar biologicamente a superfície de arcabouços de PHB por meio da adsorção de FN. Foi avaliada a influência da modificação prévia dos arcabouços via reação com etilenodiamina.

Experimental

Preparo dos arcabouços de PHB: PHB, em forma de pó branco, com massa molar (M_w) de 524.000 g.mol⁻¹ foi fornecido pela PHB Industrial S/A (São Paulo, Brasil). Os arcabouços foram preparados pela técnica de lixiviação de sal/evaporação do solvente, com base no procedimento descrito em^[13]. Solução de PHB em clorofórmio (grau PA; Vetec Química Fina Ltda) a 10% (p/v) foi preparada sob refluxo a 63 °C. A solução foi adicionada a moldes de vidro contendo o agente porogênico, cloreto de sódio (grau PA; Vetec Química Fina Ltda) na faixa granulométrica de 75-125 µm. Foram utilizadas composições com 60% (p/p) em relação à massa do polímero. A mistura cloreto de sódio/solução de PHB foi seca em dessecador a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram imersas em água destilada por 48 horas para a remoção das partículas de sal e conseqüente formação dos poros. Os arcabouços (A_{PHB}) produzidos foram secos a temperatura ambiente.

Análise termogravimétrica (TGA): Para quantificar o resíduo salino após o processo de lixiviação de sal, amostras

de A_{PHB} finamente trituradas foram analisadas em analisador termogravimétrico modelo PYRIS 1 (Perkin Elmer). A análise foi conduzida em atmosfera de nitrogênio a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min até atingir 700 °C.

Tratamento com etilenodiamina: Os A_{PHB} foram imersos em 50 mL de solução aquosa de etilenodiamina 0,1 N por 45, 90 e 120 minutos a 50 °C. Os arcabouços modificados com etilenodiamina ($A_{\text{PHB-ET}}$) foram lavados com água destilada a temperatura ambiente e, em seguida, foram imersos em água destilada gelada por 24 horas para remoção do excesso de etilenodiamina^[6].

Adsorção de fibronectina (FN): Solução estoque de fibronectina sérica humana (Sigma) foi diluída para concentração final de 10 µg/cm³, em pH 4,5 (ajustado com ácido acético glacial (Merck)), utilizando tampão acetato de sódio 20 mM (Reagen). As superfícies dos arcabouços sem modificação (A_{PHB}) e dos arcabouços tratados quimicamente ($A_{\text{PHB-ET}}$) foram colocadas em contato com 25 µL da solução de fibronectina (FN) por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas em meio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM) sem soro (GIBCO) para remoção da proteína não adsorvida^[8]. Nesta etapa, foram obtidos arcabouços de PHB sem modificação contendo FN adsorvida à superfície ($A_{\text{PHB}}^{\text{FN}}$) e arcabouços de PHB modificados com etilenodiamina contendo FN adsorvida à superfície ($A_{\text{PHB-ET}}^{\text{FN}}$).

Dosagem de proteína: Os arcabouços A_{PHB} , $A_{\text{PHB-ET}}$, $A_{\text{PHB}}^{\text{FN}}$ e $A_{\text{PHB-ET}}^{\text{FN}}$ foram lavados com DMEM sem soro. Em seguida, foram incubados em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 5% por 30 minutos para remoção da FN. O teor de FN associada às superfícies foi avaliado por espectrofotometria ($\lambda = 550$ nm), utilizando método de Bradford^[14]. As análises foram feitas em triplicata.

Associação de células HOB à superfície de arcabouços: Células previamente incubadas com timidina triciada (³H]-timidina) (10⁶ células/mL) foram adicionadas à superfície dos arcabouços A_{PHB} , $A_{\text{PHB-ET(90 minutos)}}$ e $A_{\text{PHB-ET}}^{\text{FN}}$ por 120 minutos. Os arcabouços foram lavados com solução PBS e incubados em solução de NaOH 0,1% para lisar as células. Os arcabouços com as células marcadas radioativamente foram inoculados em meio contendo o fluido de contagem (Cytoscint, ICN Biomedicals). A adesão de HOB às superfícies foi estimada através da contagem da radiação associada aos arcabouços em contador de cintilação líquida (1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, LKB Wallac)^[8]. As análises foram feitas em triplicata.

Análise morfológica e micro-análise elementar: A análise da morfologia dos arcabouços foi conduzida em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM (modelo 6460 LV). A micro-análise elementar da superfície dos arcabouços de PHB foi realizada por espectrometria por dispersão de energia de raios X – EDS. Para a análise da seção transversal, as amostras foram fraturadas em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro obtida por pulverização a vácuo (20 mA por 2 minutos). As micrografias foram obtidas a voltagens de 10 kV ou 15 kV.

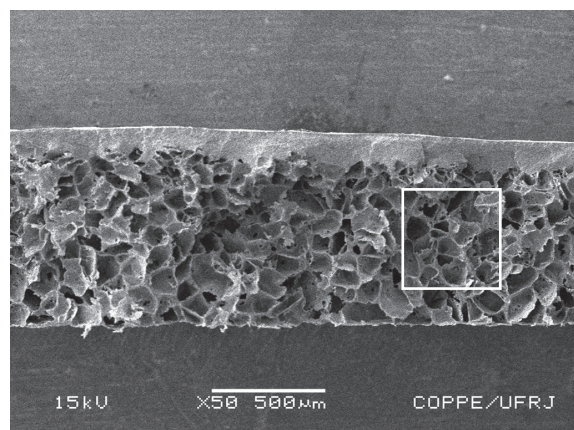
Microscopia de força atômica (AFM): As análises de AFM foram conduzidas no microscópio de força atômica JPK Nanowizard. A morfologia dos arcabouços antes e após a modificação foi analisada em modo de contato intermitente utilizando agulhas de nitreto de silício (MikroMasch™ NSC16) montadas em uma haste com constante de mola igual a 40 N/m e frequência de ressonância de 170 kHz. Os arcabouços foram fixados em suporte de vidro com fita dupla face e as imagens de AFM foram obtidas em ar. A determinação da rugosidade RMS (rugosidade média quadrática) foi feita com auxílio do software do equipamento e com base em imagens de topografia de 20 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$.

Resultados e Discussão

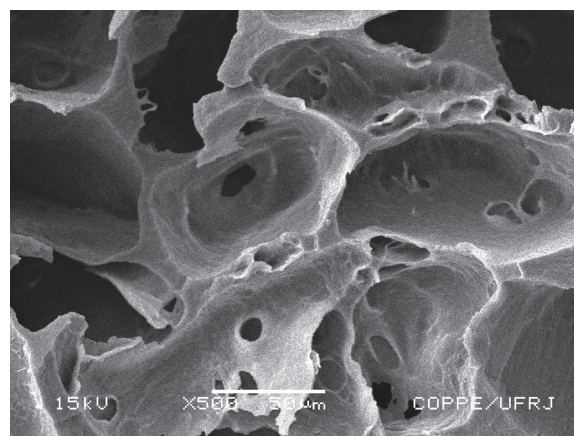
Produção dos arcabouços: Foram produzidos arcabouços porosos de PHB (A_{PHB}) com diâmetro médio de 9 mm e espessura média de 0,92 μm , medidos com micrômetro (Mitutoyo n° 293-265, Mitutoyo Corp.). Imagens típicas da superfície de fratura e da superfície externa formada em contato com o ar de um A_{PHB} são apresentadas na Figura 1. Foi observado que o A_{PHB} produzido nestas condições apresenta uma estrutura heterogênea formada por uma camada densa, localizada na porção superior do arcabouço (interface com o ar), e por uma camada porosa localizada na porção inferior (fundo do molde) (Figura 1a). Supõe-se que a quantidade de sal utilizada não tenha sido suficiente para preencher todo o volume da solução polimérica depositada no molde^[14], levando à decantação das partículas no fundo do molde, com conseqüente formação desta estrutura. A espessura da capa densa pode ser modificada de acordo com a proporção de agente porogênico utilizado, ou seja, quanto maior a proporção de agente porogênico menor será a espessura da capa densa^[2]. Foram formados poros poligonais, que refletem a geometria do agente porogênico, como pode ser evidenciado no detalhamento da região porosa (Figura 1b). O tamanho de poros variou de 71 a 135 μm (valores estimados por análise de imagens). A presença de poros nos arcabouços é de fundamental importância para a formação do novo tecido, uma vez que eles permitem a migração e proliferação das células, assim como a vascularização.

A Figura 1c mostra a superfície externa formada em contato com o ar. Esta superfície apresentou uma morfologia homogênea, onde podem ser observadas estruturas alongadas possivelmente relacionadas às cadeias poliméricas. A análise de TGA mostrou que mais de 98% do sal foi removido na etapa de lixiviação.

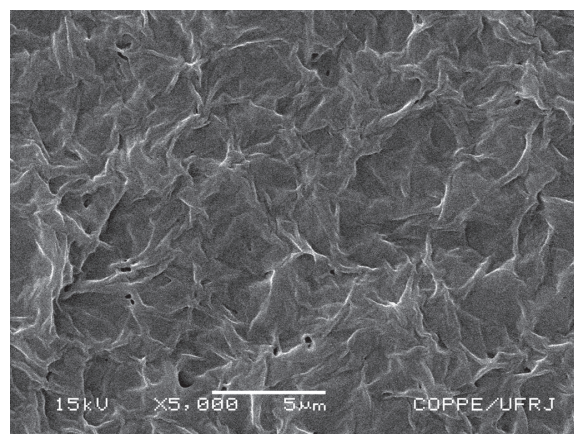
Tratamento com etilenodiamina: Dados referentes à composição atômica dos arcabouços são apresentados na Tabela 1. A presença de nitrogênio nos $A_{\text{PHB-ET}}$ confirmou a incorporação de grupos aminados aos arcabouços após 90 minutos de reação, uma vez que o A_{PHB} não apresentou nitrogênio em sua composição. A incorporação de nitrogênio ao arcabouço aumentou com o tempo de tratamento. Esta tendência tam-



(a)



(b)



(c)

Figura 1. Micrografias eletrônicas de varredura da superfície de fratura do arcabouço de PHB (a) e (b) detalhe da região ressaltada em (a) e da superfície de arcabouço de PHB formada em contato com o ar (c).

Tabela 1. Composição atômica da superfície de arcabouços de PHB antes e após o tratamento com etilenodiamina por diferentes tempos.

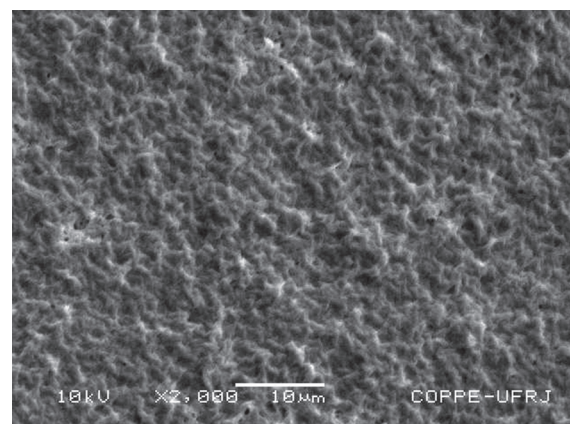
| Composição atômica (% a/a) | | | |
|----------------------------------|-------|-------|-------|
| Arcabouços de PHB | C | O | N |
| A_{PHB} | 75,58 | 24,42 | - |
| $A_{\text{PHB-ET(45 minutos)}}$ | 75,64 | 24,36 | - |
| $A_{\text{PHB-ET(90 minutos)}}$ | 67,27 | 22,60 | 10,13 |
| $A_{\text{PHB-ET(120 minutos)}}$ | 63,94 | 22,08 | 13,98 |

bém foi observada por Thiré et al.^[6] ao avaliar o efeito do tratamento com etilenodiamina na composição química de filmes de PHB por espectrometria de raios X (XPS)^[6]. Duas hipóteses podem ser sugeridas a fim de explicar a ausência de nitrogênio nos arcabouços $A_{\text{PHB-ET (45 minutos)}}$: 45 minutos pode não ter sido tempo suficiente para ocorrência da aminólise ou o teor de nitrogênio presente na superfície ficou abaixo do limite de detecção do método.

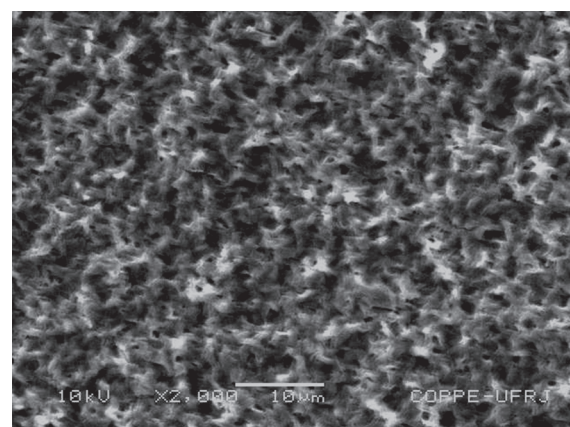
Na Figura 2 são mostradas micrografias da superfície dos arcabouços após tratamento por a) 45 minutos; b) 90 minutos; e c) 120 minutos. A reação com etilenodiamina modificou a superfície dos arcabouços. Aparentemente, ocorreu quebra das cadeias poliméricas superficiais em função do aumento do tempo de reação, evidenciada pela diminuição das estruturas alongadas observadas (atribuídas às cadeias poliméricas). Além disso, pequenos poros foram formados em decorrência do tratamento químico, sendo que uma quantidade maior de poros foi observada após 120 minutos de exposição do arcabouço à solução de etilenodiamina (Figura 2c). Imagens de MEV da superfície de fratura dos arcabouços modificados com etilenodiamina (não apresentadas) mostraram que a aminólise não alterou a estrutura de poros dos arcabouços.

Adsorção de fibronectina: Estudos anteriores^[8] mostraram que filmes de FN formados a pH 4,5 induziram a interação entre HOB e FN com maior intensidade. Partindo dessa premissa, no presente trabalho, os filmes de FN foram obtidos a pH 4,5. Do ponto de vista quantitativo, $(94,7 \pm 3,47)\%$ de FN foi adsorvida à superfície dos A_{PHB} . Para os arcabouços tratados com etilenodiamina por 90 minutos $(132,3 \pm 14,52)\%$ de FN foi adsorvida à superfície do suporte. A maior adsorção de FN aos $A_{\text{PHB-ET}}$ pode ser atribuída à presença dos grupos amino, hidroxila e carbonila introduzidos na superfície, além das modificações morfológicas decorrentes da reação com etilenodiamina. Outros autores^[9,15] também observaram que a densidade de FN adicionada à superfície contendo grupos amino é maior do que àquela relacionada à superfície que não os contém. Segundo eles, a adsorção de FN às superfícies que não contêm grupos funcionais livres, como é o caso do A_{PHB} , é menor devido à tendência de saturação, ou seja, existe um ponto específico, determinável por isotermas de adsorção, onde não mais ocorre adsorção da proteína^[9,15].

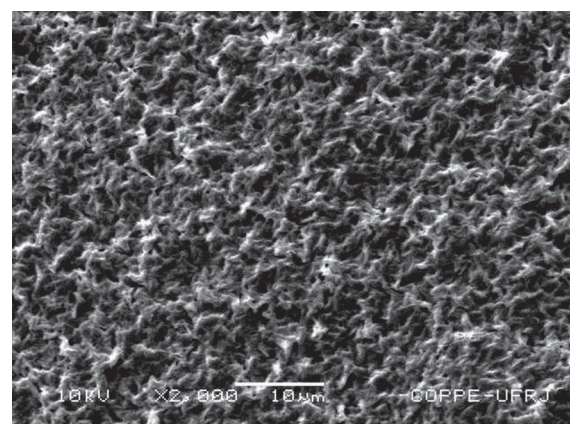
A Figura 3 mostra as imagens típicas de AFM da superfície de a) A_{PHB} ; b) $A_{\text{PHB}}^{\text{FN}}$; c) $A_{\text{PHB-ET(90 minutos)}}$; e d) $A_{\text{PHB-ET(90 minutos)}}^{\text{FN}}$ e seus valores de rugosidade RMS: (126 ± 18) nm, (133 ± 17) nm, (147 ± 9) nm e (155 ± 12) nm, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os valores de rugosidade RMS dos arcabouços antes e após as modificações com etilenodiamina e FN. Observa-se que, de forma semelhante às imagens obtidas por MEV (Figura 1a), a imagem de AFM do A_{PHB} confirma que a morfologia da superfície é caracterizada por estruturas alongadas (Figura 3a). Após o tratamento com etilenodiamina, essas estruturas permanecem com formato alongado, porém de tamanho reduzido, provavelmente, em decorrência da clivagem das cadeias de PHB (Figura 3b). Quando FN é adicionada à superfície



(a)



(b)



(c)

Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura das superfícies dos arcabouços de PHB modificados com etilenodiamina por: a) 45 minutos; b) 90 minutos; e c) 120 minutos.

dos A_{PHB} (Figura 3b), as estruturas alongadas são pouco visíveis (Figuras 3a, b), dando indício de que a FN possa ter recoberto a superfície do arcabouço. Além disso, no detalhe mostrado na Figura 3b, observam-se regiões mais contínuas, quando comparadas àquelas apresentadas no detalhe da Figura 3a. Desta forma, pode-se supor que a molécula de FN encontra-se estendida sobre a superfície do arcabouço de PHB. Após a adição de FN aos arcabouços tratados com

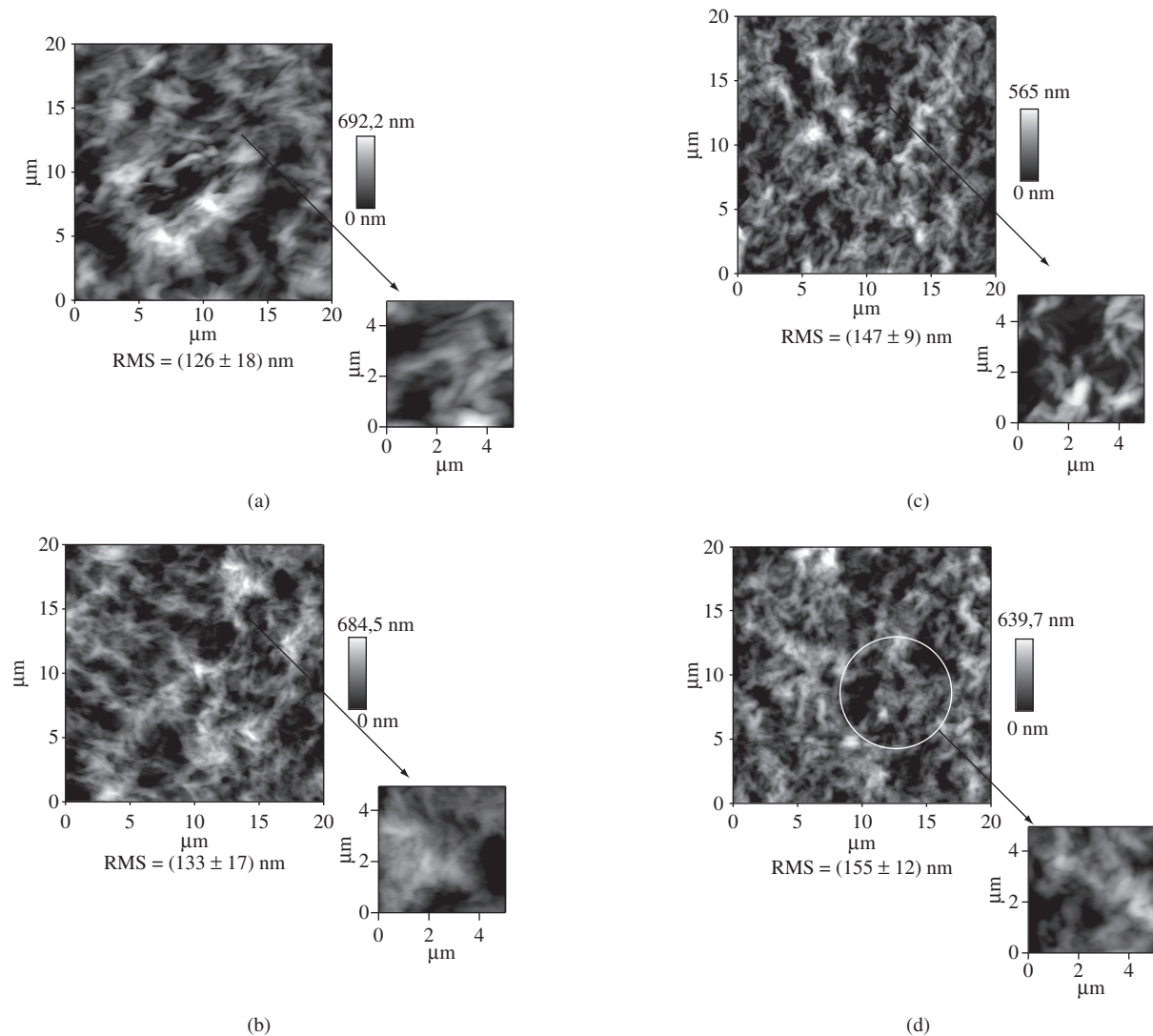


Figura 3. a) Imagens de microscopia de força atômica de arcabouços de PHB antes; b) após recobrimento com fibronectina; c) de arcabouços modificados com etilenodiamina antes; e d) após recobrimento com fibronectina.

etilenodiamina ($A_{\text{PHB(ET-90 minutos)}^{\text{FN}}}$), as estruturas alongadas do PHB são observadas e anexas a elas, encontram-se estruturas arredondadas (indicadas por setas no detalhe da Figura 3d), sugerindo a formação de aglomerados proteicos aderidos às cadeias do PHB. Comparando os detalhes apresentados nas Figuras 3a, b, c, d, pode-se dizer que as moléculas de FN assumiram conformações distintas, de acordo com a superfície na qual foi imobilizada: a FN depositada na superfície do A_{PHB} estaria na sua forma estendida (Figura 3b) e as moléculas depositadas sobre o $A_{\text{PHB(ET-90 minutos)}}$ estariam na sua forma compacta, onde os monômeros apresentam-se dobrados (Figura 3c). A estrutura terciária da FN pode sofrer alterações de acordo com o ambiente no qual se encontra. As conformações assumidas pela FN são determinadas por interações eletrostáticas^[12]. Sendo assim, a diferença observada na morfologia dos filmes pode estar associada, dentre vários fatores, à composição química das superfícies dos arcabouços.

Associação de células HOB à superfície de arcabouços de PHB: A bioatividade da FN foi avaliada por meio de testes

in vitro de adesão de HOB aos arcabouços. Foram obtidos os seguintes valores de adesão: 49,3% para o A_{PHB} ; 83,6% para o $A_{\text{PHB-ET(90 minutos)}}$ e de 26,7% para o $A_{\text{PHB-ET(90 minutos)}^{\text{FN}}}$. O valor de adesão de HOB para o $A_{\text{PHB}}^{\text{FN}}$ foi maior do que o valor obtido para o A_{PHB} . Isto significa que a adição de FN resultou em uma superfície com propriedades adesivas para as células, o que era esperado, uma vez que a FN é um componente de matriz extracelular que age como receptor de adesão^[11]. No entanto, o valor de adesão de HOB obtido para o $A_{\text{PHB-ET(90 minutos)}^{\text{FN}}}$ foi menor do que o obtido para o $A_{\text{PHB}}^{\text{FN}}$ e para o A_{PHB} , embora o teor de FN imobilizada na superfície do $A_{\text{PHB-ET(90 minutos)}^{\text{FN}}}$ tenha sido maior. Muitos estudos têm mostrado que a bioatividade da FN está associada à sua conformação^[8,9]. Zhang e colaboradores verificaram que filmes de FN na sua conformação estendida foram mais efetivos no processo de adesão do que os filmes que se apresentaram dobrados em consequência da funcionalização da superfície^[9]. Como a adsorção de proteínas é sensível às propriedades químicas da superfície, o resultado do teste *in vitro* pode estar relacionado com a possí-

vel diferença de conformação adotada pela FN na superfície dos arcabouços com e sem tratamento com etilenodiamina, conforme observado pelas imagens de AFM (Figura 3). As integrinas presentes na superfície das células reconhecem alguns domínios da FN como, por exemplo, a seqüência de aminoácidos RGD^[15,16]. Quando a FN se encontra na forma compacta, esses domínios deixam de ser expostos, suprimindo a adesão de HOB, como deve ter ocorrido com os arcabouços $A_{\text{PHB-ET}(90 \text{ minutos})}^{\text{FN}}$.

Conclusão

O tratamento químico com etilenodiamina alterou a morfologia e a composição química da superfície dos arcabouços de PHB. Estas modificações levaram a um aumento no teor de FN adsorvido à superfície. No entanto, estes arcabouços previamente modificados e recobertos com FN ($A_{\text{PHB-ET}}^{\text{FN}}$) apresentaram menor adesão de HOB. Provavelmente, as reações de aminólise/hidrólise induziram à dobra da molécula de FN, mudando a exposição dos pontos de adesão. Estes resultados indicam que a conformação adotada pela proteína na superfície do biomaterial possui maior relevância para a bioatividade do que a quantidade adsorvida. Estudos mais detalhados serão conduzidos a fim de identificar os domínios expostos pela proteína.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, a CAPES e ao PRO-CAD/CAPES nº 0001/05-1 pelo apoio financeiro. À PHB Industrial S/A pela doação do PHB.

Referências Bibliográficas

1. Meijer, G. J.; Bruijn, J. D.; Koole, R. & Blitterswijk, C. A. - *Plos Med.*, **4**, p.260 (2007).
2. Hutmacher, D. W. - *Biomaterials*, **21**, p.5960 (2000).
3. Sánchez-Salcedo, S.; Nieto, A. & Vallet-Regí M. - *Chem. Eng. J.*, **137**, p.62 (2008).
4. Kai, Z.; Ying, D. & Chen, G. Q. - *Bioch. Eng. J.*, **16**, p.115 (2003).
5. Lorcan, T. A.; Tosetto, M.; Miller, I. A.; O'Connor, D. P.; Penney, S. C.; Lynch, I.; Keenan, A. K.; Pennington, S. R.; Dawson, K. A. & Gallagher W. M. - *Biomaterials*, **27**, p.3096 (2006).
6. Thiré, R. M. S. M.; Meiga, T.O; Dick, S. & Andrade, L.R. - *Macromol. Symp.*, **258**, p.38 (2007).
7. Yang, X.; Zhao, K. & Chen, G. Q. - *Biomaterials*, **23**, p.1391 (2002).
8. Costa, F. S. & Mendes, G. C. - *Mater. Sci. Eng.*, **24**, p.637 (2003)
9. Zhang, Y.; Chai, C. & Jiang, X. S. - *Mater. Sci. Eng. C*, **27**, p.213 (2007).
10. Zhu, Y.; Gao, C.; Liu, X. & Shen, J. - *Biomacromol.*, **3**, p.1312, (2002).
11. Holländer, A.; Thome, J.; Keusgen, M.; Degener, I. & Klein, W. - *Appl. Surf. Sci.*, **235**, p.145 (2004).
12. Rouxhet, L.; Duhoux, F.; Borecky, O.; Legras, R. & Schneider, Y. J. - *J. Biomater. Sci. Polym.*, **12**, p.1279 (1998).
13. Sader, M. S.; Ferreira, M. & Dias, M. L. - *Polímeros: Cienc. Tecnol.*, **16**, p.12 (2006).
14. Bradford, M. M. - *Anal. Biochem.*, **72**, p.248, (1976).
15. Ito, Y. et al. - *Biomaterials*, **18**, p.197, (1997).
16. Shin, H. et al. - *Biomaterials*, p.126, (2006).

Enviado: 02/07/08

Reenviado: 21/02/09

Aceito: 02/03/09