

OBTENÇÃO DE SCAFFOLDS POR ELECTROSPINNING PARA USO EM ENGENHARIA DE TECIDOS¹

SCAFFOLDS ACQUISITION BY ELECTROSPINNING TECHNIQUE TO USE IN TISSUE ENGINEERING

**Adriano José de Vargas Raymundo², Luiz Fernando Rodrigues Jr.³,
Solange Cristina da Silva Hoezel³ e Tiago Moreno Volkmer⁴**

RESUMO

Existem vários estudos focando em fabricação de nanofibras poliméricas e o mais utilizado é o processo de electrospinning. Essa técnica é capaz de produzir scaffolds com um diâmetro de fibras controlado, área superficial elevada e estrutura porosa. A técnica consiste na aplicação de uma diferença de potencial elevada entre solução de polímero colocada em uma seringa e uma placa coletora, formando, assim, fibras de tamanho nanométrico. Neste trabalho foi utilizada a poli- ϵ -caprolactona, por se tratar de um biopolímero biocompatível e por possuir uma degradação muito lenta no organismo. Nesse sentido, o objetivo é fabricar scaffolds a base deste polímero, via electrospinning. Para a síntese dos scaffolds, o polímero foi dissolvido em acetona, em uma concentração de 15%, variando-se a diferença de potencial e a distância entre a seringa contendo a solução polimérica e o alvo. Os scaffolds foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), teste de absorção d'água, ângulo de contato e viabilidade celular. O tamanho de fibra variou entre 0,5 e 10 μm . Os resultados mostram que o aumento da diferença de potencial (DDP) levou a um maior emaranhamento das fibras, enquanto que a diminuição da distância tendeu a diminuir o tamanho médio das fibras. Testes preliminares de sobrevivência celular demonstram o alto potencial dos materiais sintetizados em engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Poli- ϵ -Caprolactona, electrospinning, ensaios celulares.

ABSTRACT

There are several studies focusing on the manufacture of nanometric polymer fibers. The electrospinning is one of the most used. This technique is capable of producing scaffolds with controlled fiber diameter, high surface area and porous structure. It consists in the application of high potential difference between the polymeric solution and the collector plate. The chosen polymer was a poly- ϵ -caprolactone due to its high biocompatibility and slow in vivo degradation. Acetone was used as solvent and the concentration was fixed in 15%. In this study, the applied voltage and the distance between the syringe and the collector plate were analyzed. The scaffolds were characterized by Scanning Electron Microscopy, water uptake, contact angle and cell surveillance. The obtained scaffolds showed a fiber diameter in the range between 0.5 and 10 μm . The increase in the high voltage leaded to fibers with a twisted aspect, while the decrease in the distance tended to decrease the size of the fibers. Preliminary cell studies indicates that the scaffolds are biocompatible.

Keywords: Poly- ϵ -Caprolactone, electrospinning, cellular assay.

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmico do curso de Engenharia de Materiais - Centro Universitário Franciscano. E-mail: adriano.engmat@hotmail.com

³ Colaboradores - Centro Universitário Franciscano. E-mail: luiz.fernando@unifra.br; scshoelzel@yahoo.com.br

⁴ Orientador - Centro Universitário Franciscano. E-mail: tiagovolkmer@gmail.com

INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização e remodelagem óssea é alcançado por um complexo sistema no qual o desempenho coordenado de células, o controle hemodinâmico de fatores bioativos, a estrutura e a composição da matriz extracelular nativa induzem uma cascata de sinalização químico-biológica, que proporciona a reparação do tecido através da proliferação, diferenciação e migração de células osteoprogenitoras (NIU et al., 2009). Dessa forma, a capacidade de reproduzir e manipular *in vitro* esse processo em uma escala espaço-temporal similar ao do tecido nativo proporcionaria um grande potencial e sucesso clínico de aplicação da mais ampla gama de biomateriais disponíveis comercialmente, bem como estratégias adotadas na engenharia tecidual e medicina regenerativa (MARQUES et al., 2013).

A fabricação de scaffolds poliméricos biorreabsorvíveis e hidroliticamente degradáveis, pertencentes à classe dos poliésteres alifáticos, estão sendo amplamente investigados como scaffolds na engenharia tecidual devido à inerente propriedade de serem biocompatíveis, sofrerem hidrólise no organismo, viabilizando, portanto, o processo de reconstrução tecidual e ainda, apresentarem facilidade de processamento e modulação da taxa de degradação, propriedades mecânicas e viscoelásticas (RATNER et al., 2013).

Nanofibras poliméricas são um material extremamente atrativo devido ao amplo espectro de aplicações e por sua grande razão entre a área superficial em relação ao volume e a sua arquitetura única na nanoescala construída por elas. Seu potencial de aplicação inclui scaffolds para engenharia de tecidos, meios para a liberação de fármacos, meio de filtração, tecidos protetivos, entre outros. É sabido que as propriedades e estrutura molecular interna de polímeros são fortemente afetadas pelas condições de processamento. Assim, o entendimento da relação processamento - estrutura - propriedade é de suma importância para o desenvolvimento de nanofibras poliméricas que cumpram as demandas da aplicação desejada (INAI et al., 2013).

Electrospinning é uma técnica única e versátil que permite a produção de nanofibras poliméricas com potencial para serem aplicadas na substituição de tecidos em engenharia de tecidos (KUCINSKA-LIPKA et al., 2015). O método consiste na aplicação de uma diferença de potencial em uma solução de polimérica em algum solvente (a solução pode conter uma carga cerâmica). A solução polimérica é colocada em uma seringa, na qual é aplicada uma força N , suficiente para gerar um jato em direção à uma placa coletora metálica (HU et al., 2014).

Quando se aplica uma DDP entre a placa coletora e a seringa, a solução é atraída eletrostaticamente para o alvo metálico e, então, jatos muito finos do líquido espirram em direção ao alvo, devido à formação de uma região instável no jato. O solvente rapidamente evapora e fibras nanométricas são formadas na placa coletora metálica, formando um emaranhado de fibras. Através da variação de parâmetros como voltagem, taxa de injeção da solução polimérica e distância entre a

seringa e o alvo metálico é possível obter fibras de diâmetro, na escala de nanômetros até micrômetros (GAUMER et al., 2009).

O controle do tamanho das fibras pode ser fundamental para o desempenho do scaffold como biomaterial (RATNER et al., 2013), porém, este depende de diversos fatores como o sistema polimérico utilizado, a concentração dos reagentes, o tipo de solvente, a distância entre a solução polimérica e o alvo e a diferença de potencial aplicada. Desta forma, o presente trabalho testou diversos parâmetros de distância e voltagem para soluções contendo 15% de PCL em acetona. O efeito destes parâmetros na morfologia dos scaffolds é verificado, assim como são realizados testes preliminares de viabilidade celular.

MATERIAL E MÉTODOS

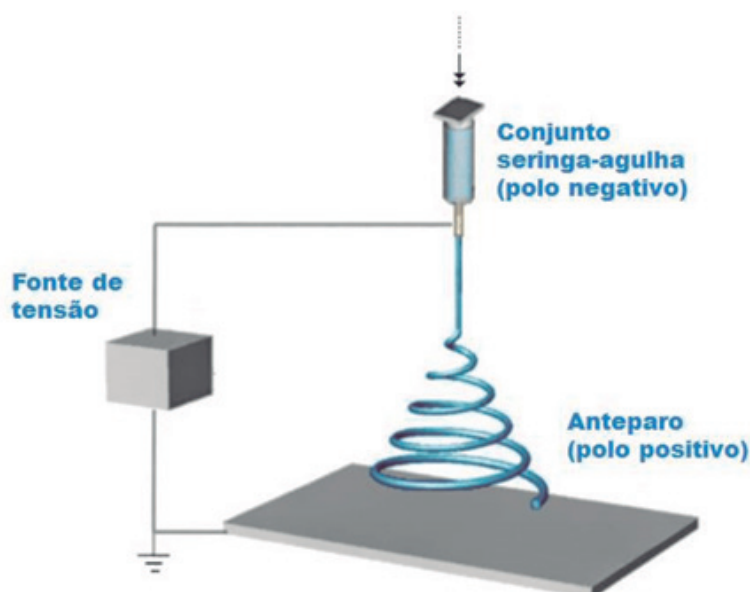
MATERIAIS

Os materiais foram utilizados conforme recebidos. Para a fabricação dos scaffolds foi utilizado o polímero Poli- ϵ -Caprolactona da Marca Sigma Aldrich e peso molecular médio de 80,000 mol/g e o solvente acetona da marca Synth.

CONFECÇÃO DOS SCAFFOLDS

Para a confecção dos scaffolds foi utilizado um equipamento de electrospinning de gravidade construído pelos autores. O esquema do equipamento é mostrado na figura 1.

Figura 1 - Esquema do equipamento de electrospinning utilizado para a síntese dos scaffolds.



Fonte: adaptado de Oliveira et al. (2016).

Para a preparação de uma solução polimérica contendo Poli- ϵ -Caprolactona, dissolveu-se este polímero em acetona com concentração de 15% (m/v) a 50°C, usando-se uma chapa aquecedora e agitação magnética até o polímero estar completamente solúvel. Esta solução foi transferida para uma seringa de 5mL com agulha de gauge 18. As amostras foram preparadas a partir da variação da diferença de potencial aplicada entre a solução polimérica e o alvo no qual as nanofibras serão formadas, e da distância entre a solução polimérica e a placa alvo. Para as primeiras 3 amostras, fixou-se a distância em 15cm e variou-se a DDP aplicada (10, 15 e 20 KV). Posteriormente, fixou-se a DDP em 20 KV e variou a distância entre a agulha e a placa coletora em (10, 12,5 e 15cm). A tabela 1 resume os parâmetros variados.

Tabela 1 - Distância do anteparo e voltagem utilizados para a confecção dos scaffolds de Poli- ϵ -Caprolactona.

Amostra	Distância (cm)	Voltagem (KV)
C2	15	15
C3	15	20
C4	12,5	20
C5	10	20

CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS

A morfologia e o diâmetro das fibras foi medida por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Utilizou-se um MEV da marca JEOL®, modelo JSM-6060, do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Previamente às análises, as amostras foram submetidas a aplicação de uma fina camada de ouro via sputtering. A medição do diâmetro de fibras utilizou imagens obtidas e, com auxílio do software Image J, foram medidas ao menos 20 fibras de regiões diferentes por amostra.

Para se medir a absorção de água dos scaffolds, estes foram cortados em pedaços retangulares medindo 2x1cm. O peso a seco foi verificado e então, os pedaços foram imersos em água destilada e removidos no intervalo de 1min, sendo secados com papel filtro e reimersos em água destilada a cada 1 minuto, sendo o processo repetido durante 10 minutos. A absorção de água foi calculada usando a equação (1).

$$\%A = 100x \frac{(P_i - P_s)}{P_s} \quad (1)$$

onde %A corresponde ao percentual de água absorvido, P_i é o peso imerso e P_s é o peso a seco.

Para medir o ângulo de contato, uma gota de 10 μ l de água deionizada foi gotejada cuidadosamente sobre a superfície plana dos scaffolds. O ângulo de contato entre a fase sólida - polímero - e a fase líquida - água - foi medido pelo software Image J.

Para a realização de um ensaio preliminar de viabilidade celular, as amostras foram cortadas em quadrados de tamanho 1x1cm e esterilizadas sob luz ultravioleta por 30min. As placas foram cultivadas e mantidas sob condições padrões em estufa (37°C, 95% de umidade e CO₂ 5% durante todo o experimento). Para o cultivo das células fibroblastos VERO, o meio de cultura foi removido e a película de células no fundo do frasco foi lavada com tampão fosfato-salino (PBS, do inglês Phosphate Saline Buffer) duas vezes, então as células foram removidas do frasco por exposição a 1ml de tripsina, a 37°C por 3-5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 9ml de um novo meio de cultura e as células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifuga, onde foram precipitadas por centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, o que precede o processo de ressuspensão. Em seguida foi feita a contagem de células em suspensão com o uso de Câmara de Neubauer, e, após, as células foram transferidas para os poços de cultura através de um micropipetador.

Para a observação da população celular sobre as amostras e o controle, foi antecedida a coloração azul de toluidina. As amostras foram transferidas para nova placa de cultura de 6 poços e lavadas com PBS duas vezes, para eliminação total do meio de cultura. Então, foi adicionada sobre a amostra 300 μ L de solução de PBS, aditivada com 4% de p-formaldeído. Após 15 minutos, a solução foi retirada e as amostras lavadas novamente com PBS. Feito isso, cada amostra foi exposta a uma solução de 1% de azul de toluidina por 1 minuto e, posteriormente, visualizadas em microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com as imagens obtidas através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura foi possível verificar a morfologia dos scaffolds obtidos pela técnica de electrospinning. Nota-se a formação de um emaranhado de fios, que resultam em uma estrutura porosa tridimensional, com formato similar a uma teia de aranha (Figura 2a). Na micrografia com aumento maior (Figura 2b) é possível ver a presença de porosidades na superfície das fibras. Possivelmente, durante a evaporação do solvente, a solução se torna termodinamicamente instável e as fibras de eletrospinning se separam em fases ricas em polímero e fases pobres em polímero, de maneira que a fase pobre em polímero acaba gerando porosidades nas fibras (WU; CLARK, 2008).

A figura 3 mostra micrografias de cada amostra sintetizada. Já a tabela 2 apresenta o tamanho médio e o desvio padrão das fibras para cada condição de síntese dos scaffolds.

Figura 2 - Micrografias mostrando a morfologia dos scaffolds de Poli- ϵ -caprolactona da amostra C1, com aumento de (a) 200x e (b) 5000x.

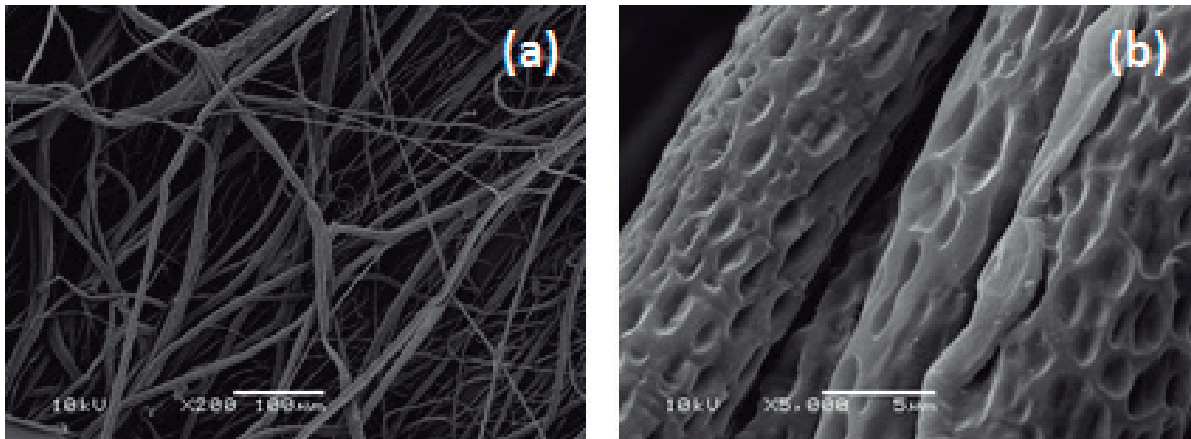


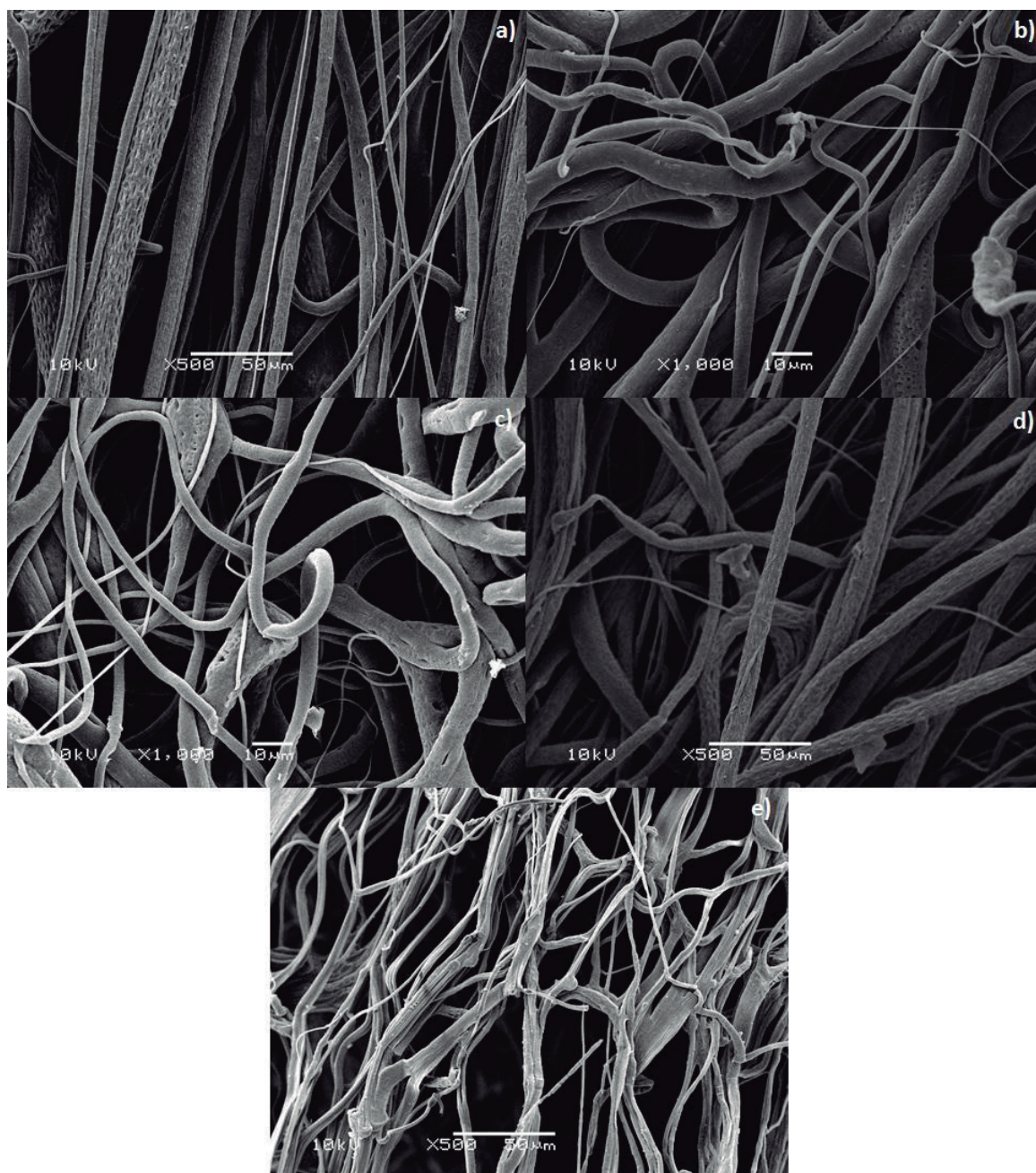
Tabela 2 - Tamanho médio das fibras dos scaffolds e seu desvio padrão para cada composição.

Amostras	Tamanho médio das fibras (μm)	Desvio padrão (μm)
C1	3,9	2,2
C2	3,9	2,3
C3	3,5	2,3
C4	4,4	2,7
C5	2,5	1,6

Analisando-os dados da tabela 2, verifica-se que o tamanho médio das fibras variou entre 2,5 e 4,4 μm , enquanto que a análise das micrografias da figura 3, com o *software Image J* mostra que o diâmetro das fibras variou entre 0,5 a 10 μm para as amostras analisadas. O alto desvio padrão indica que o método de electrospinning permite o controle do tamanho das fibras em uma determinada faixa de tamanho, ou seja, o tamanho obtido não é totalmente uniforme.

As micrografias das amostras C1 a C5 apresentadas na figura 3 permite uma comparação do aspecto morfológico das fibras. A amostra C1 (figura 3a), com distância de 15cm e voltagem de 10 KV apresentou fibras mais alinhadas e com uma mescla de fibras porosas e lisas. O aumento da tensão para 15 e 20 KV, mostrados nas figuras 3b) e 3c) respectivamente, evidencia que ocorreu um aumento do emaranhamento das fibras, porém o tamanho dessas se manteve similar e algumas também apresentaram porosidades. Ao fixar a DDP em 20 KV e diminuir a distância para 12,5 cm, ainda nota-se o aspecto retorcido e a presença de algumas fibras com porosidades (figura 3d), porém quando se diminuiu a distância para 10cm (figura 3e), nota-se a presença de fibras com tamanho menor do que 1 μm e as fibras mais grossas parecem ser compostas de algumas fibras menores.

Figura 3 - Micrografias comparando os tamanhos de fibras dos scaffolds das amostras a) C1, b) C2, c) C3, d) C4 e e) C5.

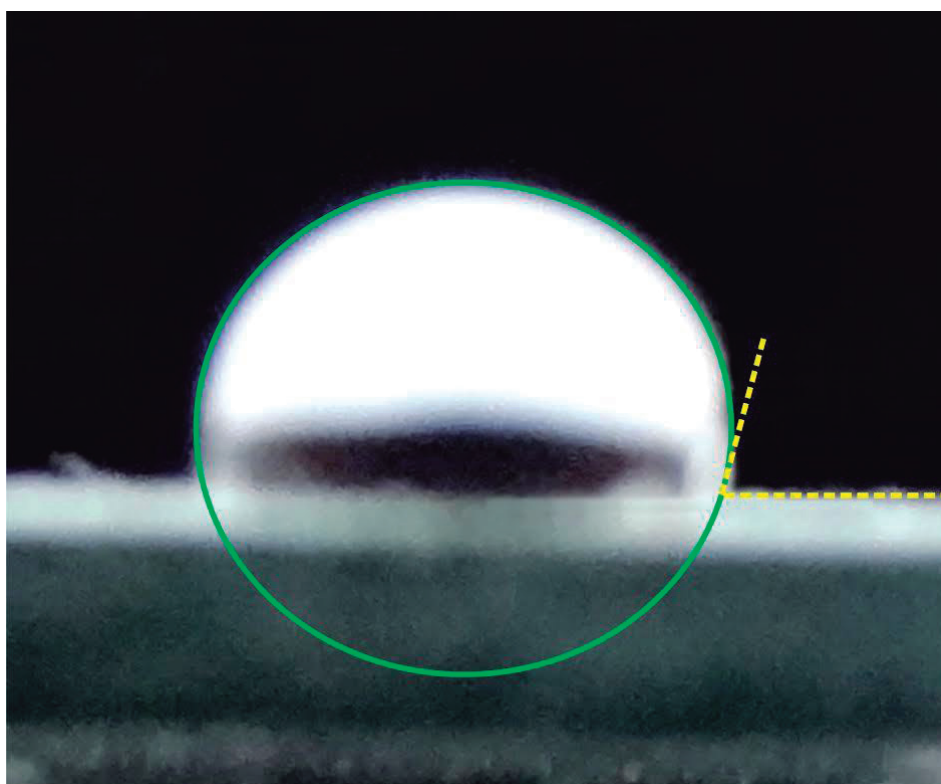


Os resultados do teste de absorção de água são mostrados na tabela 3. As diferentes razões de absorção podem ser entendidas como resultado das diferentes interações iônicas que ocorrem na presença de água destilada (em pH 7). A água é extremamente polar, com constante dielétrica de 78,54 a temperatura ambiente, o que mostra que tal polímero possui afinidade com estruturas polares. Outro aspecto que contribui para uma maior retenção de água é a estrutura porosa que constitui os scaffolds analisados. Os poros facilitam a permeação e subsequente retenção de água na matriz polimérica. Esta retenção se deve pela estrutura porosa do scaffold, que pode ser entendida como consequência do intumescimento no filme, que gera um “inchaço” no interior do scaffold (ASSIS; SILVA, 2003).

Tabela 3 - Absorção de água dos scaffolds obtidos por electrospinning.

Amostras	Absorção de água (%)
C1	193,6
C2	130,3
C3	137,4
C4	107,1
C5	169,2

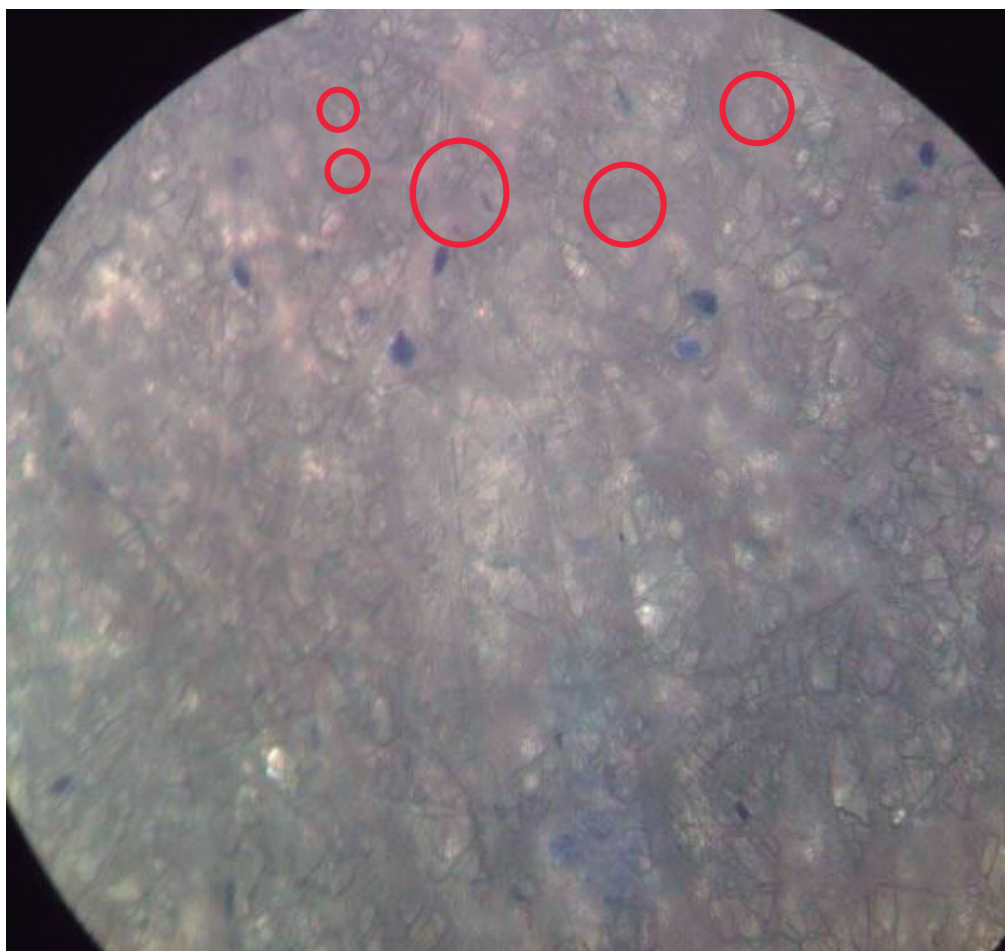
A amostra C2 demonstrou a maior absorção de água. Para avaliar a hidrofobicidade, foi medida a molhabilidade dos scaffolds. O ângulo de molhamento, mostrado na figura 4, foi de $105,1^\circ$, indicando que o material obtido é moderadamente hidrofóbico. Valor muito próximo foi encontrado para as outras amostras. Resultado que é corroborado na literatura por Xue et al. (2014), que encontraram um valor de ângulo de contato de $129,6^\circ$ para filmes de PCL puro. Tal fato ajuda a explicar que a absorção de água no scaffold tem uma contribuição muito maior por parte da porosidade do scaffold do que pela natureza química do polímero. Estudos da literatura indicam que a incorporação de polímeros hidrofílicos ao PCL, como a gelatina (XUE et al., 2014), levam a uma diminuição do ângulo de contato do material, resultando em um material mais hidrofílico.

Figura 4 - Ângulo de contato do scaffolds obtidos por electrospinning de composição C2.

O teste prévio de citotoxicidade mostrou que as células Vero do tipo fibroblásticas se aderiram ao scaffold e se proliferaram com bastante sucesso, observou-se que apenas nos pontos mais escuros

(Figura 5) se encontraram células mortas, mostrando que tal material apresenta potencial para atuar como um biomaterial. Ferreira et al. (2014) verificaram que células Vero do tipo fibroblastos conseguem se aderir à scaffolds de PCL e que a proliferação aumentou até 4 dias de ensaio.

Figura 5 - Ensaio de sobrevivência celular no scaffold de composição C2.



CONCLUSÃO

Através da técnica de electrospinning foi possível a obtenção de estruturas tridimensionais com porosidades interconectadas. O diâmetro médio das fibras ficou entre 0,5 e 10 μm , sendo menor para amostras com a menor distância e a maior diferença de potencial (C5). O aumento da diferença de potencial levou à obtenção de fibras mais retorcidas, enquanto que a diminuição da distância tendeu a diminuir o tamanho das fibras. O material apresentou um comportamento moderadamente hidrofóbico. Já os ensaios preliminares in vitro mostram que estes materiais permitiram a adesão de células Vero, indicando seu potencial para aplicação em engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.

FERREIRA, J. et al. Electrospinning Polycaprolactone Dissolved in Glacial Acetic Acid: Fiber Production, Nonwoven Characterization, and In Vitro Evaluation **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 41068, p. 1- 9, 2014.

GAUMER, J. et al. Structure-function relationships and source-to-ground distance in electrospun polycaprolactone. **Acta Biomater**, v. 5, n. 5, p 1552-1561, 2009.

HU, X. et al. Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, v. 185, p. 12-21, 2014

INAI, R.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibres. **Nanotechnology**, v. 16, p. 208-213, 2013.

KUCINSKA-LIPKA, J. et al. Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibers by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system. **Materials Science and Engineering C**, v. 46, p. 166-176, 2015.

MARQUES, D. R.; SANTOS, L. A.; VOLKMER, T. M. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials**. New York: Taylor & Francis, 2013.

NIU, X. et al. In vitro degradation and release behavior of porous poly(lactic acid) scaffolds containing chitosan microspheres as a carrier for BMP-2-derived synthetic peptide. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 176-182, 2009.

OLIVEIRA, A. H. P. et al. Análise da viabilidade econômica de uma spin-off de electrospinning no Brasil. **Revista Gestão Industrial**, v. 12, n. 03, p. 103-118, 2016.

RATNER, B. D. et al. (Ed.). **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2013.

XUE, J. et al. Drug loaded homogeneous electrospun PCL/gelatin hybrid nanofiber structures for anti-infective tissue regeneration membranes. **Biomaterials**, v. 35, n. 34, p. 9395-9405, 2014.

WU, Y.; CLARK, R. Electrohydrodynamic atomization: a versatile process for preparing materials for biomedical applications. **J. Biomater. Sci. Polymer Edn**, v. 19, n. 5, p. 573-601, 2008.

