

Obtenção e caracterização de scaffolds de policaprolactona produzidos a partir do sistema BioExtruder

M. D. R. Leite^{1*}, T. M. A. Marinho, M. V. L. Fook

Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de Campina Grande.
Aprígio Veloso 882, Bodocongó, Campina Grande, PB – CEP 58429 – 900

(Recebido em 15/02/2016; revisado em 07/03/2016; aceito em 07/03/2016)
(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

Resumo:

Scaffolds para a Engenharia de Tecidos devem apresentar características favoráveis ao desenvolvimento e regeneração de um novo tecido. Para isso, estes substitutos biológicos necessitam de fatores que favoreçam esse crescimento, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas adequadas e uma boa interconectividade entre os poros, por exemplo, que podem ser obtidos a partir do biomaterial e da técnica de fabricação escolhida para o seu desenvolvimento. Diante disso, este trabalho tem como objetivo a obtenção de scaffolds de Policaprolactona a partir do sistema BioExtruder. Posteriormente as estruturas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Porosidade a partir do método geométrico. A partir dos resultados obtidos por MEV, verificou-se que a técnica escolhida proporcionou a reprodução de scaffolds com poros definidos e geometria regular. As estruturas apresentaram porosidade média em torno de 54% com tamanhos de poros variando de aproximadamente 150µm a 300µm indicando uma possível aplicação para regeneração do tecido ósseo.

Palavras-chave: Scaffolds; policaprolactona; bioextruder.

Abstract:

Scaffolds for tissue engineering must have appropriate characteristics to the development and regeneration of new tissue. Thus, these biological substitutes require factors to provide growth, such as biocompatibility, biodegradability, suitable mechanical properties and a good interconnectivity between the pores, for example, which can be obtained from the proper biomaterial and the manufacturing technique chosen for their development. Therefore, this study aimed to obtain Polycaprolactone scaffolds from BioExtruder system and characterize them by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Porosity from the geometric method. From the results obtained by SEM, the technique chosen promoted the reproduction of scaffolds with defined pores and regular geometry. The structures presented an average porosity of about 54% with pore sizes ranging from approximately 150µm to 300µm indicating a possible application for bone tissue regeneration.

Keywords: Scaffolds; polycaprolactone; bioextruder.

1. Introdução

A engenharia de tecidos emergiu no cenário mundial devido à escassez de órgãos e tecidos disponíveis para serem transplantados, criando uma nova área multidisciplinar com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem as funções do tecido. Uma das alternativas encontradas para o desenvolvimento desses substitutos são as estruturas tridimensionais, também chamadas de matrizes porosas, ou ainda, *scaffolds*, que guiam o tecido fornecendo o suporte inicial para que as células adiram, proliferem-se e diferenciem-se, formando assim uma matriz extracelular, que mantém a integridade estrutural do tecido. Os tecidos do corpo humano são compostos fundamentalmente pelas células, pelas matrizes extracelulares (ECM) que permitem a proliferação e diferenciação celular, e

pelos fatores de crescimento. Portanto, para se ter um substituto biológico eficaz, as estruturas tridimensionais porosas mimetizam as ECM, ou seja, o ambiente natural onde as células se organizam nos tecidos. Geralmente são produzidas a partir de biomateriais biodegradáveis, naturais ou sintéticos [1-3].

Para implantes de longa duração, com taxa de biodegradação superior a um ano, a policaprolactona (PCL) é um dos polímeros sintéticos mais utilizados. Trata-se de um poliéster linear alifático, um polímero processável que apresenta estabilidade térmica e química no sistema biológico, biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixa imunogenicidade e baixos riscos de infecções [4].

A Policaprolactona apresenta temperatura de transição vítrea (T_g) de -60 °C, o que caracteriza um estado borrachoso em temperatura ambiente e ponto de fusão variando entre 59 e

*Email: mdrlite@gmail.com (M. D. R. Leite)

64 °C, devido à natureza cristalina do PCL, que permite a fácil moldabilidade a temperaturas relativamente baixas, e uma elevada temperatura de degradação (~350 °C) [5].

Entre os métodos de fabricação de estruturas tridimensionais, duas tecnologias podem ser empregadas: as convencionais e as não-convencionais. A prototipagem rápida está inserida entre as técnicas não-convencionais de obtenção de estruturas tridimensionais porosas, e baseia-se na construção camada a camada de objetos tridimensionais (3D) que, entre outros processos, pode ser feito por meio da extrusão do material. Essa técnica apresenta maior precisão no controle da dimensão, geometria e arquitetura dos poros [1,4]

Técnicas de manufatura aditiva, ou Biofabricação, estão sendo cada vez mais reconhecidos como os métodos mais eficazes para a produção de estruturas tridimensionais porosas. O sistema BioExtruder, desenvolvido pelo Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto (CDRsp), Instituto Politécnico de Leiria (IPL) – Portugal, está inserido no grupo de técnicas de fabricação não-convencionais chamado de Prototipagem Rápida, e sua principal vantagem encontra-se na capacidade de produzir rapidamente estruturas tridimensionais complexas, com forma e morfologia interna pré-definida, permitindo um maior controle do tamanho e da distribuição dos poros. Seu funcionamento consiste na extrusão do material por meio de uma espécie de agulha, depositando-o camada a camada até a completa construção da estrutura desejada [4,6].

Este trabalho tem como objetivo desenvolver estruturas tridimensionais porosas de Policaprolactona produzidas a partir do sistema BioExtruder e avaliar morfologicamente as estruturas obtidas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

- Policaprolactona em pó (CAPA 6506) com peso molecular 50.000g/mol, fornecido pela Perstorp Caprolactones (Cheshire, UK);
- Sistema BioExtruder (Figura 1), desenvolvido pelo CDRsp.

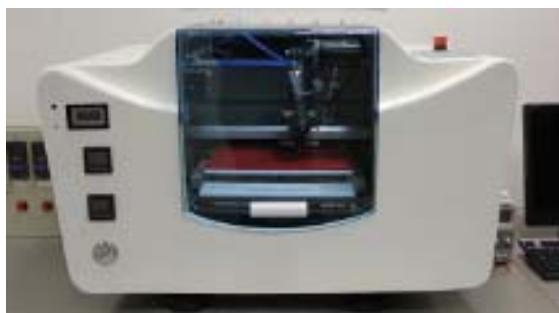


Figura 1. Sistema BioExtruder [9]

2.2 Métodos

Inicialmente o sistema BioExtruder foi aquecido por cerca de 15 min até atingir a 85 °C e mantido nesta temperatura. Em seguida, aproximadamente 12g do PCL em pó foi depositado no reservatório do sistema permanecendo sob aquecimento até que o material estivesse totalmente fundido. Por fim, o polímero foi extrudado por meio da compressão de ar por uma espécie de agulha de aproximadamente 0,30 mm de diâmetro e o filamento foi depositado camada a camada na plataforma de construção onde, em contato com a superfície à temperatura ambiente, resfria e adquire a forma sólida. Os demais parâmetros utilizados foram: velocidade de deposição do material de 20 mm/s, velocidade de rotação do fuso de 13 rpm, dimensões de 30 x 30 x 3,36 mm, arquitetura 0/90° e distância entre os filamentos de 350 µm. A Figura 2 apresenta a estrutura obtida.



Figura 2. Estrutura tridimensional obtida a partir do sistema BioExtruder

2.3. Caracterizações

Os scaffolds de Policaprolactona foram caracterizados por:

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para identificar a morfologia da superfície e da estrutura formada, bem como a distribuição dos poros. As estruturas foram analisadas utilizando um Microscópio Eletrônico PRO X Phenon com aumento de até 40000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, tensão de 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa).

- Determinação da Porosidade:

A porosidade das estruturas foi determinada a partir do método geométrico, onde as amostras (n=3) foram pesadas, medidas e em seguida foi calculado o volume de cada

amostra. A densidade das estruturas ($\rho_{scaffolds}$) foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\rho_{scaffold} = \frac{\text{Massa do scaffold}}{\text{Volume do scaffold}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Posteriormente, a porosidade total das estruturas foi calculada de acordo com a equação que segue, onde ρ_0 é o valor da densidade teórica da policaprolactona (1,14 g/cm³):

$$\text{Porosidade (\%)} = 1 - \frac{\rho_{scaffold}}{\rho_0} \quad \text{Eq. (2)}$$

Com o auxílio do programa ImageJ foi possível verificar a distribuição do tamanho dos poros das estruturas a partir de 40 medições.

3. Resultados e Discussão

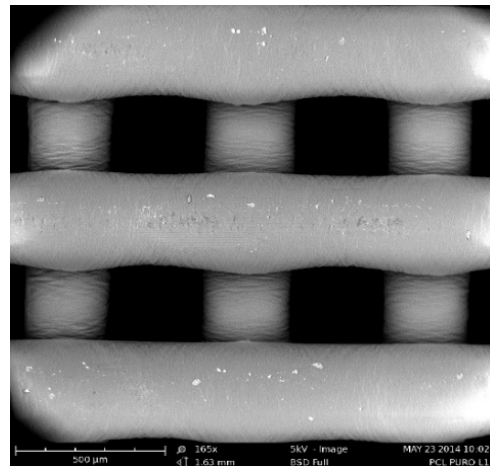
3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A partir das imagens obtidas por MEV, é possível verificar estruturas porosas com uma geometria interna regular, mantendo o padrão 0/90° de arquitetura, com interconectividade entre os poros e distribuição uniforme entre si. Porém, quanto aos filamentos, estes apresentaram um certo intumescimento e uma certa rugosidade e irregularidade em sua superfície (Figura 3a), que pode ser associada ao cisalhamento e esforços mecânicos que o material sofre no momento em que é depositado, o que resultou na descontinuidade do filamento. A Figura 3b ilustra uma superfície mais lisa e uniforme, porém com uma espessura de filamento um pouco maior, pois trata-se da primeira camada de material que foi depositada e que entra em contato com a superfície da plataforma de deposição, sofrendo um leve espalhamento. Observa-se ainda a presença de pequenos poros irregulares na superfície do filamento (setas), que podem estar relacionados a bolhas de ar aprisionadas no material durante a extrusão [2].

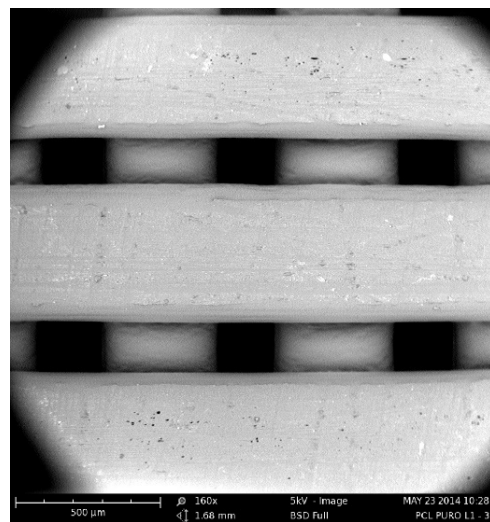
3.2. Porosidade

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos a partir do método geométrico e são referentes à porosidade das estruturas de PCL. A partir dos resultados apresentados é possível verificar que as estruturas apresentaram uma porosidade média de 54%.

Com o auxílio do programa ImageJ, identificou-se as porcentagens de tamanhos de poros em relação à sua distribuição de tamanhos a partir das imagens por MEV. De acordo com a Figura 4, verifica-se que as estruturas de PCL apresentaram 5 faixas de distribuição de poros, com tamanhos variando de aproximadamente 150 a >300µm, sendo a faixa de 250-300µm com a maior quantidade de poros, aproximadamente 39% deles apresentaram diâmetros nessa faixa, seguida da faixa >300µm, com cerca de 28% dos poros.



(a)



(b)

Figura 3. Micrografias das estruturas obtidas mostrando (a) a última camada de deposição de filamentos (165x) e (b) a primeira camada de deposição (160x)

Oh et al. [7] desenvolveram estruturas tridimensionais de PCL para avaliar a influência do tamanho dos poros nas interações celulares utilizando vários tipos de células, como condrócitos, osteoblastos e fibroblastos e, a partir dos seus resultados, foi possível verificar que as estruturas com tamanho de poro entre 290-310µm apresentaram uma nova formação óssea mais rápida que as estruturas com outros tamanhos de poros. Zein et al. [8] utilizaram a modelagem de deposição por fusão para produzir estruturas tridimensionais de policaprolactona e avaliaram o efeito da porosidade obtida e sua relação com as propriedades mecânicas por compressão baseando-se nesses parâmetros. Os resultados obtidos mostraram estruturas com poros geométricos regulares, com tamanhos variando entre 160-700µm, filamentos com diâmetros entre 260-370µm e porosidade entre 48-77% e resistência à compressão variando de 4 a 77Mpa,

comprovando a relação existente entre as propriedades compressivas e a porosidade.

Tabela 1. Porosidade das estruturas de PCL

	Amostra			Média
	1	2	3	
Comprimento (mm)	30,65	30,42	30,50	30,52
Largura (mm)	30,44	30,38	30,38	30,4
Altura (mm)	3,45	3,41	3,45	3,44
Massa (g)	1,7912	1,5965	1,6893	1,6923
Porosidade (%)	51	56	54	54

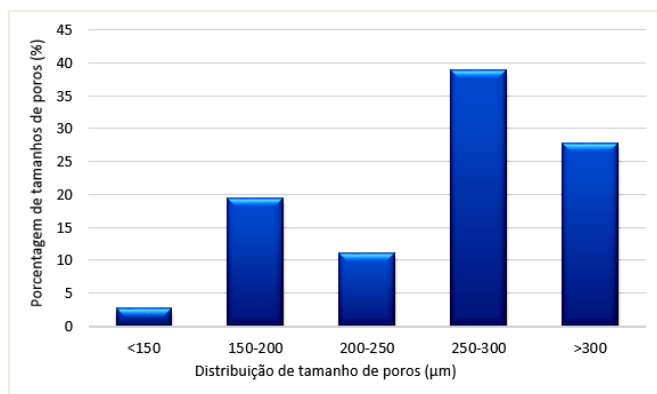


Figura 4. Gráfico das porcentagens de tamanhos de poros em função da distribuição de tamanhos de poros obtidos por MEV para as estruturas de PCL

4. Conclusões

A partir das estruturas obtidas, pode-se concluir que o sistema BioExtruder promove o desenvolvimento de estruturas tridimensionais com fácil reprodutibilidade e um considerável controle do tamanho e da distribuição de poros, conferindo assim um dos pré-requisitos essenciais para que esta matriz possa ser utilizada como suporte na engenharia de tecidos. Resultados obtidos a partir da análise morfológica por MEV mostraram a estrutura porosa dos scaffolds produzidos e confirmam a geometria 0/90° previamente estabelecida, bem como a distribuição uniforme de seus poros e adesão entre as camadas. O teste de porosidade revelou uma possível aplicação para regeneração óssea, uma vez que os scaffolds produzidos apresentaram distribuição de tamanho de poros que possibilitam o crescimento de células do tecido ósseo.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, ao Centro para o Desenvolvimento Rápido e Sustentado do Produto – CDRsp, ao Instituto Politécnico de Leiria – IPL, ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) e seus colaboradores, e à Universidade Federal de Campina Grande.

Referências

- [1] Liu, C., Xia, Z., Czernuszka, J. T. Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design*, 85, (7), 1051–1064, 2007.
- [2] Mota, C. M. D. Sistema de BioExtrusão para a Engenharia de Tecidos [dissertação de mestrado]. Aveiro: Universidade de Aveiro, Departamento de Engenharia Mecânica, 2008.
- [3] Tabata, Y. Significance of release technology in tissue engineering. *Drug Discovery Today*, 10 (23-24), 1639-1646, 2005.
- [4] Domingos, M. Caracterização Mecânica e Biológica de Scaffolds Produzidos por BioCell Printing [tese de doutorado]. Girona: Universidade de Girona, Doutorado em Caracterização de Processos de Fabricação, 2012.
- [5] Labet, M., Thielemans, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society reviews*, 38 (12), 3484–3504, 2009.
- [6] Bartolo, P. J. S., Almeida, H., Laoui, T. Rapid prototyping and manufacturing for tissue engineering scaffolds. *International Journal of Computer Applications in Technology*, 36 (1), 1–9, 2009.
- [7] Oh, S. H., Park, I. K., Kim, J. M., Lee, J. H. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*, 28 (9), 1664–1671, 2007.
- [8] Zein, I., Huttmacher, D. W., Tan, K. C., Teoh, S. H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23 (4), 1169–1185, 2002.
- [9] Viana, T., Biscaia, S., Almeida, H., Bartolo, P. J. Permeability evaluation of lay-down patterns and pore size of PCL scaffolds. *Procedia Engineering*, 59, 255–262, 2013.