VANESSA TIEMI KIMURA

**Produção e caracterização de *scaffolds* de
diferentes espessuras obtidos por eletrofiação de
nanofibra polimérica e proteína**

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

São Paulo

2017

VANESSA TIEMI KIMURA

**Produção e caracterização de *scaffolds* de
diferentes espessuras obtidos por eletrofiação de
nanofibra polimérica e proteína**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração:
Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Orientadora: Prof^a Dr^a Wang Shu Hui

São Paulo

2017

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Ficha Catalográfica

Kimura, Vanessa Tiemi

Produção e caracterização de scaffolds de diferentes espessuras obtidos por eletrofição de nanofibra polimérica e proteína / V. T. Kimura -- versão corr. - São Paulo, 2017.

78 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

1.Biomateriais 2.Eletrofição 3.Scaffold 4.Nanofibra 5.Engenharia tecidual
I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais II.t.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Wang Shu Hui, que me orientou durante todo o projeto, sempre tirando minhas dúvidas e contribuindo para o melhor.

À Dr^a Maria Helena Ambrosio Zanin, que me deu o maior suporte, além dos conselhos de vida, sempre se preocupando mesmo à distância.

À Dr^a. Elenice Deffune, por me acolher e orientar no tempo que passei na UNESP.

À Helga, Ana Livia, Alexandre e a todos do grupo que me deram suporte nos experimentos e na minha estadia em Botucatu.

A todos do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), pelos ensinamentos, amizade, colaboração e convivência: ao Adriano Marim e à Natália Cerize, pelo suporte em geral; à Patrícia Léo, pelo apoio nos ensaios biológicos; ao Antônio Montemor, pelo auxílio na cultura celular e em outros testes no laboratório; ao Marcelo Medina, pela contribuição com ideias e realização de vários ensaios; ao Fabiano Raymundo dos Santos, pela atenção e auxílio no microscópio confocal; ao Fernando Soares de Lima, pelo suporte na realização dos ensaios mecânicos; ao Denivaldo, Renato e Bruno, pela ajuda nas análises de MEV; ao Douglas, pelas 'aulas' dos mais variados assuntos; e às meninas que estavam sempre por perto me ajudando e compartilhando momentos: Thaís, com quem eu pude contar em todas as horas; Sheila, com quem eu dividi os sufocos e as histórias mais engraçadas; Bia, que me trouxe inspiração; e Carol Redigueri, companheira de discussão, que me ajudou enormemente em todas as etapas desse projeto, sempre ouvindo minhas dúvidas e acrescentando conhecimento. Sem contar as 'corujitas': Ari, Bi, Fe e Tati, amigas sem igual!

Ao meu namorado, pelos ensinamentos, conselhos, ajudas e apoio em todos os momentos, sempre me dando forças para continuar.

Aos meus pais, por todo o carinho, dedicação e educação que me forneceram, sem nunca duvidar das minhas escolhas.

E a todos os amigos que me acompanharam durante essa jornada.

“Não é o conhecimento, mas o ato de aprender; não a posse, mas o ato de chegar lá, que concede a maior satisfação.”

(GAUSS, Carl Friedriech)

RESUMO

A engenharia tecidual visa repor, reparar ou ajudar a regenerar tecidos e órgãos danificados por meio da combinação de biomateriais, biomoléculas e células. *Scaffolds* de nanofibras biodegradáveis mimetizam a matriz extracelular natural fornecendo uma estrutura ideal para o crescimento celular. Blendas de policaprolactona (PCL) e gelatina são biodegradáveis e proporcionam uma combinação de boas propriedades mecânicas, do PCL, com a hidrofiliabilidade e caráter que promove a adesão celular, da gelatina. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar a importância das diferentes espessuras de *scaffolds* eletrofiados em relação às suas propriedades principais. Quatro conjuntos de *scaffolds* de PCL/gelatina com diferentes espessuras foram produzidos sob as mesmas condições apenas aumentando o tempo de duração do processo de eletrofiação. Os resultados indicam que as espessuras aumentaram proporcionalmente ao tempo de eletrofiação, variando de 100 nm a 300 nm nos períodos de 1 a 3 horas, enquanto a densidade aparente e a porosidade mantiveram-se constantes. As micrografias das membranas revelaram fibras lisas com diâmetros maiores para os *scaffolds* de menor espessura, e fibras irregulares com diâmetros menores e regiões fundidas ou ligadas para os *scaffolds* de maior espessura. Além disso, o aumento da espessura melhorou a resistência mecânica e a molhabilidade dos *scaffolds*. A esterilização por peróxido de hidrogênio não modificou quimicamente a composição das membranas de PCL/gelatina, embora algumas amostras tenham se deformado. As membranas também apresentaram bons resultados de citotoxicidade, melhorando a viabilidade celular, apesar desses valores diminuírem minimamente para os *scaffolds* de maior espessura, provavelmente devido à maior quantidade de PCL. O teste de adesão não foi conclusivo e deverá ser repetido.

Palavras-Chave: Biomateriais. Eletrofiação. Scaffold. Nanofibra. Engenharia tecidual.

ABSTRACT

Tissue engineering aims to replace, repair, or helping regenerate damaged tissues and organs through the combination of biomaterials, biomolecules and cells. Biodegradable nanofibrous scaffolds mimic the natural extracellular matrix providing an ideal structure to cellular growth. Blends of polycaprolactone (PCL) and gelatin are biodegradable and provide a combination of good mechanical properties, from PCL, with the hydrophilicity and cell adhesion promoter character, from gelatin. The aim of this work was to evaluate the importance of the thickness of electrospun scaffolds on their key properties. Four sets of PCL/gelatin scaffolds with different thicknesses were produced under the same conditions by simply increasing the time length of electrospinning process. Results indicate that the thickness increases proportionally to the electrospinning time, varying from 100 nm to 300 nm in periods of 1 to 3 hours, while the apparent density and porosity remained constant. Micrographs from the nonwoven mats revealed smooth fibers with larger diameters in the thinner scaffold, and irregular fibers with smaller diameters and molten or bonded regions as the thickness increased. Furthermore, the increase of thickness improved mechanical resistance and wettability of the scaffolds. Plasma sterilization did not modify chemical composition of PCL/gelatin membranes, although some samples have been deformed. Membranes also presented good results for cytotoxicity, improving cell viability, despite these values decreased minimally to the thicker scaffolds, probably due to the higher amount of PCL. Adhesion test was not conclusive and might be repeat.

Keywords: Biomaterials. Electrospinning. Scaffold. Nanofibers. Tissue engineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de <i>scaffolds</i> para cartilagem com diferentes conformações.	24
Figura 2 – Fórmula molecular da poli(ϵ -caprolactona).	26
Figura 3 – Fórmula molecular da gelatina.	27
Figura 4 – Esquema do processo de eletrofiação. (a) Arranjo típico de eletrofiação em coletor plano e (b) método de coleta que permite criar membranas com fibras alinhadas usando coletor rotativo.	28
Figura 5 – Morfologia das fibras. (a) Fibras randômicas, (b) fibras com <i>beads</i> e (c) fibras alinhadas.	30
Figura 6 – Sistema de eletrofiação.	33
Figura 7 – Dimensões da amostra, esquema do suporte de papel e foto da amostra no equipamento.	35
Figura 8 – Sistema para capturar a imagem da gota sobre as amostras.	36
Figura 9 – Montagem do experimento de citotoxicidade: amostras em meio DMEM-F12 na placa de Petri e cultura celular em placa de 6 poços.	38
Figura 10 – Microscopia óptica (40x) de uma amostra de um ensaio de eletrofiação com formação de gotículas.	42
Figura 11 – Microscopia óptica (40x) das amostras de (a) PCL 8 % m/m com gelatina 8 % m/m em solução de ácido acético e (b) PCL 9 % m/v em clorofórmio/metanol.	43
Figura 12 – Microscopia óptica (40x) das amostras de (a) PCL 10 % m/m, (b) PCL 15 % m/m, (c) PCL 20 % m/m e (d) PCL 10 % m/m com gelatina 5 % m/m.	45
Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura de membranas de PCL 10 % m/m com gelatina 5 % m/m, (a) vazão 1,0 mL/h, distância agulha-coletor 12 cm e tensão 15 kV e (b) vazão 0,3 mL/h, distância agulha-coletor 12 cm e tensão 10 kV, magnificação 10000x.	45
Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> de diferentes espessuras eletrofiados com (a) 1 h, (b) 1,5 h, (c) 2 h e (d) 3 h, magnificação de 10000x.	49
Figura 15 – Microscopia óptica (40x) do corte transversal de uma amostra do conjunto D.	52

Figura 16 – Curvas representativas (deslocadas para facilitar a visualização) de Tensão x Deformação para um mesmo conjunto de amostras (D). Triângulo na curva indica o primeiro ponto de fratura, seguido por fratura(s) subsequente(s).	52
Figura 17 – Gota de água depositada sobre a superfície das membranas eletrofiadas por (a) 1 h, (b) 1,5 h, (c) 2 h, (d) 3 h e (e) da fita dupla-face, após 10 segundos da deposição da gota.	53
Figura 18 – Espectros de FTIR de PCL, gelatina e do <i>scaffold</i> de PCL/gelatina.....	56
Figura 19 – Amostras antes e depois de serem esterilizadas por Sterrad®.	59
Figura 20 – Micrografia dos <i>scaffolds</i> de PCL/gelatina após esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio, magnificação de 10000x.....	60
Figura 21 – Espectros de FTIR do <i>scaffold</i> de PCL/gelatina sem tratamento de esterilização e tratado com peróxido de hidrogênio, para as quatro diferentes espessuras.	61
Figura 22 – Interpretação do gráfico de citometria de fluxo.	62
Figura 23 – Análise por citometria de fluxo dos controles e das amostras.	63
Figura 24 – Análise do teste de adesão celular.	65
Figura 25 – Representação da metodologia utilizando-se cilindro de aço inox.	76
Figura 26 – Microscopia confocal de fluorescência do (a) lado superior e do (b) lado inferior da membrana cultivada em meio de cultura líquido com cilindro de aço inox.	77
Figura 27 – Microscopia confocal de fluorescência das amostras cultivadas em meio de cultura com ágar em diferentes concentrações.	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos dos parâmetros de eletrofiação na morfologia da fibra.....	31
Tabela 2 – Resumo dos ensaios de eletrofiação.....	42
Tabela 3 – Características físicas dos <i>scaffolds</i> de PCL/gelatina eletrofiados.....	47
Tabela 4 – Diâmetro médio das fibras obtidas por eletrofiação.....	50
Tabela 5 – Valores normalizados de módulo de elasticidade e tensão de ruptura na carga máxima das membranas eletrofiadas.....	51
Tabela 6 – Ângulo de contato das membranas eletrofiadas.	54
Tabela 7 – Porcentagem de eventos contabilizados em cada quadrante pela citometria de fluxo.	64
Tabela 8 – Quantidade de células no teste de adesão celular após 24h e 48h.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	ENGENHARIA TECIDUAL	19
1.2	OBJETIVOS	21
1.3	ESTRUTURA DESTA DISSERTAÇÃO	21
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1	ENGENHARIA TECIDUAL	22
2.2	BIOMATERIAIS	23
2.2.1	<i>Scaffolds</i>	24
2.2.2	Poli(ϵ -caprolactona)	26
2.2.3	Gelatina.....	26
2.3	ELETROFIAÇÃO.....	27
2.3.1	Parâmetros de processo.....	29
2.3.2	Parâmetros da solução	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	MATERIAIS	32
3.2	PRODUÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i>	32
3.2.1	Preparação das Soluções	32
3.2.2	Eletrofiação	32
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i>	33
3.3.1	Condutividade e viscosidade das soluções.....	33
3.3.2	Espessura, densidade aparente e porosidade dos <i>scaffolds</i>	34
3.3.3	Morfologia e diâmetro das fibras	34
3.3.4	Resistência mecânica	35
3.3.5	Molhabilidade por água.....	35
3.3.6	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ...	36

3.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	36
3.4.1	Cultura celular	37
3.4.2	Teste de esterilidade	37
3.4.3	Teste de citotoxicidade.....	37
3.4.4	Teste de adesão celular	39
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	POLÍMEROS E SOLVENTE	40
4.2	PRODUÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i>	41
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS <i>SCAFFOLDS</i>	46
4.3.1	Condutividade elétrica e viscosidade das soluções.....	46
4.3.2	Espessura, densidade aparente e porosidade dos <i>scaffolds</i>	47
4.3.3	Morfologia e diâmetro das fibras	48
4.3.4	Resistência mecânica.....	50
4.3.5	Molhabilidade por água	52
4.3.6	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ...	55
4.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	57
4.4.1	Teste de esterilidade	57
4.4.2	Esterilização dos <i>scaffolds</i>	58
4.4.3	Teste de citotoxicidade.....	62
4.4.4	Teste de adesão celular	64
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
5.1	TRABALHOS FUTUROS	68
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE – Ensaios biológicos preliminares <i>in vitro</i>	75

1 INTRODUÇÃO

A perda ou falha de órgãos e tecidos resultantes de ferimentos, doenças ou mesmo devido ao envelhecimento, gera uma grande demanda por transplantes no mundo todo. Segundo dados divulgados pela Empresa Brasil de Comunicação (2012), o número de transplantes de órgãos e tecidos no Brasil mais que dobrou nas últimas décadas, atingindo 23.397 procedimentos em 2011, o que equivalia a quase 8% do total de transplantes em todo o mundo no mesmo período; em 2016, esse número atingiu 24.958, segundo o Portal da Saúde (2017). No entanto, apesar do número aparentemente elevado de transplantes, ainda existe uma extensa lista de espera, dependendo do órgão necessário, além de outros problemas relacionados, como a limitação econômica, a acessibilidade de doador compatível e a possibilidade de rejeição do órgão transplantado, criando a necessidade de uso contínuo de medicamentos que diminuam os problemas de rejeição no paciente (DINDA; MISHRA, 2013; BRAGHIROLI; STEFFENS; PRANKE, 2014). Neste cenário, a engenharia tecidual assume grande importância, produzindo substitutos compatíveis a partir de um *scaffold* (arcabouço) em que são semeadas as células do próprio paciente, resultando em alta compatibilidade, bom funcionamento e recuperação.

1.1 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual tem como intuito repor, reparar ou ajudar a regenerar tecidos e órgãos danificados por motivos diversos, utilizando-se *scaffolds*, células e biomoléculas, que, em conjunto, mimetizam a matriz extracelular natural do corpo, fornecendo características físicas, químicas e mecânicas que promovem a adesão, migração, proliferação e diferenciação das células (HINDERER et al., 2012; GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013). *Scaffolds* de nanofibras, com sua elevada área superficial e porosidade, são desejáveis para uma alta densidade celular e a cultura de tecidos. Estes *scaffolds* atuam como uma estrutura temporária para as células até que uma nova matriz extracelular seja regenerada na região (AGARWAL; WENDORFF; GREINER, 2009; CHANDRASEKARAN et al., 2011).

Dentre as técnicas usadas para construir biomateriais para serem cultivados com células, a eletrofiação é a mais estudada e, também, tem sido apontada como aquela que apresenta resultados mais promissores em termos de aplicação em engenharia tecidual (BRAGHIROLI; STEFFENS; PRANKE, 2014). Os recentes desenvolvimentos em direção às produções em larga escala combinados com a simplicidade do processo tornam essa técnica muito atraente, pois o processo de eletrofiação proporciona a oportunidade de projetar *scaffolds* com topografia de micro a nanoescala e alta porosidade similar à matriz extracelular natural, utilizando-se diversos tipos de materiais: biodegradáveis, não degradáveis, sintéticos, naturais e híbridos (ZHANG et al., 2005; SILL; VON RECUM, 2008; AGARWAL; WENDORFF; GREINER, 2009). As fibras eletrofiadas podem ser orientadas ou arranjadas randomicamente, dando controle sobre as propriedades mecânicas e resposta biológica do *scaffold*. A elevada relação superfície/volume pode melhorar as propriedades de aderência celular, transporte de fármacos e transferência de massa (HU et al., 2014; SILL; VON RECUM, 2008). Outras propriedades, como hidrofiliabilidade, hidrofobicidade, força mecânica e interação célula-matriz, dependem muito das características do polímero ou polímeros usados para produzir o *scaffold*.

Apesar da possibilidade de obtenção de *scaffolds* de diferentes espessuras pelo método de eletrofiação, essa característica não tem sido muito explorada. Desta forma, um dos propósitos deste trabalho foi analisar como as diferentes espessuras de *scaffolds* de PCL/gelatina, obtidos pelo aumento do tempo de eletrofiação, influenciam em suas propriedades, a fim de promover a produção de modelos com características mais favoráveis às aplicações biomédicas. Além disso, optou-se pelo uso de um solvente único, menos tóxico e de menor custo, para os dois polímeros, de modo a simplificar o processo.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi a avaliação de *scaffolds* de diferentes espessuras em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Os objetivos específicos envolveram a:

- utilização da blenda de um polímero sintético e um biopolímero natural (PCL e gelatina);
- busca por um único solvente menos tóxico e de menor custo que solubilizasse ambos os polímeros;
- busca pelos parâmetros de processo ótimos para a produção das membranas eletrofiadas;
- produção dos *scaffolds* de diferentes espessuras;
- caracterização dos mesmo quanto às suas propriedades físico-químicas;
- caracterização de propriedades biológicas utilizando-se células-tronco mesenquimais.

1.3 ESTRUTURA DESTA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está subdividida em cinco capítulos. O capítulo 2 (Fundamentação Teórica) explora a revisão da literatura referente à proposta do estudo necessária para o desenvolvimento desta dissertação, buscando definir os conceitos de Engenharia Tecidual, Biomateriais, *Scaffolds* e Eletrofiação. No capítulo 3 (Materiais e Métodos) são definidos os materiais e parâmetros de produção dos *scaffolds*, bem como são descritas as metodologias utilizadas para sua caracterização para posterior apresentação de resultados e análises, dispostos no capítulo 4 (Resultados e Discussão). O capítulo 5 (Considerações Finais) aborda as conclusões baseadas nas análises dos resultados e as considerações finais do estudo, com indicações para trabalhos futuros.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENGENHARIA TECIDUAL

Segundo Nerem e Sambanis (1995), a engenharia tecidual como atividade surgiu várias décadas antes de seu nome, aparentemente originado em 1987, e sua definição foi desenvolvida apenas no ano seguinte, durante o primeiro encontro voltado somente para este tema.

“Engenharia tecidual” é a aplicação dos princípios e métodos de engenharia e ciências da vida visando o entendimento fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter, ou melhorar funções. (NEREM; SAMBANIS, 1995, p.4, tradução nossa)

Em outras palavras, é a combinação, desenvolvimento e manipulação de moléculas, células e materiais de engenharia para regeneração e remodelamento de tecidos *in vivo*, para efeitos de reparação, substituição, manutenção ou aumento da função do órgão, e a engenharia e crescimento de tecidos funcionais substitutos *in vitro* para implantação *in vivo* como um substituto biológico para tecidos e órgãos danificados ou doentes. Também é referenciada como medicina reparativa ou regenerativa, e, a princípio, pode substituir qualquer tecido, rígido (cartilagem/osso) ou flexível (pele/veias/artérias/órgãos) (MCGOWAN INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE, 2010; VIOLA; LAL; GRAD, 2003).

Embora o cultivo de células *in vitro* já venha ocorrendo durante muitos anos, o crescimento de tecidos tridimensionais complexos, reproduzindo o *design* e a função do tecido humano, é um desenvolvimento relativamente recente. Para a criação do tecido vivo a ser usado como substituto, as células do paciente são colhidas a partir de uma técnica de biopsia e cultivadas em laboratório podendo ser expandidas em uma matriz tridimensional (*scaffold*), natural ou sintética, na presença de fatores de crescimento e diferenciação (ORÉFICE; DE MAGALHÃES PEREIRA; MANSUR, 2000). A fonte de células para cultivo pode variar, porém, dá-se preferência às células do próprio paciente para evitar qualquer problema com respostas autoimunes (MCGOWAN INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE, 2010).

2.2 BIOMATERIAIS

Segundo Williams (1987, *apud* RATNER et al., 2004, p.2) “Um biomaterial é um material não-viável usado em dispositivos médicos, com o propósito de interagir com sistemas biológicos”, enquanto “Biocompatibilidade é a habilidade de um material atuar com uma resposta adequada do hospedeiro em uma aplicação específica”. Metais, cerâmicas e polímeros têm sido amplamente usados em implantações cirúrgicas ao longo do último século. No entanto, apesar da contribuição dos metais na área ortopédica, esse tipo de material não é biodegradável e seu processamento é bastante limitado (CHEN; USHIDA; TATEISHI, 2002). Tipicamente, os três grupos de biomateriais utilizados para a fabricação de *scaffolds* para engenharia tecidual são as cerâmicas, os polímeros sintéticos e os polímeros naturais (O'BRIEN, 2011). Dentro desse grupo, os polímeros receberam maior atenção e foram mais utilizados em razão do fácil controle quanto à biodegradabilidade e processabilidade (CHEN; USHIDA; TATEISHI, 2002). Segundo O'Brien (2011), apesar do sucesso dos polímeros sintéticos na fabricação de *scaffolds* e o controle da taxa de degradação, esses polímeros ainda apresentam risco de rejeição devido à redução de bioatividade. Já os polímeros naturais, ou biológicos, como o colágeno e a quitosana, diferentemente dos polímeros sintéticos, são biologicamente ativos e promovem excelente adesão e crescimento celular. Além disso, são biodegradáveis, permitindo que as células hospedeiras produzam sua própria matriz extracelular e substitua o *scaffold* degradado, no entanto, apresentam propriedades mecânicas ruins, limitando o seu uso.

Tendo em vista as vantagens e desvantagens de cada tipo de material, as blendas surgem como boa alternativa para a produção de *scaffolds* com as características requeridas para aplicações em que apenas um tipo de material não satisfaz os requisitos, ou apenas para adicionar uma propriedade extra (WILLERTH; SAKIYAMA-ELBERT, 2008). Nas blendas de polímeros sintéticos e naturais são combinadas as propriedades dos polímeros sintéticos, facilmente moldados na forma desejada com relativamente boa resistência mecânica, com as biofuncionalidades dos polímeros naturais, que oferecem vantagens específicas de interação celular e hidrofiliabilidade, ausentes nos polímeros sintéticos (AGARWAL; WENDORFF; GREINER, 2009; CHEN; USHIDA; TATEISHI, 2002; GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013).

2.2.1 Scaffolds

Os *scaffolds* são estruturas porosas tridimensionais que podem ser formados no formato do tecido que precisa ser substituído e feitos a partir de materiais naturais ou sintéticos. Estes materiais devem ser biologicamente compatíveis para a implantação humana e promover um caminho temporário para a regeneração, sendo degradado lentamente conforme as células começam a se regenerar (KARP; DALTON; SHOICHET, 2003; MCGOWAN INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE, 2010), uma vez que não são feitos com a intenção de serem implantes permanentes (O'BRIEN, 2011). O objetivo é que o tecido crescendo no *scaffold* se integre com o tecido hospedeiro, desaparecendo em alguns meses, e sendo substituído pelo novo tecido (KARP; DALTON; SHOICHET, 2003; MCGOWAN INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE, 2010). A taxa de degradação, portanto, deve corresponder à taxa de regeneração do tecido, e o material utilizado não pode ser tóxico para as células tanto na forma original quanto na forma degradada, ou seja, deve ser biocompatível. Assim, estes *scaffolds*, que podem ter diferentes conformações (Figura 1), atuam apenas como suporte para as células até que uma nova matriz extracelular seja regenerada na região, resultando em um tecido compacto e eficiente, permitindo um rápido processo de recuperação (AGARWAL; WENDORFF; GREINER, 2009; CHANDRASEKARAN et al., 2011).

Figura 1 – Exemplos de *scaffolds* para cartilagem com diferentes conformações.

Fonte: Hollister (2005, adaptação nossa).

Além das características de biocompatibilidade e degradação, o *scaffold* deve facilitar a ancoragem das células, permitindo a difusão de nutrientes do sangue. Portanto, uma elevada área superficial e um sistema tridimensional de poros abertos e interconectados são requeridos, possibilitando uma alta densidade celular e a cultura de tecidos. A arquitetura, rugosidade, porosidade e tamanho de poro relevante também são muito importantes, pois afetam a ligação celular, orientação, mobilidade, entre outros (AGARWAL; WENDORFF; GREINER, 2009; CHANDRASEKARAN et al., 2011; BRAGHIROLI; STEFFENS; PRANKE, 2014). Segundo Agarwal, Wendorff e Greiner (2009), *scaffolds* com arquitetura em nanoescala são mais vantajosos devido à área superficial maior que melhora a absorção de proteínas e aumenta a quantidade de sítios de ligação para os receptores da membrana celular. O tamanho mínimo de poro requerido é decidido pelo diâmetro das células, e, portanto, varia de um tipo de célula para outro. Tamanhos inapropriados de poros poderiam levar tanto à não-infiltração, quanto à não-aderência das células. Ainda conforme Agarwal, Wendorff e Greiner (2009), a incorporação de agentes bioativos, como fatores de crescimento, poderia conduzir a *scaffolds* de engenharia tecidual biofuncionalmente avançados, que determinam a eficiência de regeneração de tecidos biologicamente funcionais.

Quanto às propriedades mecânicas, estas devem ser de acordo com a necessidade anatômica do local a ser implantado o tecido, devendo ser forte o suficiente para aguentar, no mínimo, as forças aplicadas durante a operação cirúrgica de implantação, independentemente do tipo de tecido. Alguns tecidos, no entanto, apresentam outras necessidades específicas, como é o caso das aplicações cardiovascular e ortopédica. Para o tecido cardiovascular, é essencial a possibilidade de contração e distensão, já para tecidos do osso e da cartilagem, deve haver integridade mecânica suficiente para funcionar desde a implantação até a total regeneração, levando em consideração que a taxa de recuperação para esse tipo de tecido varia com a idade, podendo demorar mais de um ano (O'BRIEN, 2011). Em relação à produção dos *scaffolds*, Chen, Ushida e Tateishi (2002) citam vários métodos desenvolvidos, como impressão tridimensional, separação de fase, liofilização e eletrofiação, sendo este último o processo abordado por este trabalho e definido ao longo do tópico 2.3.

2.2.2 Poli(ε-caprolactona)

Um polímero comumente utilizado em *scaffolds* é a poli(ε-caprolactona) ou policaprolactona (PCL), um poliéster sintético linear e hidrofóbico que apresenta elevada resistência mecânica, além de ser biodegradável e biocompatível. O PCL é um dos polímeros eletrofiados mais significantes da última década, apresenta baixo custo e é aprovado pela *Food and Drug Administration (FDA)*, o órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle de alimentos, medicamentos, materiais biológicos, entre outros (RATNER et al., 2004; CHONG et al., 2007; CIPITRIA et al., 2011; AZIMI et al., 2014). Sua fórmula molecular é apresentada na Figura 2.

Apesar dos *scaffolds* de nanofibras de PCL eletrofiadas mimetizarem arquitetonicamente a matriz extracelular em tecidos vivos, sua baixa hidrofilicidade reduz suas habilidades de adesão, migração, proliferação e diferenciação celular.

Figura 2 – Fórmula molecular da poli(ε-caprolactona).

Fonte: Sigma-Aldrich (2017).

2.2.3 Gelatina

A gelatina, cuja fórmula molecular é apresentada na Figura 3, é um biopolímero natural derivado do colágeno, um componente majoritário da matriz extracelular nativa. É biocompatível, biodegradável, não-imunogênica e, aparentemente, retém sinais informativos que promovem a adesão, diferenciação e proliferação celular (CHONG et al., 2007; GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013).

Sozinha, a gelatina não forma fibras com facilidade para a fabricação de *scaffolds* eletrofiados e, além disso, apresenta propriedades mecânicas ruins. Assim, torna-se interessante a combinação desta com um polímero sintético como o PCL, uma vez que a eletrofiação do polímero sintético com o biopolímero natural resulta em uma blenda com propriedades intermediárias, e, portanto, os *scaffolds* dessa blenda

apresentam elevada resistência mecânica, proveniente do polímero sintético, importante para resistir às forças das atividades fisiológicas e de manipulação, com a hidrofiliabilidade do biopolímero natural, que melhora as propriedades de interação com as células (CHONG et al., 2007; CIPITRIA et al., 2011; GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013).

Figura 3 – Fórmula molecular da gelatina.

Fonte: Gautam et al. (2014, adaptação nossa).

2.3 ELETROFIAÇÃO

O processo de produzir uma fibra por meio da técnica de eletrofiação, doravante denominado apenas por eletrofiação, baseia-se no princípio eletrostático, utilizando uma fonte de alta voltagem para injetar uma carga de certa polaridade em uma solução polimérica ou polímero fundido, que é, então, acelerado em direção a um coletor de polaridade oposta. Conforme a atração eletrostática entre o líquido e o coletor carregados com cargas opostas e as repulsões eletrostáticas entre as cargas iguais no líquido tornam-se mais fortes, a extremidade dianteira da solução muda de um menisco arredondado para um cone (o cone de Taylor), que posteriormente pode ser alongado num jato fluido quando a força eletrostática supera a tensão superficial da solução. Alguns parâmetros afetam a formação do cone de Taylor e a instabilidade do jato, como a condutividade da solução ou do material fundido, a eletrostática, a força do campo elétrico, a carga da superfície e o campo de ionização. O jato carregado viaja através da atmosfera permitindo que o solvente evapore, conduzindo, assim, à deposição de fibras poliméricas sólidas no coletor (LEE; LIVINGSTON ARINZEH, 2011; SILL; VON RECUM, 2008). Esse processo tem suas raízes no processo de eletrospray, em que gotículas poliméricas sólidas são

formadas em vez de fibras. Na verdade, um número de parâmetros de processo devem ser otimizados para gerar fibras no lugar de gotículas, e um aparelho típico de eletrofição pode ser utilizado para formar fibras, gotículas ou uma estrutura com *beads*, dependendo dos vários parâmetros de processo, como a distância entre o capilar e o coletor (SILL; VON RECUM, 2008).

Uma típica configuração de eletrofição consiste de um capilar pelo qual a solução a ser eletrofiada é forçada, uma fonte de alta tensão com polaridade positiva ou negativa que injeta carga à solução, e um coletor aterrado. Uma bomba de seringa, força gravitacional ou gás pressurizado são tipicamente usados para forçar a solução pelo pequeno diâmetro do capilar, formando uma gota na ponta. Um eletrodo da fonte de alta tensão é imerso no líquido ou pode ser anexado ao capilar se uma agulha metálica for usada. Enquanto o jato de fibra é acelerado através da atmosfera em direção ao coletor, ele sofre uma instabilidade flexível caótica aumentando o tempo de passagem e o comprimento do percurso até o coletor e auxiliando no afinamento das fibras e no processo de evaporação do solvente (SILL; VON RECUM, 2008). A Figura 4 ilustra um equipamento de eletrofição composto por uma bomba de seringa, uma seringa com uma agulha metálica, um coletor metálico aterrado e uma fonte de alta voltagem. A solução polimérica a ser eletrofiada é carregada na seringa com a agulha metálica acoplada e uma alta voltagem é introduzida a esta solução, que é ejetada a uma taxa desejada, controlada pela bomba de seringa (LEE; LIVINGSTON ARINZEH, 2011).

Figura 4 – Esquema do processo de eletrofição. (a) Arranjo típico de eletrofição em coletor plano e (b) método de coleta que permite criar membranas com fibras alinhadas usando coletor rotativo.

Fonte: Lee e Livingston Arinzeh (2011, adaptação nossa).

Dependendo da aplicação, um número de configurações de coletor pode ser utilizado, incluindo placa estacionária, cilindro rotativo, solvente (ex: água), etc. Tipicamente, um coletor estacionário resultará na formação de matrizes fibrosas orientadas randomicamente (Figura 4a), e um coletor rotativo pode ser usado para gerar malhas com fibras alinhadas, com a velocidade de rotação tendo um papel importante na determinação do grau de anisotropia (Figura 4b). As fibras podem variar em diâmetro, de nano a microescala, dependendo dos parâmetros de processo utilizados (LEE; LIVINGSTON ARINZEH, 2011; SILL; VON RECUM, 2008). Ainda, de acordo com Sill e Von Recum (2008), estudos mostraram que a condutividade e a porosidade do coletor interferem na densidade de empacotamento das fibras coletadas. Além disso, a geometria do coletor também pode ser selecionada com base na aplicação, para formar uma estrutura laminar ou tubular, para a mesma configuração de eletrofiação, meramente mudando o coletor.

É importante notar que a força gravitacional não interfere devido à aceleração da formação da fibra ser superior a 600 m/s^2 , que é quase duas ordens de grandeza maior que a força da aceleração gravitacional (BRAGHIROLI; STEFFENS; PRANKE, 2014). Esta facilidade de uso e adaptabilidade é uma das principais razões da popularidade renovada em relação ao processo de eletrofiação, além do desenvolvimento das nanofibras levarem ao ressurgimento do interesse devido às potenciais aplicações em filtração, roupas de proteção e aplicações biológicas como engenharia tecidual, *scaffolds* e dispositivos de transporte de fármacos (SILL; VON RECUM, 2008).

2.3.1 Parâmetros de processo

As potenciais permutações para os parâmetros instrumentais de eletrofiação são intermináveis, e para a malha eletrofiada ser reproduzida, no mínimo as seguintes informações são requeridas: voltagem, taxa de escoamento, distância entre o capilar e o coletor, arranjo vertical ou horizontal, comprimento do tubo (se houver), diâmetros interno e externo da agulha, e tipo de coletor, incluindo dimensões e velocidade de rotação, se houver. A polaridade da fonte de voltagem, o local de aterramento (se usado), e a dimensão do sistema coletor devem todos ser definidos, e também se o dispositivo está no interior de uma câmara ou exposto ao ar

(CIPITRIA et al., 2011). Parâmetros ambientais, como a temperatura da solução, umidade e velocidade do ar também são cruciais para a morfologia e a estrutura das fibras, resultando fibras úmidas ou secas, com ou sem *beads*, randômicas ou alinhadas (Figura 5). A escolha de determinados parâmetros é feita baseada na solução polimérica e na aplicação das fibras formadas (BRAGHIROLI; STEFFENS; PRANKE, 2014). Segundo Sill e Von Recum (2008), três dos parâmetros em ordem de impacto relativo para o processo de eletrofiação são a voltagem aplicada, a taxa de escoamento e a distância entre o capilar e o coletor. Todos esses parâmetros podem influenciar na formação das fibras e de defeitos de *beads*.

Figura 5 – Morfologia das fibras. (a) Fibras randômicas, (b) fibras com *beads* e (c) fibras alinhadas.

Fonte: Braghirolli, Steffens e Pranke (2014).

2.3.2 Parâmetros da solução

Além dos parâmetros de processo, um número de parâmetros da solução tem um papel importante na formação da fibra e em sua estrutura. As principais propriedades da solução polimérica são o tipo de polímero e sua massa molar, o solvente e a concentração da solução. Propriedades adicionais como a viscosidade, tensão superficial, condutividade e força dielétrica podem ser úteis para relacionar os parâmetros de processo da eletrofiação à morfologia final atingida. Estudos com solventes mostraram que as diferentes condutividades entre eles afetam a morfologia da malha eletrofiada (CIPITRIA et al., 2011). Além disso, o solvente selecionado deve ter pressão de vapor adequado para promover a integridade da fibra (SARKAR et al., 2010). Em ordem relativa aos seus impactos no processo de eletrofiação, inclui-se a concentração de polímero, a volatilidade do solvente e a condutividade do solvente. Apesar de um número de relações generalizadas entre os parâmetros de processo e a morfologia da fibra poder ser estabelecido (Tabela

1), é importante perceber que as relações exatas se diferenciarão para cada sistema polímero/solvente. Dependendo de alguns parâmetros de solução, resultados muito diferentes podem ser obtidos usando o mesmo polímero e configurações de eletrofiação, sendo difícil estabelecer relações quantitativas que possam ser aplicadas a uma grande abrangência de sistemas polímero/solvente (SILL; VON RECUM, 2008).

Tabela 1 – Efeitos dos parâmetros de eletrofiação na morfologia da fibra.

Parâmetro	Efeito na morfologia da fibra
Voltagem Aplicada ↑	Diâmetro da fibra ↓ inicialmente, então ↑
Taxa de escoamento ↑	Diâmetro da fibra ↑ (morfologia com <i>beads</i> se a taxa de escoamento é muito alta)
Distância entre capilar e coletor ↑	Diâmetro da fibra ↓ (morfologia com <i>beads</i> se a distância entre o capilar e o coletor é muito pequena)
Concentração de polímero (viscosidade) ↑	Diâmetro da fibra ↑ (dentro da faixa ótima)
Condutividade da solução ↑	Diâmetro da fibra ↓ (ampla distribuição de diâmetro)
Volatilidade da solução ↑	Fibras exibem microtextura (poros na superfície, com aumento da área superficial)

↑, refere-se a aumento e ↓, redução.

Fonte: Sill e Von Recum (2008, p.1992, tradução nossa).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foram utilizados PCL da Sigma-Aldrich (pellets, $M_n = 70\,000\text{--}90\,000\text{ g/mol}$), gelatina da Fisher Scientific (100 Bloom Tipo B, grânulos, grau purificado) e ácido acético glacial da Quimex (99,7%).

3.2 PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS

3.2.1 Preparação das Soluções

As soluções foram preparadas a partir da mistura de PCL (10% m/m) e gelatina (5% m/m) em ácido acético glacial sob agitação magnética de 300 rpm por 20 h – 24 h, a temperatura ambiente ($23 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$) no dia anterior ao ensaio, para evitar degradação do PCL (POK; WALLACE; MADIHALLY, 2010). A agitação da solução só foi interrompida no momento de iniciar o processo.

3.2.2 Eletrofiação

O sistema de eletrofiação (Figura 6) consiste em uma seringa de plástico descartável de 5 mL com 12,1 mm de diâmetro interno, substituída a cada ensaio, acoplada a uma agulha metálica de extremidade plana, de 22 G (cor azul, da marca EFD), uma bomba de seringa (modelo PHD 2000 Infuse/Withdraw, Harvard Apparatus), uma fonte de alta tensão e um coletor metálico rotativo, de 46,5 mm de diâmetro e com velocidade rotacional de 36 rpm, envolto por papel manteiga, sobre o qual as fibras eram coletadas. O sistema foi mantido no interior de uma capela fechada e com a exaustão desligada para evitar a perda das fibras.

Foram produzidos quatro conjuntos de *scaffolds* de PCL/gelatina de diferentes espessuras, preparados sob as mesmas condições, exceto pela duração do tempo de eletrofiação (A = 1 h, B = 1,5 h, C = 2 h e D = 3 h). Os parâmetros utilizados foram: vazão de 1 mL/h, distância entre a ponta da agulha e o coletor metálico de 12 cm, e tensão aplicada de 15 kV. As amostras foram preparadas em triplicata, em

temperatura ambiente de 23 ± 1 °C e $76 \pm 5\%$ de umidade relativa do ar. Todos os *scaffolds* foram secos em dissecador a vácuo por 7 dias para remover qualquer resíduo de solvente.

Figura 6 – Sistema de eletrofiação.

Fonte: autoria própria.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS

3.3.1 Condutividade e viscosidade das soluções

As soluções foram caracterizadas quanto à condutividade elétrica utilizando-se o condutivímetro Mettler Toledo, modelo MC226, e quanto à viscosidade por meio do reômetro Brookfield LVDVIII Ultra com o conjunto “Small Sample” Adaptor e o *spindle* 31.

3.3.2 Espessura, densidade aparente e porosidade dos *scaffolds*

A espessura média de cada conjunto de *scaffolds* foi feita com o espessômetro Digimatic Indicator Mitutoyo, modelo ID-C112CB. Foram coletadas 40 medidas para cada triplicata. A densidade aparente e a porosidade foram estimadas a partir de duas amostras de cada triplicata, utilizando-se as eq.(1) e (2), respectivamente (CHONG et al., 2007; XUE et al., 2014). A densidade mássica do PCL/gelatina foi calculada a partir da proporção de massa relativa de cada componente, considerando que a proporção final de PCL/gelatina no *scaffold* é de 2:1.

$$Densidade\ aparente\ (g/cm^3) = \frac{Massa_{scaffold}\ (g)}{Espessura_{scaffold}\ (cm) \times \acute{A}rea_{scaffold}\ (cm^2)} \quad (1)$$

$$Porosidade\ (\%) = \left(1 - \frac{Densidade\ aparente_{scaffold}\ (g/cm^3)}{Densidade\ mássica_{PCL/gelatina}\ (g/cm^3)} \right) \times 100\% \quad (2)$$

3.3.3 Morfologia e diâmetro das fibras

A caracterização morfológica dos *scaffolds* de PCL/gelatina foi feita em microscópio eletrônico de varredura (MEV; Quanta 3D FEG, FEI), utilizando-se o detector de elétrons secundários (ETD) a uma voltagem de 20 kV, depois do recobrimento das amostras com ouro (Sputter Coater SC7620, Emitech). As amostras, de 5 mm x 5 mm de cada membrana eletrofiada, foram coladas ao porta-amostra com fita de carbono. O diâmetro médio das fibras de cada conjunto de *scaffolds* foi calculado com base nas micrografias obtidas no MEV, usando a ferramenta 'Straight' do software Image J, NIH. Foram capturadas 3 imagens de regiões distintas de cada amostra e realizadas 40 medidas por imagem (BEACHLEY, WEN, 2009; HINDERER et al., 2012; GAUTAM, DINDA, MISHRA, 2013).

3.3.4 Resistência mecânica

O ensaio mecânico de resistência à tração foi realizado com o equipamento Instron, modelo 5869, utilizando-se garras fixas com distância inicial de 10 mm e taxa de afastamento de 5 mm/min. Foram analisadas pelo menos 5 amostras de cada membrana, com dimensão de 20 mm x 5 mm, cujas espessuras foram medidas em 5 pontos distintos (MENG et al., 2010; GOMES et al., 2014). Para facilitar o manuseio das amostras durante os ensaios, estas foram presas a um suporte de papel, que foi cortado antes do início de cada ensaio. A dimensão final das amostras para a realização do teste, depois de presas nas garras, foi de 10 mm x 5 mm (Figura 7).

Figura 7 – Dimensões da amostra, esquema do suporte de papel e foto da amostra no equipamento.

Fonte: autoria própria.

3.3.5 Molhabilidade por água

Esse teste indica a capacidade da superfície de um sólido ser molhada por uma gota de água, e indica o caráter hidrofílico da superfície. A molhabilidade dos *scaffolds* foi determinada pela medida do ângulo de contato a partir de uma montagem própria com uma câmera fotográfica Canon, modelo Power Shot S200 (Figura 8). Cada amostra foi colada com fita dupla-face sobre uma lâmina de vidro, e uma gota de água destilada e deionizada de volume igual a 10 μ L foi depositada sobre a superfície da membrana. A imagem foi capturada após 10 segundos da deposição da gota, e a medida do ângulo de contato foi feita usando a função 'Drop Analysis – LBADSA' do software Image J, NIH. Os ensaios foram realizados em triplicata (KU, PARK, 2010; GOMES et al., 2015).

Figura 8 – Sistema para capturar a imagem da gota sobre as amostras.

Fonte: autoria própria.

3.3.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram avaliadas antes e após o tratamento de esterilização por peróxido de hidrogênio por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Nicolet 6700, Thermo Scientific) utilizando o módulo de refletância total atenuada (ATR), que consiste em determinar a refletância dos raios incidentes. Cada análise foi composta por 32 varreduras na faixa espectral de 700 a 4000 cm^{-1} e uma resolução de 2 cm^{-1} . A análise também foi realizada para PCL e gelatina puros e para o *scaffold* de PCL/gelatina.

3.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

Os ensaios biológicos foram realizados em parceria com o Laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). As células utilizadas nos ensaios foram células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas de tecido adiposo do dorso de coelhos da raça Botucatu, entre a 4^a a 6^a passagem, que caracterizam as células-tronco em estágio inicial, ou seja, que ainda não sofreram diferenciação celular. As células foram mantidas com meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 2 % de antibiótico e antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina B), meio padrão para cultura de CTMs, sendo trocado a cada 48h. O cultivo celular foi realizado em garrafas de 75 cm^2 , T75

Thermofisher™. Para os ensaios com células, os *scaffolds* foram submetidos à esterilização pelo método de Sterrad® (peróxido de hidrogênio). Todo o processo de manipulação desde o preparo das amostras para os ensaios biológicos foi realizado em condição de esterilidade, em capela de fluxo laminar. Ensaio preliminares e independentes estão descritos no Apêndice.

3.4.1 Cultura celular

As células foram cultivadas em garrafas próprias para cultivo até a obtenção de quantidade expressiva necessária para a realização dos ensaios, sendo mantidas em incubadora umidificada a 37 °C com 5 % de dióxido de carbono (CO₂). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, após lavagem com solução tampão de fosfato (PBS). A recuperação das células aderidas às garrafas foi feita com solução de tripsina-EDTA 0,025 %, posteriormente neutralizada com o meio (DMEM-F12 + SFB). As células foram contadas manualmente utilizando-se a câmara de Neubauer, a partir de uma alíquota corada com azul de Tripán, conforme protocolo padrão.

3.4.2 Teste de esterilidade

Foram cortadas amostras de 0,25 cm² de cada espessura dos *scaffolds* em duas condições: sem tratamento de esterilização e tratados pelo método de desinfecção por radiação ultravioleta (UV). Para o tratamento por UV, cada lado da membrana foi exposto a essa radiação por 30 minutos. Cada fragmento cortado foi alocado em uma placa de Petri estéril de 35 mm de diâmetro para cultura em suspensão (Corning®) e adicionado 500 µL de meio DMEM-F12 suplementado com 10 % SFB, sem a presença de células. As placas foram armazenadas em incubadora umidificada a 37 °C com 5 % de CO₂, e mantidas por 24h e 48h, quando foram analisadas em microscópio óptico. Ao detectar a presença de bactérias, a membrana foi retirada e o meio de cultura foi inoculado no frasco BacT/ALERT® (kit comercial da bioMérieux) para a identificação dos microrganismos presentes (aeróbio, anaeróbio e/ou fungos).

3.4.3 Teste de citotoxicidade

Após a esterilização dos *scaffolds* pelo método de Sterrad®, um fragmento de 6 cm² de cada espessura foi colocado em placa de Petri, separadamente, e mantido

imerso em 2,5 mL de meio DMEM-F12 estéril, por 7 dias, para a liberação de eventuais agentes tóxicos. Após esse período, este meio, sem a membrana, foi colocado na presença das células em fase exponencial de crescimento por 24 horas para se determinar o índice de apoptose e necrose celular. A avaliação da citotoxicidade foi feita utilizando-se o kit FITC-Anexina V para detecção de apoptose (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen™) pelo método de citometria de fluxo no equipamento BD FACS Calibur™, conforme protocolo, e analisando-se as células com o software BD CellQuest™.

As CTMs foram plaqueadas em placa de 6 poços estéril aderente da Cellstar® (1×10^5 células/mL), sendo quatro poços para os *scaffolds* de diferentes espessuras e dois poços para controle (Figura 9): um controle negativo (CT), que corresponde às células não expostas ao meio que ficou em contato com as membranas, ou seja, exposto ao meio de cultura em condições normais, e um controle de autofluorescência (CT auto), utilizada como controle do equipamento. Após as 24 horas, as células foram recuperadas com tripsina-EDTA e levadas para a leitura no equipamento, que faz a contagem de 10 a 20 mil eventos (células marcadas) por meio da passagem das células por uma cânula estreita que as ordena de modo que passe apenas uma por vez.

Figura 9 – Montagem do experimento de citotoxicidade: amostras em meio DMEM-F12 na placa de Petri e cultura celular em placa de 6 poços.

Fonte: NUNES, H. C., 2017.

3.4.4 Teste de adesão celular

Uma amostra de 1 cm² de cada *scaffold* foi colocada separadamente em cada poço de uma placa estéril de 24 poços para cultura em suspensão (Cellstar®). As amostras, já esterilizadas por Sterrad®, foram condicionadas com o meio de cultura antes da adição das CTMs. Foram semeados 500 µL da solução com células em suspensão (1×10^5 células/mL) sobre cada *scaffold*. A suspensão foi mantida por no mínimo 30 minutos para permitir a adesão das células aos *scaffolds* antes da adição de meio. Foram preparadas amostras para contagem em 24h e 48h, em triplicata. Após o período de incubação, os *scaffolds* foram lavados com PBS, para retirar as células não aderidas, e então transferidos para outra placa de 24 poços, para evitar interferência de células aderidas à placa na contagem de células em cada amostra. Na nova placa, foi realizado o tratamento com tripsina-EDTA nas amostras e retirada uma alíquota para contagem das CTMs em câmara de Neubauer por coloração com azul de Tripán. Células também foram semeadas em triplicata em uma placa de 24 poços aderente, sem *scaffold*, para controle (CT) do crescimento celular.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como *média ± desvio padrão*. A análise de variância foi realizada utilizando-se o teste t de Student para os ensaios físico-químicos, e ANOVA unidirecional em conjunto com o Teste de Tukey para comparações múltiplas para os ensaios biológicos. Em ambos os casos o nível de significância, *p*, foi considerado como estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 POLÍMEROS E SOLVENTE

A escolha do PCL e da gelatina para a produção de *scaffolds* de nanofibras para aplicação em engenharia tecidual foi visando uma fácil inserção no mercado, uma vez que, além de serem polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, ambos já são aceitos e utilizados na área médica. Para a escolha do solvente, foram consideradas as propriedades de vaporização/volatilidade, condutividade, solubilização dos polímeros, dando preferência a um único solvente que solubilizasse os dois polímeros escolhidos, simplificando o preparo, toxicidade, tanto na manipulação durante o processo quanto na aplicação com células, e sua disponibilidade e custo, pois, na literatura, grande parte dos trabalhos envolve o preparo da solução em diversas etapas, utilizando-se solventes tóxicos, muitas vezes halogenados, sendo que muitos deles têm baixa disponibilidade e preços elevados. Além disso, alguns solventes complexos como o 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) e o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), que já foram propostos para a fabricação de *scaffolds* feitos a partir de polímeros naturais, como o colágeno, são altamente corrosivos e podem afetar a estrutura original da proteína (ERENCIA et al.,2015).

Acetona, acetato de etila e limoneno foram alguns dos solventes testados, porém, eles não solubilizaram os polímeros. Após testes com outros diversos solventes e misturas dos solventes, optou-se pelo ácido acético, por ser aquele que melhor correspondeu aos requisitos propostos e, segundo Ferreira et al. (2014), o ácido acético pode ser facilmente neutralizado e lavado sem deixar resíduos tóxicos, sendo uma alternativa interessante para engenharia tecidual, uma vez que também é miscível com solvente polares, permitindo a fácil mistura do PCL com polímeros hidrofílicos. A solução de PCL e gelatina em ácido acético foi obtida pela simples mistura dos dois polímeros secos e posterior adição do solvente, a temperatura ambiente e agitação constante, gerando uma solução de aspecto límpido com coloração bege. A agitação magnética foi mantida em 300 rpm, velocidades maiores sofreram interferência com o tempo devido à solubilização dos polímeros e consequente aumento da viscosidade das soluções, mantidas sob agitação por 20 a 24 horas para garantir a solubilização dos polímeros e homogeneidade da solução.

4.2 PRODUÇÃO DOS SCAFFOLDS

Com os polímeros e o solvente definidos, iniciou-se a busca pelos parâmetros ótimos para a eletrofiação dos *scaffolds*, tendo como ponto de partida os valores mais encontrados na literatura. Foram testadas diferentes concentrações dos polímeros em solução (8 %, 10 %, 15 % e 20 % de PCL, 8 % de PCL + 8 % de gelatina, 10 % de PCL + 5 % de gelatina, em porcentagem mássica), sempre utilizando o ácido acético como solvente. Os parâmetros de processo, como a vazão da solução polimérica, a distância entre a agulha e o coletor metálico e a voltagem aplicada, também foram explorados.

Para cada combinação de parâmetros, foi coletada uma amostra sobre uma lamínula de vidro colada com fita adesiva sobre o coletor metálico, permitindo sua fácil remoção para observação em microscópio óptico (MO), possibilitando a avaliação de cada amostra de maneira simples e rápida, cada amostra foi obtida em alguns segundos, para o direcionamento dos próximos testes sem a necessidade de manter o processo de eletrofiação por um tempo elevado para a obtenção de amostras. As imagens obtidas indicaram que nenhum dos ensaios formou fibras, apenas gotículas (Figura 10), mesmo em ensaios realizados seguindo os procedimentos da literatura apenas com o PCL e o clorofórmio como solvente, uma combinação comum e regularmente utilizada que apresenta bons resultados na formação das fibras (CIPITRIA et al., 2011; FERREIRA et al., 2014). A constatação de que soluções de PCL de menor massa molar (45k) apresentavam viscosidade nitidamente maior do que a viscosidade das soluções testadas com PCL 80k indicou que a anomalia estava associada ao PCL utilizado. A repetição dos ensaios de eletrofiação com PCL 80k de um novo lote possibilitou a formação de fibras, além de a solução apresentar-se mais viscosa do que a obtida anteriormente, confirmando a hipótese de que o primeiro lote de PCL 80k estava, possivelmente, degradado. A Tabela 2 resume os novos ensaios realizados com concentrações variadas de polímeros e parâmetros de processo. Para cada solução foram testadas diferentes vazões e uma permutação de combinações entre as diferentes voltagens e distâncias entre agulha e coletor, cobrindo uma range de variações. Em todos os ensaios utilizou-se o ácido acético como solvente e as amostras geradas foram observadas em microscópio óptico para verificar a formação de fibras e seu aspecto.

Figura 10 – Microscopia óptica (40x) de uma amostra de um ensaio de eletrofiação com formação de gotículas.

Fonte: autoria própria.

Tabela 2 – Resumo dos ensaios de eletrofiação.

PCL (%m/m)	Gelatina (%m/m)	Vazão (mL/h)	Distância entre agulha e coletor metálico (cm)	Voltagem (kV)	Observações sobre as fibras
10	-	1,0	6~12	10~20	Muito finas com muitos <i>beads</i>
10	-	0,5	6	7	Muito finas com muitos <i>beads</i>
15	-	1,0	10	10~20	Mais grossas com alguns <i>beads</i>
15	-	0,5	10	12	Mais grossas, com poucos <i>beads</i>
15	-	0,3	10	7	Mais grossas, com poucos <i>beads</i>
20	-	1,0	10	10~20	Mais grossas e irregulares, quase sem <i>beads</i>
20	-	0,3	10~12	6~17	Mais grossas e irregulares, quase sem <i>beads</i>
10	5	1,0	10~15	9~20	Mais grossas quase sem <i>beads</i>
10	5	0,7	12	15	Mais grossas quase sem <i>beads</i>
10	5	0,3	10~12	8~15	Mais grossas quase sem <i>beads</i>

Fonte: autoria própria.

Ensaio realizados com soluções preparadas anteriormente e armazenadas por aproximadamente uma semana apresentaram interferência na formação das fibras. Para soluções apenas com PCL, não se formaram fibras, apenas gotículas, como nos primeiros testes com o lote de PCL degradado. Para soluções de PCL com gelatina, houve a formação de fibras extremamente finas, quase imperceptíveis no microscópio óptico, e com muitos *beads* (Figura 11a). Testando-se uma solução de PCL 9 % (massa/volume) em clorofórmio/metanol armazenada há mais de 15 dias, as fibras se formaram normalmente (Figura 11b), indicando a degradação do PCL pelo ácido acético com o tempo e sugerindo que as fibras formadas ao se utilizar a solução de PCL/gelatina seriam originárias apenas da gelatina, não sendo possível armazenar as soluções para uso posterior por um período estendido, conforme relatado por Pok et al. (2010). Testes com diferentes coletores metálicos não apresentaram alteração nos resultados, enquanto o exaustor ligado na capela interferiu na formação de fibras dependendo da intensidade, deixando-as irregulares, com diâmetro variável, e dificultando a sua coleta. Assim, todas as soluções foram preparadas no dia anterior ao experimento e os ensaios procederam no interior de uma capela fechada, para evitar riscos devido à alta tensão e à evaporação do solvente, porém com a exaustão desligada, para não haver perda das fibras formadas.

Figura 11 – Microscopia óptica (40x) das amostras de (a) PCL 8 % m/m com gelatina 8 % m/m em solução de ácido acético e (b) PCL 9 % m/v em clorofórmio/metanol.

Fonte: autoria própria.

Novos ensaios foram realizados a partir de soluções de 10 %, 15 % e 20 % m/m de PCL e de uma solução de 10 % m/m de PCL com 5 % m/m de gelatina, variando-se os parâmetros de processo. Imagens de microscópio óptico das fibras obtidas, com os mesmos parâmetros (1 mL/h de vazão, 10 cm de distância entre a agulha e o coletor e 15 kV de tensão aplicada) para comparação, são mostradas na Figura 12. As fibras formadas a partir da solução de PCL 10 % m/m apresentaram-se bem finas e com muitos *beads*, aumentando o diâmetro e diminuindo consideravelmente a quantidade de *beads* com o aumento da concentração de polímero em solução, sugerindo que quanto mais finas as fibras formadas, maior a ocorrência de *beads*. O desaparecimento dos mesmos com o aumento da concentração de PCL também foi observado por Ferreira et al. (2014), que explicou sua formação com o deslocamento da solução ao longo do jato, causado quando as forças associadas à tensão superficial são fortes o suficiente para a produção de locais com menor relação superfície/volume.

As fibras obtidas pela solução de PCL 10% com gelatina 5% m/m, que corresponde a 15% de polímero, apresentaram aspecto semelhante às fibras de PCL 15% m/m, com fibras bem definidas e pouca ocorrência de *beads*, dessa forma, optou-se por prosseguir com esta proporção de PCL e gelatina. A utilização de uma solução de 20% m/m de polímero foi descartada devido à viscosidade ser muito elevada, aumentando a perda de solução e a dificuldade na manipulação. Assim, analisando-se as fibras obtidas com diferentes parâmetros de processo a partir da solução de PCL 10% com gelatina 5% em microscópio óptico, escolheram-se duas amostras, com os respectivos parâmetros, para a fabricação de *scaffolds* para análise em MEV. As imagens obtidas por MEV (Figura 13) mostram que as fibras eletrofiadas com os diferentes parâmetros de processo apresentaram um aspecto semelhante, embora a eletrofiação com menor vazão tenha gerado fibras de diâmetros menores e mais uniformes, conforme relatado por Sill e von Recum (2008).

Figura 12 – Microscopia óptica (40x) das amostras de (a) PCL 10 % m/m, (b) PCL15 % m/m, (c) PCL 20 % m/m e (d) PCL 10 % m/m com gelatina 5 % m/m.

Fonte: autoria própria.

Figura 13 – Microscopia eletrônica de varredura de membranas de PCL 10 % m/m com gelatina 5 % m/m, (a) vazão 1,0 mL/h, distância agulha-coletor 12 cm e tensão 15 kV e (b) vazão 0,3 mL/h, distância agulha-coletor 12 cm e tensão 10 kV, magnificação 10000x.

Fonte: autoria própria.

Pensando na produção e avaliação de *scaffolds* de diferentes espessuras, possivelmente a eletrofiação de massas maiores de polímero tornaria a diferença de espessura entre os *scaffolds* mais nítida ao eletrofiar com tempos distintos, facilitando a comparação entre eles, e a utilização de uma vazão maior é a opção que permite isso. Dessa forma, como morfologicamente as fibras nos dois casos são semelhantes, optou-se pela utilização da maior vazão, de 1,0 mL/h, com distância de 12 cm entre a agulha e o coletor, e uma tensão de 15 kV, para a produção dos quatro *scaffolds* de diferentes espessuras, mantendo-se a concentração da solução e os outros parâmetros envolvidos e mudando-se apenas o tempo de eletrofiação. Cada membrana de espessura diferente foi eletrofiada em triplicata.

Antes de prosseguir com as próximas análises, foi avaliada a necessidade de realizar o *crosslink* (reticulação) das membranas, uma vez que o uso de gelatina geralmente requer esse tratamento pra melhorar a estabilidade devido à sua solubilidade em água, no entanto, o processo de reticulação é considerado potencialmente citotóxico (ZHOU et al., 2011; RAJZER et al., 2015; REDDY, REDDY, JIANG, 2015). Por outro lado, a incorporação da gelatina a outro polímero biodegradável, particularmente o PCL, mantém a largura das fibras e a porosidade, proporcionando um meio simples e eficiente de estabilizar a estrutura dos *scaffolds* sob condições fisiológicas, eliminando a necessidade de realizar o *crosslink* (ZHANG et al., 2005; HEYDARKHAN-HAGVALL et al. 2008; KIM et al., 2013). Dessa forma, os *scaffolds* de diferentes espessuras obtidos foram mantidos sem esse tratamento.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS

4.3.1 Condutividade elétrica e viscosidade das soluções

A caracterização das soluções muitas vezes é feita antecipadamente e utilizada como parâmetro de escolha da solução, no entanto, devido à grande quantidade de soluções diferentes testadas desde o início do projeto, essa caracterização foi feita apenas depois de estabelecido o solvente e as concentrações poliméricas. Foram medidas a condutividade elétrica e a viscosidade de uma solução com as concentrações dos polímeros escolhidas, 10% m/m de PCL e 5% m/m de gelatina,

preparada especialmente para essas análises, isto é, as soluções não foram reutilizadas posteriormente, pois, durante as análises, parte do solvente é perdido por evaporação, modificando a concentração final da solução e podendo interferir no processo de eletrofiação caso a mesma solução fosse utilizada para tal. As medidas foram feitas em triplicata, resultando em uma condutividade de $13,7 \pm 0,2 \mu\text{S}/\text{cm}$, e uma viscosidade de $1701 \pm 14 \text{ cP}$.

4.3.2 Espessura, densidade aparente e porosidade dos *scaffolds*

Os *scaffolds* de PCL/gelatina foram eletrofiados com quatro espessuras diferentes mudando-se o tempo de eletrofiação. As amostras foram identificadas como A = 1 h, B = 1,5 h, C = 2 h e D = 3 h. Para o cálculo de densidade aparente e de porosidade de cada membrana, foram utilizadas as eq.(1) e (2), respectivamente, sabendo-se que a densidade mássica de uma mistura é a média ponderada dos componentes da mistura, assim, o cálculo foi feito para uma proporção de 2:1 de PCL e gelatina, referente à proporção final desses dois polímeros no *scaffold*. A Tabela 3 resume as espessuras medidas e os valores de densidade aparente e porosidade calculados, onde se nota um claro aumento da espessura proporcionalmente ao tempo de eletrofiação para a produção de cada *scaffold*, com diferença significativa entre eles ($p < 0,05$), enquanto a densidade aparente e a porosidade se mantiveram constantes ($p > 0,05$). Esse resultado indica que manter as condições de eletrofiação constantes resulta em uma taxa de deposição uniforme, permitindo que as fibras sejam coletadas da mesma maneira desde o começo do processo.

Tabela 3 – Características físicas dos *scaffolds* de PCL/gelatina eletrofiados.

Scaffold	Espessura (mm)	Densidade aparente (g/cm^3)	Porosidade (%)
A	$0,105 \pm 0,019$	$0,17 \pm 0,01$	$82,9 \pm 1,2$
B	$0,142 \pm 0,029$	$0,16 \pm 0,01$	$84,0 \pm 1,0$
C	$0,195 \pm 0,034$	$0,17 \pm 0,01$	$83,3 \pm 1,4$
D	$0,306 \pm 0,053$	$0,16 \pm 0,01$	$83,9 \pm 1,3$

Fonte: autoria própria.

4.3.3 Morfologia e diâmetro das fibras

A superfície dos *scaffolds* foi analisada pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura feita na parte externa das membranas eletrofiadas, isto é, no lado das membranas em que as fibras foram depositadas por último, onde alguma mudança na morfologia ocorrida devido ao tempo de eletrofiação poderia ser observada. A Figura 14 apresenta as morfologias dos *scaffolds* de diferentes espessuras com seus respectivos histogramas de distribuição do tamanho das fibras. Os diâmetros das fibras, medidos com o software Image J, e seus desvios padrão são mostrados na Tabela 4.

Analisando-se as micrografias, é possível observar que o menor tempo de eletrofiação (Figura 14a) produziu fibras com diâmetros maiores comparados aos outros *scaffolds* ($p < 0,05$) e a distribuição de tamanho também é consideravelmente mais ampla, o que significa que na primeira hora do processo, as condições não são exatamente constantes, uma vez que a distribuição do diâmetro das fibras diminuiu depois das sucessivas horas, como observado nos outros histogramas. As fibras dos conjuntos A (Figura 14a, 1 hora) e B (Figura 14b, 1,5 hora) apresentaram-se sem *beads* e com superfícies lisas, no entanto, a amostra B apresentou fibras com diâmetros menores (318 ± 123 nm) quando comparados com a amostra A (474 ± 238 nm). O diâmetro médio permaneceu entre 300 nm e 350 nm até três horas de eletrofiação, com a maior quantidade de fibras com diâmetro na faixa de 200 nm e 300 nm, como observado nos histogramas, indicando que se atingiram condições bastante estáveis após a primeira hora de processo, apesar dos valores reportados serem significativamente diferentes ($p < 0,05$), o que pode ser explicado por variações sutis causadas pelas condições ambientais, uma vez que a temperatura e a umidade relativa do ar não foram rigorosamente controladas, e à presença de fibras já depositadas no coletor. Essa camada de fibras depositadas, por apresentar condutividade elétrica diferente, pode ter interferido na tensão aplicada, mesmo que minimamente, alterando a quantidade de solução no jato, gerando fibras de diâmetros menores, que mantiveram sua espessura para as membranas mais espessas, pois, após a primeira camada depositada, o fator mais relevante seria a condutividade elétrica do polímero, independentemente de sua espessura.

Figura 14 – Microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* de diferentes espessuras eletrofiados com (a) 1 h, (b) 1,5 h, (c) 2 h e (d) 3 h, magnificação de 10000x.

Fonte: autoria própria.

Tabela 4 – Diâmetro médio das fibras obtidas por eletrofiação.

<u>Scaffold</u>	Diâmetro das Fibras (nm)
A	474 ± 238
B	318 ± 123
C	341 ± 152
D	310 ± 127

Fonte: autoria própria.

Ainda, tempos maiores de eletrofiação (Figura 14c e d, 2 e 3 horas) interferiram na formação das fibras, resultando em fibras irregulares com alguns *beads*, descontinuidade do diâmetro ao longo de sua extensão e regiões fundidas, principalmente nas intersecções das fibras. Essas irregularidades podem ser explicadas pelo longo tempo de exposição dos polímeros ao ácido acético, que pode causar hidrólise, à diminuição da solubilidade dos polímeros no interior da seringa, uma vez que a solução não é mantida sob agitação, o que diminui sua fluidez, à possível perda de solvente no decorrer do processo, que interfere diretamente na concentração da solução, além da interferência causada pelo solvente que chega à membrana com a deposição de novas fibras, criando as regiões de fusão e com aspecto derretido. Outro fator que pode ter interferido na morfologia dos *scaffolds* são as condições ambientais, dentre as quais, a umidade relativa do ar e a temperatura, como já citado (SILL, VON RECUM, 2008; CIPRITIA et al., 2011). Todos esses fatores são mais facilmente detectados nas membranas de maior espessura, uma vez que ficam expostas a essas condições por mais tempo devido à maior duração do processo de eletrofiação.

4.3.4 Resistência mecânica

O ensaio de resistência mecânica de *scaffolds* para aplicações biomédicas é essencial para assegurar que os mesmos vão resistir às forças submetidas durante sua manipulação, por exemplo, durante uma operação cirúrgica, e às forças relacionadas às atividades fisiológicas e de crescimento do novo tecido (CIPITRIA et al., 2011). Para a realização dos testes, inicialmente, foi estabelecida a taxa de afastamento das garras em 5 mm/min (GOMES et al., 2014). Os módulos de elasticidade e as tensões de ruptura obtidas para cada conjunto de membranas

foram normalizados considerando-se a densidade aparente de cada espessura (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores normalizados de módulo de elasticidade e tensão de ruptura na carga máxima das membranas eletrofiadas.

Scaffold	Módulo de Elasticidade (MPa)	Tensão de Ruptura (MPa)
A	80,8 ± 21,3	26,7 ± 8,5
B	80,2 ± 18,1	32,5 ± 2,4
C	55,2 ± 14,7	28,0 ± 6,5
D	70,1 ± 10,4	31,3 ± 6,9

Fonte: autoria própria.

Os módulos de elasticidade dos *scaffolds* A e B permaneceram constantes ($p > 0,05$), o que pode ser explicado pela similaridade de espessura de ambos. No entanto, os valores diminuem para os *scaffolds* de maior espessura, revelando que as irregularidades nas fibras, observadas nas imagens de MEV, têm um papel importante na resistência mecânica. As tensões de ruptura, embora significativamente diferentes em alguns casos ($p < 0,05$), oscilam dentro de uma mesma faixa, indicando que a carga suportada por unidade de área é mantida. Assim, os *scaffolds* devem suportar maiores cargas mecânicas simplesmente aumentando suas espessuras. Além disso, durante e depois de cada ensaio, foi possível observar que as amostras mais espessas eram compostas por algumas camadas de nanofibras aglomeradas, ao invés de compor um único bloco (Figura 15), e que essas camadas sofriam fratura em tempos distintos, como observado na Figura 16, o que significa que mesmo quando uma camada é rompida, as outras ainda sustentam o *scaffold*, preservando suas funções. Essa aglomeração das nanofibras depositadas em blocos pode ter ocorrido devido à variação da solução polimérica no decorrer do processo, conforme analisado no MEV, interferindo nos valores dos resultados e contribuindo para o aumento dos desvios padrão. Apesar dessa variação, os valores de resistência mecânica das membranas de PCL/gelatina são sempre intermediários aos valores de resistência mecânica das membranas de PCL puro e gelatina pura, sendo menores comparados às de PCL puro, e maiores comparados às de gelatina pura, que são reportadas como sendo rígidas e frágeis (GHASEMI-MOBARAKEH et al., 2008; LEE et al., 2008)

Figura 15 – Microscopia óptica (40x) do corte transversal de uma amostra do conjunto D.

Fonte: autoria própria.

Figura 16 – Curvas representativas (deslocadas para facilitar a visualização) de Tensão x Deformação para um mesmo conjunto de amostras (D). Triângulo na curva indica o primeiro ponto de fratura, seguido por fratura(s) subsequente(s).

Fonte: autoria própria.

4.3.5 Molhabilidade por água

A molhabilidade é avaliada pelo ângulo de contato de uma gota de água com a superfície do material a ser analisado, e indica a qualidade, a rugosidade e a hidrofobicidade/hidrofiliabilidade dessa superfície (RYAN; PODUSKA, 2008; XIU et al., 2008). A precisão desse método é considerada como $\pm 3^\circ$, devido às condições experimentais, não-reprodutibilidade do operador e à diferença de ângulo de contato entre os diferentes lados da gota, quando a superfície é heterogênea (STALDER et al., 2006). Ângulos de contato menores que 90° indicam que o sólido é molhado pelo líquido, associado a superfícies hidrofílicas, e ângulos maiores que 90° indicam a repulsão entre a superfície sólida e o líquido, associado a superfícies hidrofóbicas.

Zero grau e 180° indicam a completa molhabilidade e a completa não-molhabilidade, respectivamente (NJOBUNWU; OBOHO; GUMUS, 2007; RYAN; PODUSKA, 2008). Em *scaffolds* para a utilização em engenharia tecidual, é desejável um ângulo de contato menor que 90°, que representa uma superfície parcial ou completamente hidrofílica, promovendo melhor adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013).

Os valores de ângulo de contato de cada conjunto de *scaffolds* de diferente espessura foram medidos a partir da imagem de uma gota de 10 µL de água destilada depositada sobre membranas de diferentes espessuras e sobre a superfície da fita dupla-face utilizada na preparação das amostras (Figura 17). Os valores médios de ângulo de contato obtidos para os conjuntos de diferentes espessuras são apresentados na Tabela 6.

Figura 17 – Gota de água depositada sobre a superfície das membranas eletrofiadas por (a) 1 h, (b) 1,5 h, (c) 2 h, (d) 3 h e (e) da fita dupla-face, após 10 segundos da deposição da gota.

Fonte: autoria própria.

Tabela 6 – Ângulo de contato das membranas eletrofiadas.

Scaffold	Ângulo de Contato (°)
A	38,1 ± 6,7
B	41,1 ± 3,8
C	42,5 ± 3,5
D	31,1 ± 8,9
Dupla-face	72,96 ± 1,0

Fonte: autoria própria.

Os ângulos medidos para as membranas de PCL/gelatina (utilizados no cálculo das médias) variaram entre 12° e 50°, o que era esperado, uma vez que os valores de ângulo de contato do PCL e da gelatina puros são conhecidos como sendo maior que 90° e menor que 10°, respectivamente (KU; PARK, 2010; XUE et al., 2014), confirmando a combinação das propriedades de molhabilidade de ambos. Os elevados valores de desvio padrão, maiores que os $\pm 3^\circ$ indicados por Stalder et al. (2006), são decorrentes da grande variação nos valores de ângulo obtidos para uma mesma membrana, explicado pela imiscibilidade dos dois polímeros, cujas dimensões de cada fase, hidrofílica e hidrofóbica, bem como a sua distribuição sobre a superfície aparente da membrana, influenciam no ângulo de contato.

Os valores médios de ângulo de contato indicaram que os *scaffolds* A, B e C (com espessuras variando de $0,105 \pm 0,019$ mm a $0,195 \pm 0,034$ mm) apresentam a mesma molhabilidade, uma vez que seus ângulos de contato não são significativamente diferentes ($p > 0,05$), no entanto, o *scaffold* mais espesso (D, com $0,306 \pm 0,053$ mm de espessura) apresentou um ângulo de contato menor ($p < 0,05$), ou seja, houve um aumento da hidrofiliidade desta membrana. Isso deve ter ocorrido devido ao efeito de capilaridade, que, apesar de mantida a porosidade, foi magnificado pelo aumento do volume de vazios. Este fator foi combinado à sobreposição de maior número de domínios de gelatina por unidade de área à medida que a espessura aumentou, lembrando que as soluções utilizadas para eletrofiar todos os *scaffolds* tinham as mesmas concentrações de polímero e solvente, e a proporção relativa de PCL/gelatina foi mantida constante (2:1, respectivamente). Estes resultados mostram que a espessura pode interferir na molhabilidade dos *scaffolds*.

Um último ensaio foi realizado com a fita dupla-face (Figura 17e) utilizada no preparo das amostras, apontando que a fita não contribuiu com a hidrofilicidade das membranas (Figura 17a - Figura 17d), uma vez que apresentou ângulo de contato maior que o delas. No entanto, não é possível afirmar o oposto, ou seja, se houve interferência em relação à hidrofobicidade. Apesar disso, essa variável não altera o fato dos ângulos de contato apresentados pelas membranas serem intermediários aos valores dos ângulos de contato para membranas de PCL e de gelatina puros, atendendo ao objetivo de aumentar a molhabilidade da membrana, em relação à de PCL puro, por meio da utilização da blenda desses dois polímeros.

4.3.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os *scaffolds* foram avaliados quanto à composição a partir da análise de grupos funcionais por FTIR. A Figura 18 apresenta os espectros característicos do PCL, da gelatina e da membrana de PCL/gelatina. As bandas características do PCL são encontradas nos comprimentos de onda em 2949 cm^{-1} , associada ao estiramento assimétrico de CH_2 , 2865 cm^{-1} , ao estiramento simétrico de CH_2 , 1727 cm^{-1} , ao estiramento de carbonila, 1293 cm^{-1} , ao estiramento $\text{C}-\text{O}$ e $\text{C}-\text{C}$, 1240 cm^{-1} , ao estiramento $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ assimétrico, e 1170 cm^{-1} , ao estiramento $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ simétrico. Já as bandas características da gelatina estão em 3300 cm^{-1} , devido à sobreposição das bandas $\text{N}-\text{H}$ e $\text{O}-\text{H}$, 1629 cm^{-1} e 1538 cm^{-1} , referentes às bandas de amida I e amida II, respectivamente, e da amida III em 1238 cm^{-1} , causada pela vibração dos estiramentos $\text{C}-\text{N}$, da flexão do $\text{N}-\text{H}$ da amida no plano e da oscilação do CH_2 (CHIONO et al., 2008; GAUTAM et al., 2013).

Nota-se que o espectro do *scaffold* de PCL/gelatina se resume na junção dos espectros de cada polímero puro, apenas com uma variação na intensidade e um pequeno deslocamento de algumas bandas, sendo que as bandas que correspondem ao PCL apresentam aparentemente o dobro da intensidade das bandas de gelatina, condizente com a proporção de 2:1 desses dois polímeros na membrana. Em relação ao deslocamento das bandas, Gautam et al. (2013) atribui a possíveis interações, como pontes de hidrogênio entre o grupo éster do PCL e o grupo amina da gelatina na superfície dos *scaffolds*.

Figura 18 – Espectros de FTIR de PCL, gelatina e do *scaffold* de PCL/gelatina.

Fonte: autoria própria.

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

4.4.1 Teste de esterilidade

Antes de iniciar os ensaios com células, foram realizados testes de esterilidade dos *scaffolds*, sem tratamento de esterilização e tratado por radiação ultravioleta (UV), a fim de averiguar a existência de contaminação nas membranas e analisar a necessidade de esterilização por outro método validado antes dos ensaios biológicos.

Após 24h de incubação das amostras de cada espessura em meio de cultura, verificou-se a presença ou ausência de contaminação por meio da microscopia óptica. Nos *scaffolds* não-estéreis, detectou-se a presença de microrganismos em todas as amostras. Os fragmentos foram, então, descartados e o meio de cultura referente a cada um foi adicionado, separadamente, ao meio de cultura BacT/ALERT® para a realização de testes microbiológicos. Nos *scaffolds* tratados por radiação UV, não foi detectada a presença de bactérias após 24h de incubação, houve suspeita apenas na amostra de maior espessura. Assim, essas amostras permaneceram incubadas por até 48h, quando foi constatada a presença de microrganismos em todas elas. O tempo maior para essa constatação pode ser explicado com base no limite de alcance da radiação ultravioleta, além de o seu efeito ser variável de acordo com o tempo de exposição, sendo considerada apenas como um método de desinfecção (REDIGHIERI et al., 2016). O meio de cultura que ficou em contato com cada fragmento tratado por UV também foi inoculado no meio de cultura BacT/ALERT®, cada um separadamente.

Após o tempo de incubação no kit comercial, todas as amostras apresentaram resultados negativos para a presença de microrganismos, apesar de terem sido constatadas contaminações anteriormente no microscópio óptico. Esses resultados podem indicar que o número de microrganismos não foi suficiente para sua multiplicação, mesmo em condições propícias, e que os *scaffolds* não são favoráveis ao crescimento de bactérias, sugerindo que a fabricação dos mesmos em ambiente asséptico controlado seria o suficiente para evitar a contaminação, uma vez que o processo de fabricação dos *scaffolds* envolve a utilização de solventes orgânicos, que impedem a proliferação de microrganismos naturalmente e, portanto, eliminando

a necessidade de esterilização posterior. Outra hipótese possível seria a existência de alguma irregularidade com o lote utilizado do kit comercial BacT/ALERT®, o que teria gerado um falso-negativo como resultado.

4.4.2 Esterilização dos *scaffolds*

Para iniciar os testes com células, optou-se pelo tratamento dos *scaffolds* por um método de esterilização aprovado para a utilização de dispositivos médicos, uma vez que as membranas não foram produzidas em ambiente asséptico controlado e os resultados de esterilidade das membranas sem tratamento ou tratadas por radiação UV apresentaram resultados duvidosos em relação à contaminação. A escolha da técnica a ser utilizada baseou-se em fatores gerais, como disponibilidade e facilidade de acesso ao método, e fatores específicos, como a composição dos *scaffolds* por polímeros termossensíveis (o PCL apresenta ponto de fusão perto 60 °C, enquanto o da gelatina não passa de 40 °C). Dessa forma, optou-se pelo tratamento por Sterrad®, uma técnica de esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio a baixa temperatura (ciclo abaixo de 50 °C), apesar de a gelatina ser sensível a essa temperatura. Outra técnica avaliada foi a esterilização por óxido de etileno (EtO), por também operar em baixa temperatura (entre 37 °C e 63 °C), no entanto, ela foi descartada pois o gás utilizado é altamente inflamável, tóxico e carcinogênico, além do processo ser mais lento, com duração do ciclo de 3 a até mais de 10 horas, enquanto o ciclo do Sterrad® leva de 30 a 75 minutos (COUTO, 2012; REDIGHIERI et al., 2016).

Após a esterilização das membranas por peróxido de hidrogênio, algumas das amostras apresentaram modificações perceptíveis a olho nu (Figura 19), observada também na Figura 9, enquanto outras mantiveram o mesmo aspecto inicial. Novas amostras foram preparadas e esterilizadas pelo mesmo método para análise da morfologia por MEV e FTIR, no entanto, estas não apresentaram modificações visíveis. Pelas micrografias (Figura 20), foi possível observar que as membranas continuaram com suas fibras características. No entanto, todas passaram a apresentar pontos de fusão na intersecção entre as fibras e algumas fibras com aspecto derretido.

Nas análises de FTIR (Figura 21), nenhuma banda diferente foi notada nos espectros das amostras quando comparadas antes e após a esterilização e quando comparadas entre as diferentes espessuras, neste caso apenas a intensidade das bandas sofreu um pequeno aumento, condizente com o aumento de espessura das membranas, e, portanto, sugerindo que esse método de esterilização não altera a composição dos *scaffolds* de PCL/gelatina, embora não se possa afirmar com veemência, uma vez que tal método apresenta baixa sensibilidade e detecta modificações apenas na superfície da amostra. Apesar disso, outros estudos também sugeriram que a esterilização por plasma não modifica a composição da membrana. Dai et al. (2016) estudou *scaffolds* de PCL puro e relatou que a esterilização pelo mesmo método citado não causou anormalidades na superfície das membranas analisadas por MEV, porém não especificou sua aparência após a esterilização. Assim, é possível afirmar que as alterações observadas neste estudo foram causadas devido à gelatina, lembrando que sua temperatura de fusão é mais baixa que a temperatura utilizada pelo método de Sterrad®. Dai et al. (2016) também enfatizou a melhora da molhabilidade das membranas tratadas por este método, promovendo a adesão celular e a diferenciação osteogênica.

Figura 19 – Amostras antes e depois de serem esterilizadas por Sterrad®.

Figura 20 – Micrografia dos *scaffolds* de PCL/gelatina após esterilização por plasma de peróxido de hidrogênio, magnificação de 10000x.

Fonte: autoria própria

Figura 21 – Espectros de FTIR do *scaffold* de PCL/gelatina sem tratamento de esterilização e tratado com peróxido de hidrogênio, para as quatro diferentes espessuras.

Fonte: autoria própria.

4.4.3 Teste de citotoxicidade

O teste de citotoxicidade por citometria de fluxo foi realizado para detectar a presença de eventuais agentes tóxicos provenientes tanto dos reagentes utilizados no processo de fabricação dos *scaffolds*, quanto de substâncias resultantes do processo de esterilização, a partir da quantificação de células por coloração. Dois tipos de marcadores são utilizados nessa técnica, o FITC Anexina V, que marca células em apoptose, e o iodeto de propídeo, que distingue as células não-viáveis (mortas ou danificadas), cujas membranas são permeáveis ao iodeto. A combinação de respostas (positivo e negativo) para esses marcadores fornece os resultados, dispostos em um gráfico com quatro quadrantes (superior esquerdo – SE, superior direito – SD, inferior esquerdo – IE, inferior direito – ID), conforme ilustrado na Figura 22.

Figura 22 – Interpretação do gráfico de citometria de fluxo.

Fonte: autoria própria.

Figura 23 – Análise por citometria de fluxo dos controles e das amostras.

Fonte: autoria própria.

Tabela 7 – Porcentagem de eventos contabilizados em cada quadrante pela citometria de fluxo.

Quadrante	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	CT (%)
SE	0,9	1,24	1,38	1,19	6,64
SD	9,07	10,58	12,93	12,61	14,36
IE	85,84	84,07	82,77	81,71	75,97
ID	4,19	4,11	2,92	4,49	3,03

Fonte: autoria própria.

Na Figura 23 estão representados os resultados da citometria de fluxo dos dois controles (CT) – expostos ao meio de cultura padrão (que não esteve em contato com os *scaffolds*), sendo um para autofluorescência, que regula o equipamento, e outro para o controle negativo – e dos testes realizados com os meios de cultura expostos aos *scaffolds* esterilizados (A, B, C e D). A Tabela 7 expõe as porcentagens referentes a cada evento (cada um associado a um quadrante) em relação ao total de eventos contabilizados para cada uma das amostras analisadas. Os resultados obtidos são muito próximos, indicando que as diferentes espessuras dos *scaffolds* praticamente não interferiram nos resultados de apoptose e necrose celular, além disso, os valores de apoptose precoce (ID) não ultrapassam a taxa dos 15 %, considerada normal para qualquer cultura celular. Analisando as porcentagens de células viáveis (IE), observa-se um leve declínio com o aumento da espessura, que deve estar associado à quantidade maior de polímero utilizado, especificamente, o PCL. Apesar disso, essas porcentagens são elevadas em comparação com o controle negativo, o que pode estar associado à gelatina presente nos *scaffolds*, como já citado por Chong et al. (2007), Cipritia et al. (2011) e Gautam, Dinda e Mishra (2012), e que possivelmente acabou solubilizando após o período de 7 dias em que as membranas ficaram em contato com o meio de cultura.

4.4.4 Teste de adesão celular

O teste de adesão celular foi realizado para verificar a afinidade das CTMs com cada *scaffold* de diferentes espessuras esterilizados pelo método de Sterrad®. As células foram semeadas diretamente sobre as amostras, e o meio de cultura foi adicionado somente depois do tempo necessário para a adesão inicial das células, a fim de evitar a dispersão das mesmas para fora das amostras. As amostras foram dispostas em uma placa de 24 poços para cultura em suspensão, a fim de diminuir a

probabilidade das células migrarem do *scaffold* para o fundo dos poços. Os testes foram realizados para 24h e 48h, quando as amostras foram tratadas com tripsina-EDTA e contadas a partir de uma alíquota corada com azul de Tripán.

Tabela 8 – Quantidade de células no teste de adesão celular após 24h e 48h.

Tempo	Quantidade de Células ($\times 10^5$)				
	A	B	C	D	CT
24h	7,43	7,47	6,5	5,23	9,67
48h	6,73	6,43	5,03	4,57	9,23

Fonte: autoria própria.

Figura 24 – Análise do teste de adesão celular.

Fonte: autoria própria.

Através da Tabela 8 e da Figura 24 nota-se uma redução do número de células com o aumento da espessura dos *scaffolds*, em ambos os tempos, contrariando a expectativa. Essa redução da quantidade de células em relação à espessura, apesar de ser significativa apenas quando comparadas as amostras A e D no tempo de 48h ($p < 0,05$), pode estar relacionada à morfologia das membranas, que apresentaram regiões de fusão entre as fibras, principalmente para as membranas de maior espessura (C e D), diminuindo o espaçamento entre os poros e dificultando a infiltração das células e sua migração pelo interior dos *scaffolds*. Outra possibilidade é a de que a morfologia não interferiu, permitindo a adesão e infiltração celular, e, nesse caso, apesar do tratamento com tripsina-EDTA para soltar as células para o procedimento de contagem, estas estavam impossibilitadas de deixar o interior dos *scaffolds* devido ao impedimento causado por sua rede fibrosa, pois o PCL não se degrada com a ação da tripsina, de forma que o número de células contado não corresponde à quantidade real de células em cada amostra.

Além disso, ao comparar cada amostra em 24h com sua correspondente em 48h, a quantidade de células contadas também diminuiu. Apesar de não haver diferença significativa ($p > 0,05$), essa redução pode estar relacionada à dissolução da gelatina com o tempo, que fez com que os poros das membranas aumentassem, permitindo uma maior penetração das células no interior dos *scaffolds*, conforme relatado por Phipps et al. (2012), e, portanto, diminuindo a quantidade de células livres para contagem. Na comparação de cada membrana com os controles, em 24h, apenas os *scaffolds* C e D apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), enquanto em 48h, todos tiveram valores diferentes do controle ($p < 0,05$), reforçando a hipótese de infiltração celular. Apesar disso, esse método não se mostrou suficiente para a contagem de células em *scaffolds* de nanofibras, sendo necessárias outras técnicas complementares, como a microscopia confocal, para analisar o interior de cada membrana, ou técnicas de quantificação por absorção a partir da metabolização de reagentes pelas células, que, então, são quantificados por espectrofotometria.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Scaffolds com diferentes espessuras podem ser facilmente obtidos variando-se apenas o tempo do processo de eletrofiação. A espessura de membranas de PCL/gelatina eletrofiadas sob as mesmas condições aumentou proporcionalmente ao tempo de eletrofiação, mantendo a densidade aparente e a porosidade constantes. Depois da primeira hora de eletrofiação, o diâmetro das fibras permaneceu estável independentemente da espessura do *scaffold*. Análises de MEV mostraram que as fibras formadas são lisas e com menos imperfeições até uma hora e meia de processo, depois disso ficaram mais susceptíveis a irregularidades e regiões de fusão entre as fibras. Os ensaios mecânicos revelaram que aumentando a espessura das membranas, o módulo de elasticidade diminuiu, enquanto a tensão de ruptura aumentou. Além disso, a molhabilidade foi maior para a membrana mais espessa, embora todas tenham apresentado valores intermediários quando comparados aos polímeros puros, devido à combinação das características do PCL e da gelatina.

A esterilização por peróxido de hidrogênio não causou alteração na composição química, no entanto, modificou a aparência de algumas amostras. Os ensaios de esterilidade das membranas não estéreis e tratadas com UV, apesar de não categóricos, sugeriram que a fabricação dos *scaffolds* em ambiente asséptico controlado poderia ser suficiente para mantê-los desinfectados, eliminando a etapa de esterilização e evitando possíveis modificações das membranas. A citotoxicidade por citometria de fluxo indicou a melhora dos resultados de viabilidade celular quando comparadas ao controle, provavelmente pela presença de gelatina, porém os ensaios de adesão celular não foram conclusivos, exigindo uma análise complementar ou a avaliação por outra técnica. O método de contagem de células manual com o descolamento das células utilizando-se a enzima tripsina não se mostrou eficaz para *scaffolds* de nanofibras.

Assim, é possível afirmar uma melhora das propriedades físico-químicas dos *scaffolds* devido ao aumento da espessura, de modo que estudos referentes a aplicações deveriam dar mais atenção a essa característica. No entanto, outros ensaios biológicos devem ser realizados para confirmar o comportamento de adesão

e proliferação celular, além da interferência causada pela espessura na diferenciação das células-tronco.

5.1 TRABALHOS FUTUROS

A fim de verificar o comportamento das células em relação aos *scaffolds* de diferentes espessuras, novos ensaios de adesão celular devem ser realizados pelo método de absorção outrora citado, além da realização do ensaio por tempos maiores para verificação da proliferação celular. No caso de baixa adesão celular, podem ser estudadas maneiras de aumentar os poros dos *scaffolds*, para averiguar se o espaçamento entre as fibras impediu a infiltração das células. Exemplos presentes na literatura citam o aumento do tamanho das fibras ou a eletrofiação de um polímero de sacrifício solúvel em água em conjunto com os outros polímeros, que permita sua fácil remoção e consequente aumento dos poros. Testes de diferenciação celular também devem ser realizados para estudar a influência das diferentes espessuras no favorecimento de algum tipo de diferenciação das células-tronco mesenquimais. Outros estudos com foco no processo de eletrofiação também podem ser realizados, incluindo a análise do substrato utilizado para a coleta das fibras eletrofiadas, e a produção dos *scaffolds* em ambiente asséptico controlado, visando eliminar a necessidade de esterilização.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S.; WENDORFF, J. H.; GREINER, A. **Progress in the Field of Electrospinning for Tissue Engineering Applications**. *Advanced Materials*, v. 21, n. 32–33, p. 3343–3351, 4 set. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/adma.200803092>>.
- AZIMI, B. *et al.* **Poly (lactide -co- glycolide) Fiber : An Overview**. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, v. 9, n. 3, p. 74–90, 2014. Disponível em: <<http://www.jeffjournal.org>>.
- BEACHLEY, V.; WEN, X. **Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length**. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, n. 3, p. 663–668, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.037>>.
- BRAGHIROLI, D. I.; STEFFENS, D.; PRANKE, P. **Electrospinning for regenerative medicine: A review of the main topics**. *Drug Discovery Today*, v. 19, n. 6, p. 743–753, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.024>>.
- CHANDRASEKARAN, A. R. *et al.* **Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration**. *Biomedical materials (Bristol, England)*, v. 6, n. 1, p. 15001, 2011.
- CHEN, G.; USHIDA, T.; TATEISHI, T. **Scaffold design for tissue engineering**. *Macromolecular Bioscience*, v. 2, n. 2, p. 67–77, 2002.
- CHIONO, V. *et al.* **Enzymatically-modified melt-extruded guides for peripheral nerve repair**. *Engineering in Life Sciences*, v. 8, n. 3, p. 226–237, 2008.
- CHONG, E. J. *et al.* **Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution**. *Acta Biomaterialia*, v. 3, n. 3 SPEC. ISS., p. 321–330, 2007.
- CIPITRIA, A. *et al.* **Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds—a review**. *Journal of Materials Chemistry*, v. 93, n. ii, p. 1539–1550, 2011. Disponível em:

<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0jm04502k%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20014288%5Cnhttp://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/290602/>.

COUTO, M. **Diversidade nas técnicas de esterilização.** *Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (Online)*, COUTO, Marcelo. Diversidade nas técnicas de esterilização. *Revista da Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação (Online)*, v. 53, p. 10-17, 2012., v. 53, p. 10–17, 2012.

DAI, Y. *et al.* **Optimization of sterilization methods for electrospun poly(epsilon-caprolactone) to enhance pre-osteoblast cell behaviors for guided bone regeneration.** *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 31, n. 2, p. 152–166, 2015.

EMPRESA BRASIL DE COMUNICAÇÃO. Agência Brasil. **Brasil responde por quase 8% dos transplantes feitos em todo o mundo.** 2012. Disponível em: <<http://memoria.ebc.com.br/agenciabrasil/noticia/2012-02-08/brasil-responde-por-quase-8-dos-transplantes-feitos-em-todo-mundo>>. Acesso em: 10 jul 2015.

ERENCIA, M. *et al.* **Electrospinning of gelatin fibers using solutions with low acetic acid concentration: Effect of solvent composition on both diameter of electrospun fibers and cytotoxicity.** *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132, n. 25, p. 1–11, 2015.

FERREIRA, J. L. *et al.* **Electrospinning polycaprolactone dissolved in glacial acetic acid: Fiber production, nonwoven characterization, and In Vitro evaluation.** *Journal of Applied Polymer Science*, v. 41068, p. 37–39, 2014.

GAUTAM, S. *et al.* **Fabrication and characterization of PCL/gelatin/chitosan ternary nanofibrous composite scaffold for tissue engineering applications.** *Journal of Materials Science*, v. 49, n. 3, p. 1076–1089, 2014.

GAUTAM, S.; DINDA, A. K.; MISHRA, N. C. **Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method.** *Materials Science and Engineering C*, v. 33, n. 3, p. 1228–1235, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.12.015>>.

GHASEMI-MOBARAKEH, L. *et al.* **Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering.** *Biomaterials*, v. 29, n. 34, p. 4532–4539, 2008.

GOMES, S. R. *et al.* **In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study.** *Materials Science and Engineering C*, v. 46, p. 348–358, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.10.051>>.

HEYDARKHAN-HAGVALL, S. *et al.* **Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering.** *Biomaterials*, v. 29, n. 19, p. 2907–2914, 2008.

HINDERER, S. *et al.* **Engineering of fibrillar decorin matrices for a tissue-engineered trachea.** *Biomaterials*, v. 33, n. 21, p. 5259–5266, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.03.075>>.

HOLLISTER, S. J. **Porous scaffold design for tissue engineering.** *Nature materials*, v. 4, n. July, p. 518–24, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16003400>>.

HU, X. *et al.* **Electrospinning of polymeric nanofibers for drug delivery applications.** *Journal of Controlled Release*, v. 185, n. 1, p. 12–21, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.018>>.

KARP, J. M.; DALTON, P. D.; SHOICHET, M. S. **Scaffolds for tissue engineering.** *MRS bulletin*, v. 28, n. 04, p. 301-306, 2003.

KIM, Y. H. *et al.* **The inclusion of fetal bovine serum in gelatin/PCL electrospun scaffolds reduces short-term osmotic stress in HEK 293 cells caused by scaffold components.** *Journal of Applied Polymer Science*, v. 129, n. 6, p. 3273–3281, 2013.

KU, S. H.; PARK, C. B. **Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering.** *Biomaterials*, v. 31, n. 36, p. 9431–9437, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.071>>.

LEE, J. *et al.* **The effect of gelatin incorporation into electrospun poly(l-lactide-co- ϵ -caprolactone) fibers on mechanical properties and cytocompatibility.** *Biomaterials*, v. 29, n. 12, p. 1872–1879, 2008.

LEE, Y. S.; ARINZEH, T. L. **Electrospun nanofibrous materials for neural tissue engineering.** *Polymers*, v. 3, n. 1, p. 413–426, 2011.

MENG, Z. X. *et al.* **Fabrication and characterization of three-dimensional nanofiber membrane of PCL-MWCNTs by electrospinning.** *Materials Science and Engineering C*, v. 30, n. 7, p. 1014–1021, 2010.

NEREM, R. M.; SAMBANIS, A. **Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes.** *Tissue Engineering*, v. 1, n. 1, p. 3–13, 1995. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.1995.1.3>>.

MCGOWAN INSTITUTE FOR REGENERATIVE MEDICINE. **What is Tissue Enginnering?** 2010. Disponível em: <<http://www.regenerativemedicine.net/Tissue.html>>. Acesso em: 10 jul 2015.

NJOBUEWU, D. O.; OBOHO, E. O.; GUMUS, R. H. **Determination of contact angle from contact area of liquid droplet spreading on solid substrate.** *Leonardo Electronic Journal of Practices and Technologies*, v. 6, n. 10, p. 29–38, 2007. Disponível em: <http://193.226.7.140/lejpt/A10/029_038.pdf>.

NUNES, H. C. tc 2. 2017. Altura: 2322 pixels. Largura: 4128 pixels. 51 Kb. Formato JPG.

O'BRIEN, F. J. **Biomaterials & scaffolds for tissue engineering.** *Materials Today*, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)>.

ORÉFICE, R. L.; DE MAGALHÃES PEREIRA, M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações.** *Grupo Gen-Guanabara Koogan*, 2000.

PHIPPS, M. C. *et al.* **Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration.** *Biomaterials*, v. 33, n. 2, p. 524–534, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.080>>.

POK, S. W.; WALLACE, K. N.; MADIHALLY, S. V. **In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media.** *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 3, p. 1061–1068, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.002>>.

PORTAL DA SAÚDE. **Transplantes-SNT---Ano-2016.** 2017. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/Transplantes-SNT---Ano-2016.pdf>>. Acesso em: 01 ago 2017.

RAJZER, I. *et al.* **Conductive PANI patterns on electrospun PCL/gelatin scaffolds modified with bioactive particles for bone tissue engineering.** *Materials Letters*, v. 138, p. 60–63, 2015.

RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine.** *Biomaterials Science*. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2004. Disponível em: <<http://www.efn.uncor.edu/escuelas/biomedica/Plandeestudios/materias completas/biomateriales/Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medici.pdf>>.

REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. **Crosslinking biopolymers for biomedical applications.** *Trends in Biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 362–369, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>>.

REDIGUIERI, C. F. *et al.* **Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering.** *European Polymer Journal*, v. 82, p. 181–195, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016>>.

RYAN, B. J.; PODUSKA, K. M. **Roughness effects on contact angle measurements.** *American Journal of Physics*, v. 76, n. 11, p. 1074, 2008. Disponível em: <<http://scitation.aip.org/content/aapt/journal/ajp/76/11/10.1119/1.2952446>>.

SARKAR, K. *et al.* **Electrospinning to Forcespinning™.** *Materials Today*, v. 13, n. 11, p. 12–14, 2010.

SIGMA-ALDRICH. **Polycaprolactone.** 2017. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440744?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 25 ago 2017.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. **Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering**. *Biomaterials*, v. 29, n. 13, p. 1989–2006, 2008.

STALDER, A. F. *et al.* **A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles**. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 286, n. 1–3, p. 92–103, 2006.

VIOLA, J.; LAL, B.; GRAD, O.. **The emergence of tissue engineering as a research field**. *National Science Foundation*, Arlington, VA, 2003.

WILLERTH, S. M.; SAKIYAMA-ELBERT, S. E. **Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery**. 2008.

XIU, Y. *et al.* **Relationship between work of adhesion and contact angle hysteresis on superhydrophobic surfaces**. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 112, n. 30, p. 11403–11407, 2008.

XUE, J. *et al.* **Fabrication and evaluation of electrospun PCL–gelatin micro-/nanofiber membranes for anti-infective GTR implants**. *J. Mater. Chem. B*, v. 2, n. 39, p. 6867–6877, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TB00737A>>.

ZHANG, Y. *et al.* **Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds**. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, v. 72, n. 1, p. 156–165, 2005.

ZHOU, Z. *et al.* **Bilayer porous scaffold based on poly-(ϵ -caprolactone) nanofibrous membrane and gelatin sponge for favoring cell proliferation**. *Applied Surface Science*, v. 258, n. 5, p. 1670–1676, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.09.120>>.

APÊNDICE – Ensaios biológicos preliminares *in vitro*

Ensaios preliminares foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Bionanomanufatura do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT). Duas linhagens celulares foram utilizadas: fibroblastos de camundongo (L929) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), mantidas com meio de cultura DMEM suplementado com 10 % SFB. Somente uma espessura de *scaffold* foi utilizada, referente à amostra C, preparada com 2 horas de eletrofiação. Antes dos experimentos com células, cada lado das membranas foi submetido à radiação UV por 30 minutos. Toda a manipulação posterior ao tratamento por UV sucedeu em ambiente estéril.

Inicialmente, estudaram-se diferentes maneiras de semear as células nos *scaffolds*, considerando que as membranas apresentam baixa densidade e flutuam em meio líquido. Muitos estudos realizam essa etapa como descrito no teste de adesão celular deste trabalho, enquanto outros utilizam suportes comerciais que fixam os *scaffolds*, mantendo-os submersos, porém, estes suportes apresentam custo elevado. Estes ensaios tiveram como intuito encontrar uma alternativa para estes suportes que permitisse uma fácil manipulação no preparo das amostras, além de ser eficaz e de baixo custo. Foram testadas culturas celulares com (i) meio de cultura líquido com cilindro de aço inox para manter a membrana submersa no meio líquido, representado na Figura 25, e (ii) meio de cultura com ágar, a partir da mistura de ágar em diferentes concentrações (0,2 %, 0,6 % e 0,9 %) para criar meios mais viscosos e de densidade superior à dos *scaffolds* utilizados. Amostras de 1 cm² foram preparadas e alocadas em placas de Petri.

i. meio de cultura líquido com cilindro de aço inox

Para esse teste, o cilindro de aço inox foi depositado ao centro da membrana, já na placa de cultura celular. Então, foram adicionados 100 µL de células em suspensão (1×10^5 células/mL de meio de cultura) no interior do cilindro, que foi preenchido com meio de cultura logo em seguida. Mais meio foi adicionado à placa de cultura utilizada, de modo a manter as amostras totalmente cobertas.

ii. meio de cultura com ágar

O meio de cultura com ágar foi preparado a quente (aproximadamente 50 °C), devido às propriedades de gelificação do ágar. Foram preparadas 3 soluções de porcentagens diferentes, citadas anteriormente. O inóculo (células em suspensão) foi adicionado nessa etapa de preparo do ágar, em quantidades calculadas para que a concentração final do meio de cultura com ágar e células se mantivesse em 1×10^5 células/mL. A suspensão final, de meio de cultura com ágar e inóculo, foi adicionada diretamente nas placas sobre as membranas.

Figura 25 – Representação da metodologia utilizando-se cilindro de aço inox.

Fonte: autoria própria.

Após um período de incubação de 24 horas, as amostras foram retiradas do meio de cultura e lavadas com PBS. Então, as células foram fixadas com formaldeído 3,7 % – procedimento utilizado para inviabilizar e imobilizar as células – e marcadas com iodeto de propídeo, sendo preparadas lâminas para análise em microscopia confocal de fluorescência. Os pontos em vermelho nas imagens indicam as células fluorecendo devido ao marcador. Nota-se que, ao utilizar o meio líquido (Figura 26), a presença de células é mais substancial do que nos testes com meio viscoso (Figura 27). Mesmo no lado inferior da membrana cultivada com meio líquido (Figura 26b), é possível visualizar as marcações do iodeto de propídeo, que, apesar de estarem fracas, indicam a proximidade das células nas camadas inferiores. Para os ensaios com meio de cultura com ágar, quanto mais viscoso o meio (maior concentração), menor a quantidade de células observadas em geral, e, principalmente, no lado inferior da membrana. Lembrando que em todos os ensaios as células foram semeadas na parte superior do *scaffold*, onde as imagens de

microscópio revelaram quantidades semelhantes, com exceção da cultura em meio aquoso, que apresentou um número elevado de células em ambos os lados da membrana.

Figura 26 – Microscopia confocal de fluorescência do (a) lado superior e do (b) lado inferior da membrana cultivada em meio de cultura líquido com cilindro de aço inox.

Fonte: autoria própria.

Figura 27 – Microscopia confocal de fluorescência das amostras cultivadas em meio de cultura com ágar em diferentes concentrações.

Fonte: autoria própria.

Esses resultados, apesar de não serem conclusivos, indicam que o meio de cultura tem forte influência na mobilidade das células sobre um substrato. O meio líquido

permite a livre circulação e migração das células, enquanto o meio viscoso funciona como um substrato a parte, principalmente ao se considerar as concentrações mais elevadas, de forma que as células têm um obstáculo a mais, precisando se deslocar pelo ágar antes de aderir à membrana. Além disso, deve-se considerar a disponibilidade do meio de cultura no interior do *scaffold*. Provavelmente, os meios mais viscosos dificultaram sua infiltração pelos *scaffolds*, diminuindo a troca de nutrientes no seu interior, não favorecendo a proliferação das células, por isso, nesses casos, as células são mais facilmente encontradas na superfície, onde o contato com o meio de cultura é direto. Para as membranas em que o meio permeia melhor em seu interior, são observadas mais células na parte inferior das amostras, considerando que as células tendem a se depositar mais ao fundo devido à gravidade.

Além disso, foi possível observar que, nas amostras em que foi utilizado o cilindro de aço inox, a maior concentração de células se encontrava principalmente na região onde o cilindro esteve em contato com a amostra durante o período de incubação. Esse fato sugere a ocorrência de algum tipo de interação das células com o cilindro, podendo ser desde o efeito do menisco, quando o inóculo é depositado em seu interior, fazendo com que as células se aglomerem nas bordas, até à possibilidade de afinidade das células com o material do cilindro, o que também explica a grande quantidade de células na superfície superior da membrana quando utilizado o meio líquido.

Assim, como o cilindro e o ágar aparentemente interferiram na adesão e proliferação celular nos *scaffolds*, optou-se por não utilizá-los, dando prosseguimento aos ensaios de adesão celular conforme descrito no item 3.4.4 deste trabalho.