

SCAFFOLD LAMINADO PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDO TRACHEAL: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FISIOMECÂNICAS

FULANO C. SILVA¹, AUTOR², AUTOR³, AUTOR⁴
(Times New Roman, 11, Centralizado, Máximo quatro autores)

¹ Doutorando em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, UNISO, Campus Cidade Universitária, Sorocaba, venancio_mt@hotmail.com

² Doutoranda em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, UNISO, Campus Cidade Universitária, Sorocaba, julianafsz@yahoo.com.br

³ Doutora em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, UNISO, Campus Cidade Universitária, Sorocaba, thaisfrancinel@hotmail.com

⁴ Docente permanente do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Sorocaba, UNISO, Campus Cidade Universitária, Sorocaba, marco.chaud@prof.uniso.br
Área de conhecimento (Tabela CNPq): 3.13.02.01-7 Biomateriais e Materiais Biocompatíveis

Apresentado no
4º Congresso de Pós-Graduação do IFSP
27 e 28 de novembro de 2019- Sorocaba-SP, Brasil

RESUMO: O estudo objetivou preparar *scaffold* (SCF) laminado composto por poli (L-co-D,L ácido láctico) (PLDLA), policaprolactona (PCL), polietilenoglicol 400 (PEG400) e colágeno (COL). O SCF foi obtido pelo método de evaporação de solvente. A caracterização da morfologia de superfície foi realizada por microscopia óptica (MO). A análise físico-química foi realizada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As propriedades fisiomecânicas foram avaliadas por ensaios de relaxação, resiliência, perfuração e resistência a tração. A análise morfológica mostrou que o SCF possui poros na estrutura de superfície. O FTIR mostrou que ocorreram interações químicas entre os componentes do SCF. Os resultados das propriedades fisiomecânicas do SCF para os ensaios de relaxação, resiliência, perfuração e resistência a tração foram $0,869 \pm 0,046$ (N), $1,108 \pm 0,013$ (N), $1,584 \pm 0,023$ (N) e $1,541 \pm 0,117$ (N), respectivamente. Os resultados obtidos indicam que o SCF laminado tem potencial para aplicação na engenharia de tecido traqueal.

PALAVRAS-CHAVE: Estenose traqueal; *scaffold*; poli (L-co-D,L ácido láctico); policaprolactona; colágeno; engenharia de tecido.

LAMINATED SCAFFOLD FOR APPLICATION IN TRACHEAL TISSUE ENGINEERING: PHYSICAL-CHEMICAL, MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF PHYSIOMECHANICAL PROPERTIES

ABSTRACT: The study aimed to prepare laminated scaffold (SCF) composed of poly (L-co-D,L lactic acid) (PLDLA), polycaprolactone (PCL), polyethylene glycol 400 (PEG400) and collagen (COL). The SCF was obtained by the solvent evaporation method. The surface morphology characterization was performed by optical microscopy (OM). Physico-chemical analysis was performed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Physiomechanical properties were evaluated by relaxation, resilience, perforation and tensile strength tests. Morphological analysis showed that SCF has pores in the surface structure. The FTIR showed that chemical interactions occurred between SCF components. The results of SCF physiomechanical properties for the relaxation, resilience, perforation and tensile strength tests were 0.869 ± 0.046 (N), 1.108 ± 0.013 (N), 1.584 ± 0.023 (N) and 1.541 ± 0.117 (N), respectively. The results obtained indicate that laminated SCF has potential for application in tracheal tissue engineering.

KEYWORDS: Tracheal stenosis; scaffold; poly (L-co-D,L lactic acid); polycaprolactone; collagen; tissue engineering.

INTRODUÇÃO

A estenose traqueal é uma patologia geralmente causada por fatores congênitos, traumas, inflamações e neoplasias malignas dentro da via aérea (JING et al., 2018). A causa mais comum corresponde a complicações após processo de intubação prolongado, o aumento deste procedimento por meio da intubação orotraqueal, nasotraqueal ou tubos de traqueostomia, tem ocasionado lesões significativas na região laringe-traqueia, com diversos graus e por vezes de difícil tratamento (AVELAR et al., 2011; FILHO; MACHADO; JANISZEWSKI, 2005).

A engenharia de tecido traqueal surge como tendência da medicina regenerativa, utilizando estruturas tridimensionais e porosas capazes de mimetizar a matriz extracelular (MEC), denominado *scaffolds* (SCF), favorecendo adesão e proliferação celular, subseqüentemente, formação do novo tecido *in vivo* ou *in vitro*. Este método é considerado uma alternativa potencial para tratamento de estenose traqueal (GILEVICH et al., 2018).

SCF fabricados com biomateriais tem temporariamente substituído a MEC, estes biomateriais podem ser de origem natural, alguns exemplos, como colágeno (COL), celulose, alginato, quitosana, fibroína de seda, ácido hialurônico são muito utilizados (BHAT; KUMAR, 2013). Os polímeros e copolímeros sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis também tem sido investigado, por exemplo, policaprolactona (PCL), polietilenoglicol (PEG), poliuretano, ácido láctico e seus copolímeros, com destaque ao poli (L-co-D,L ácido láctico) (PLDLA) (FERREIRA; MOUSAVI, 2018).

Assim, este estudo teve como objetivo preparar e avaliar propriedades físico-químicas, fisiomecânicas e morfológicas de SCF laminado composto de PLDLA-PCL/PEG400/COL como potencial para aplicação na regeneração de tecido cartilaginoso.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação de *scaffold* laminado PLDLA-PCL/PEG400/COL

O SCF foi preparado pelo método de evaporação de solvente. O PDLA e PCL foram solubilizados separadamente em diclorometano obtendo duas soluções à 8% (m/v) e vertidas (PLDLA-PCL proporção 67:33). Após solubilização destes polímeros foi adicionado o PEG400 e em seguida o COL (pó). As dispersões foram homogeneizadas por agitação magnética (Fisatom – Mod. 753A, São Paulo, Brasil) utilizando barra magnética revestida em teflon (5x15 mm). A dispersão polimérica PLDLA-PCL/PEG400/COL (1:2:2 m/m) foi transferida para um extensor com 19 m³, previamente calibrado para vazão de 0,25 mL.s⁻¹. A formulação foi estendida sobre uma placa de vidro, previamente desengordurada. A secagem foi realizada a temperatura de 23±2 °C, em ambiente ventilado, protegido de impurezas do ar. A secagem foi controlada por gravimetria.

Avaliação macroscópica

Os SCF foram avaliados de acordo com suas características macroscópicas em relação a integridade, homogeneidade, ausência de bolhas de ar e resistência a manipulação.

Processo de lixiviação

Após a secagem, o SCF foi recortado igualmente no formato quadrado com as seguintes dimensões 2 x 2 cm, com espessura 0,1 cm e dividido em dois grupos. Um dos grupos foi submetido a um processo de lixiviação do agente porogênico com água ultrapura (18,2 MΩ. cm⁻¹) sob agitação orbital (Incubadora com agitação orbital, TE-4200, TECNAL. Piracicaba, Brasil) durante 2 h (37±1 °C, agitação em 50 rpm). O outro grupo foi armazenado em recipiente hermeticamente fechado e utilizado como controle do processo de lixiviação e formação de poros.

Microscopia óptica (MO)

A análise da estrutura de superfície foi realizada por ensaio de MO (Microscópio óptico, Alpha phot-2-YS2. Nikon. Tóquio, Japão) com magnificação em 40x e 100x antes (tempo zero) e após lixiviação (2 h). A amostra foi disposta sobre lâmina de vidro para microscopia e as imagens foram capturadas utilizando câmera fotográfica com resolução de 5 megapixels.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

A análise de FTIR (Shimadzu, FTIR IRAffinity-1S. Kyoto, Japão) no modo de refletância total atenuada (ATR) ou por pastilha de brometo de potássio (KBr) foi utilizada para caracterizar os grupos

químicos correspondentes de cada componente das formulações e do SCF. Os espectros foram obtidos em transmitância, realizado na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} com varredura de 128 scans.

Propriedades fisiomecânicas

As propriedades mecânicas (relaxação, resiliência, perfuração e resistência a tração) foram avaliadas utilizando analisador de textura (Stable Micro Systems – TA-XT Plus, Surrey, Reino Unido), no modo de compressão ou tensão, previamente calibrado com carga de 5Kg. Para medida de relaxação e resiliência a velocidade de deslocamento foi de 0,5 mm.s^{-1} e para medida de perfuração e resistência a tração a velocidade de deslocamento foi de 2 mm.s^{-1} . E para ambos, força de 0,049 N. Os resultados foram registrados pelo software Exponent Texture Analysys. (n=3)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O SCF laminado após evaporação do solvente foi removido da placa de vidro e macroscopicamente apresentou aspectos positivos, atendendo aos requisitos de integridade, homogeneidade, ausência de bolhas de ar e resistência a manipulação (Figura 1A). Na análise da morfologia de superfície do SCF por MO em tempo zero (Figura 1B-C), foi possível verificar uma superfície regular, indicando uma dispersão homogênea dos grânulos do COL como agente porogênico. Estas micrografias confirmam os resultados observados macroscopicamente. Na Figura 1D-E são apresentadas imagens micrográficas após processo de lixiviação por 2 h, foram observados a formação de poros heterogêneos, constatando a remoção dos grânulos da superfície para o meio. No entanto, parte dos grânulos do COL permanecem, devido a afinidade pelos componentes poliméricos, não ocorrendo apenas uma mistura física, como demonstrado nos espectros de FTIR (Figura 2A), este resultado indica uma remoção controlada dos grânulos.

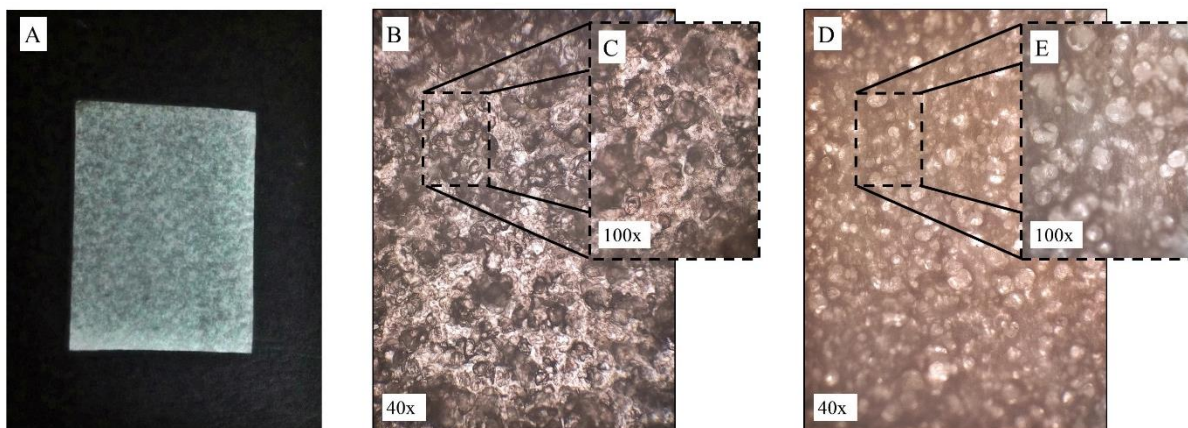


FIGURA 1. A- aspecto macroscópico do *scaffold*; B e C- micrografias do *scaffold* em tempo zero (magnificação em 40 e 100x); D e E- micrografias do *scaffold* após 2h de lixiviação (magnificação em 40 e 100x).

As características morfológicas da superfície de um material ou dispositivo biomimético é um fator crucial, influenciando de maneira direta o comportamento das células, auxiliando em sua adesão, permitindo assim o crescimento e a distribuição celular de forma organizada em toda a área de contato (BERNER et al., 2014). Já a porosidade e interconectividade dos poros são importantes para a difusão fisiológica de nutrientes, gases e para remoção dos resíduos metabólicos resultantes da atividade celular (RODRIGUEZ-VAZQUEZ et al., 2015).

Os espectros de FTIR dos componentes e do SCF são apresentados na Figura 2A. Na estrutura química do PLDLA foram observados picos de transmitância característicos na região entre 2995-2931 cm^{-1} correspondente a deformação axial simétrica (CH_2) e assimétrica (CH_3), respectivamente. O pico em 1751 cm^{-1} é típico de poliésteres, o qual corresponde a deformação axial do grupo da carboxila ($\text{C}=\text{O}$). Em 1448 cm^{-1} e 1365 cm^{-1} são observados picos referentes a deformação angular das ligações CH no grupamento CH_3 . Já os picos em 1269 cm^{-1} e 1087 cm^{-1} são referentes ao alongamento de $=\text{C}-\text{O}$. Em 1184 cm^{-1} atribuído a ligação C-C e por fim o pico em 736 cm^{-1} relacionado ao grupo CH (LEAL et al., 2019; AMARAL et al., 2019).

A análise espectral do PCL apresentou picos característicos em 1047 cm^{-1} e 1240 cm^{-1} referente ao alongamento C-O-C, já o pico de alongamento C-O foi observado em 1168 cm^{-1} . Os picos localizados em 1365 cm^{-1} e 1419 cm^{-1} são atribuídas as vibrações características de flexão de $-\text{CH}_2$. Em 1724 cm^{-1} correspondente ao alongamento C=O e por fim foram observados os modos de alongamento do grupo $-\text{CH}_2$ assimétrico e simétrico nos picos em 2866 cm^{-1} e 2945 cm^{-1} , respectivamente (SHARIF et al., 2019).

No espectro do PEG 400 podem ser observados picos de transmitância característicos na região 1103 cm^{-1} referente ao estiramento harmônico do grupamento C-O-C, em 2868 cm^{-1} atribuído ao alongamento de grupo CH_2 , já o pico em 3452 cm^{-1} correspondente ao grupamento hidroxila terminal da cadeia do PEG associada por ligações de hidrogênio (PEREIRA et al., 2016).

O COL é uma proteína constituída basicamente pelos aminoácidos prolina, hidróxiprolina e glicina. O espectro desta proteína apresentou picos de transmitância característicos em 1242 cm^{-1} típico da amida III, consistindo em componentes de alongamento C-N e deformação N-H. O pico em 1537 cm^{-1} típico da amida II, atribuído as vibrações no plano da ligação N-H e ao estiramento C-N. Em 1648 cm^{-1} correspondente a absorção típica da amida I, referente ao alongamento da carbonila (C=O) e o pico em 3302 cm^{-1} correspondente ao grupamento hidroxila (OH) (ALVES, et al., 2018; SLIMANE; SADOK, 2018).

De acordo com o resultado apresentado por FTIR, o SCF laminado obtido com PLDLA-PCL/PEG400/COL apresenta mudanças no espectro quando comparado com os polímeros puros, evidenciando leves deslocamentos, redução na intensidade e ausência de picos característicos. Estes resultados confirmam interações químicas entre os componentes da formulação, evidenciando ligações entre o grupamento funcional OH presentes no PEG400 e no COL com o grupamento C=O do PLDLA-PCL, ocasionado a reorganização da estrutura química espacial. Esta associação de polímeros facilita a moldagem e a formação de poros *in situ*.

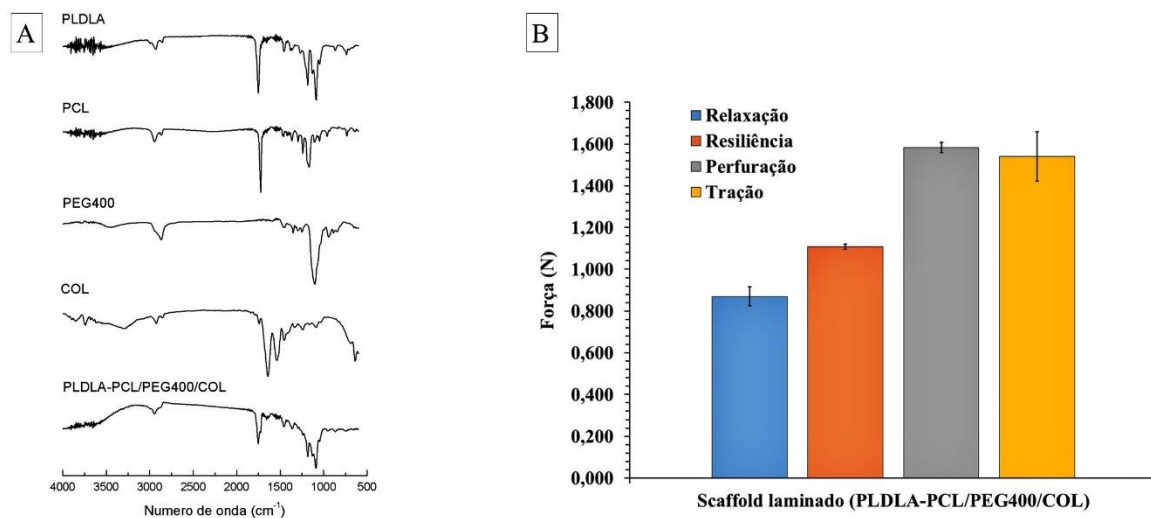


FIGURA 2. A- FTIR dos componentes PLDLA, PCL, PEG400, COL e SFC PLDLA-PCL/PEG400/COL. B- Propriedades fisiomecânicas do SFC PLDLA-PCL/PEG400/COL ($M \pm DP$). ($n=3$)

As propriedades fisiomecânicas são determinadas por meio de uma força de deformação ou na aplicação de uma tensão sobre o material. Estes ensaios fornecem informações determinantes para entender as características mecânicas limite do material estudado (CASSU; FELISBERTI, 2005). As propriedades do SCF foram avaliadas por ensaio de relaxação, resiliência, perfuração e resistência a tração (Figura 2B). No ensaio de relaxação foi obtido um valor de $0,869 \pm 0,046$ (N), esta propriedade é diretamente relacionada com a conformação das cadeias poliméricas do SCF. Para resiliência foi obtido o valor de $1,108 \pm 0,013$ (N), essa propriedade está relacionada com a capacidade do material passar por deformação externa sem causar alteração em sua condição inicial. No ensaio de perfuração é avaliado a força necessária na distância máxima de compressão ou a força máxima alcançada antes de uma fatura, neste ensaio o valor obtido foi de $1,584 \pm 0,023$ (N).

Enquanto que a resistência a tração é a medida da força ou tensão necessária para alongar o *scaffold* até alcançar o ponto de ruptura ou antes do resultado permanente da deformação, neste ensaio o valor obtido foi de $1,541 \pm 0,117$ (N) (ALVES et al., 2018).

CONCLUSÕES

O SFC laminado composto por PLDLA-PCL/PEG400/COL foi preparado com sucesso pelo método de evaporação de solvente. As análises realizadas por MO mostrou que o *scaffold* possui porosidade superficial. A análise dos resultados de FTIR confirmaram a ocorrência de interações químicas entre os polímeros. Dos ensaios de propriedades fisiomecânicas avaliados, a maior resistência foi confirmada respectivamente, para perfuração, tração, resiliência e relaxação. Os resultados físico-químicos, morfológicos e fisiomecânicos indicam que o SCF laminado tem potencial para aplicação na engenharia de tecido traqueal.

AGRADECIMENTOS

A Universidade de Sorocaba/SP (UNISO) pelo aporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALVES, T. F. R. et al. Dense Lamellar Scaffold as Biomimetic Materials for Reverse Engineering of Myocardial Tissue: Preparation, Characterization and Physiomechanical Properties. **Journal of Material Sciences Engineering**, v.7, n.494, p1-9, 2018.
- AMARAL, V.A. et al. The effect of efflux bomb and the transmural potential difference in the permeation of azidothymidine across the small intestine of the rat. **Science Publishing Group-SPG BioMed**, v.1, n.2, p.1-17, 2019.
- AVELAR, L.M.G. et al. Estenose traqueal – Complicação tardia após intubação e traqueostomia. **Rev. Med. Minas Gerais**, v.21, n.4, p.124-126, 2011.
- BERNER, A. et al. Effects of scaffold architecture on cranial bone healing. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 4, p. 506–513, 2014.
- BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. **Biomatter**, v.3, n.3, p.1-12, 2013.
- CASSU, S.N.; FELISBERTI, M.I. Dynamic mechanical behavior and relaxations in polymers and polymeric blends. **Química Nova**, v.28, n.2, p.255-263, 2005.
- FERREIRA, M.S.V.; MOUSAVI, S. H. Nanofiber technology in the *ex vivo* expansion of cord blood-derived hematopoietic stem cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v.14, n.5, p. 1707-1718, 2018.
- FILHO, A.A.C.; MACHADO, F.S.; JANISZEWSKI, M. Estenose de traqueia após intubação prolongada. **RBTI-Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v.17, n.1, p.40-43, 2005.
- GILEVICH, I.V. et al. *In Vivo* Experimental Study of Biological Compatibility of Tissue Engineered Tracheal Construct in Laboratory Primates. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v.164, n.6, p.770–774, 2018.
- JING, H. et al. Restoring tracheal defects in a rabbit model with tissue engineered patches based on TGF- β 3-encapsulating electrospun poly (L-lactic acid-co- ϵ -caprolactone)/collagen scaffolds. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v.46, n.sup1, p.985-995, 2018.
- LEAL, C.V. et al. Characterization and *in vitro* evaluation of electrospun aligned-fiber membranes of poly (L-co-D, L-lactic acid). **Journal of Applied Polymer Science**, v.136, n.24, p.1-9, 2019.
- PEREIRA, E. D. et al. Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. **Polímeros**, v.26, n.2, p.137-143, 2016.
- RODRIGUEZ-VAZQUEZ, M. et al. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. **BioMed research international**, v.2015, p.1-15, 2015.
- SHARIF, F. et al. Bioresorbable antibacterial PCL-PLA-nHA composite membranes for oral and maxillofacial defects. **Polymer Composites**, v.40, n.4, p.1564-1575, 2019.
- SLIMANE, E. BEN; SADOK, S. Collagen from cartilaginous fish by-products for a potential application in bioactive film composite. **Marine Drugs**, v.16, n.6, p.1–19, 2018.