

**Aplicação das nanofibras na construção de Scaffolds para engenharia tecidual**

**Maria Helena Ambrosio Zanin**

*Palestra on-line, apresentada no Seminário Scaffold INSPEER, São Paulo.*

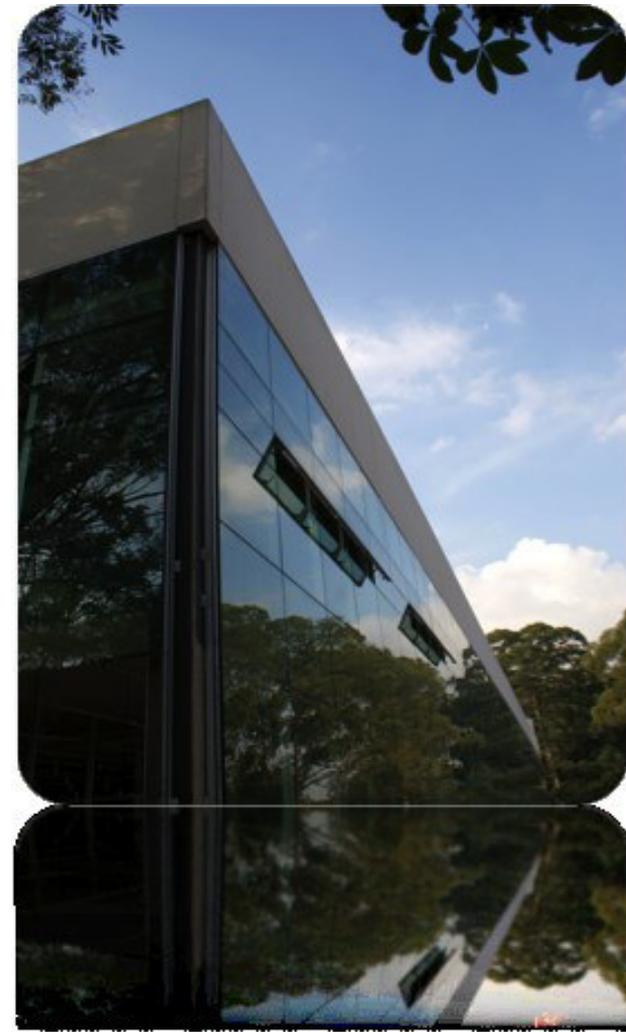
A série “Comunicação Técnica” compreende trabalhos elaborados por técnicos do IPT, apresentados em eventos, publicados em revistas especializadas ou quando seu conteúdo apresentar relevância pública.



# APLICAÇÃO DAS NANOFIBRAS NA CONSTRUÇÃO DE *SCAFFOLDS* PARA ENGENHARIA TECIDUAL

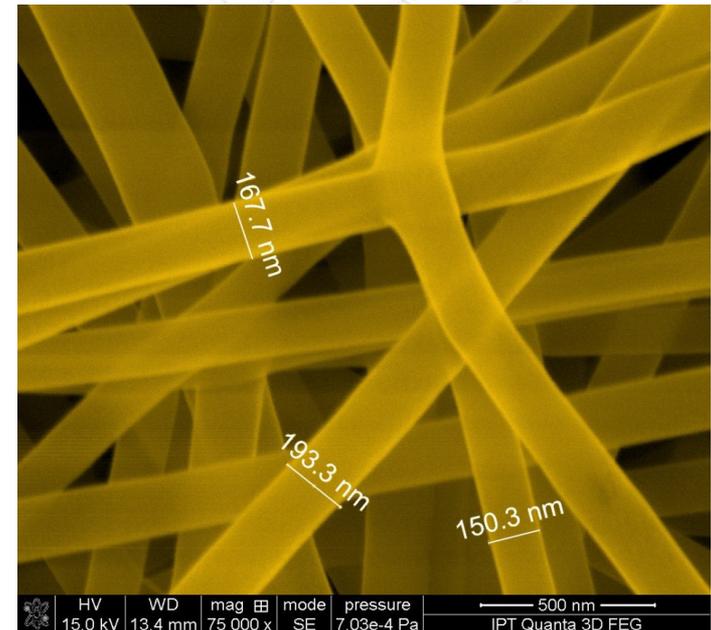
Dra. Maria Helena Ambrosio Zanin  
mhzanin@ipt.br

**18/05/2021**



# Agenda

- ***Apresentação do IPT***
- ***Engenharia Tecidual***
- ***Medicina regenerativa***
- ***Biomateriais utilizados na construção de scaffolds***
- ***Modelos de Scaffold***
- ***Produção de nanofibras***
- ***Processo de eletrofiação***
- ***Caracterização física de nanofibras***
- ***Caracterização biológica de nanofibras***
- ***Exemplos da arquitetura de nanofibras***
- ***Estudos de caso de nanofibra no IPT***
- ***Desafios na construção do Scaffold***
- ***Perguntas***



# Apresentação do IPT

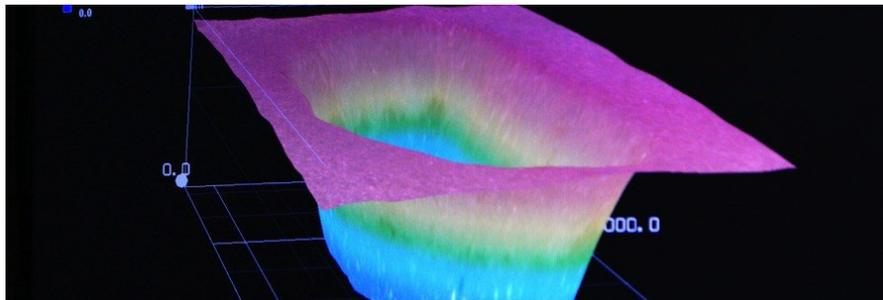
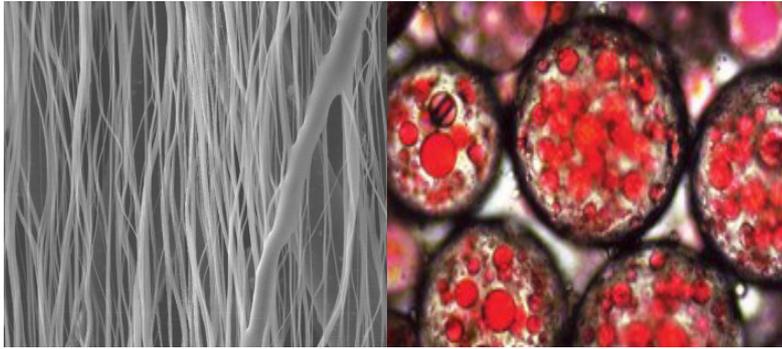
## O IPT

- Uma das primeiras instituições de P&D&I aplicados no Brasil
- Sociedade Anônima, cujo sócio controlador é o Governo do Estado de São Paulo, por meio da Secretaria da Fazenda



# Apresentação do IPT

Núcleo de Bionanofabricação



**LPP - Lab. Processos Químicos e Tecnologia de Partículas**

Nanotecnologia e processos químicos avançados

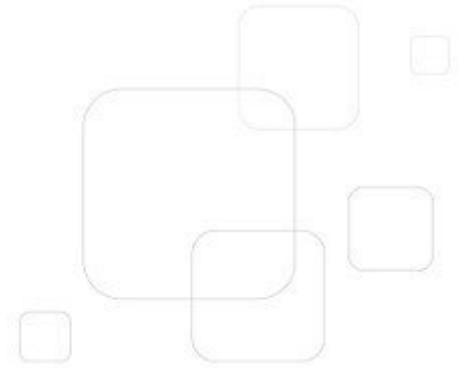
**LBI - Laboratório de Biotecnologia Industrial**

Desenvolvimento e caracterização de soluções biotecnológicas

**LMI - Lab. de Micromanufatura**

Miniaturização e intensificação de Processos e desenvolvimento de sensores e atuadores.

# Nanotechnology in Medicine - Application



- **Drug delivery**
- ***In vitro* diagnostics**
- ***In vivo* imaging**
- ***Therapy* techniques**
- **Biomaterials**
- **Tissue engineering**

# Engenharia Tecidual

**Campo interdisciplinar que aplica princípios da engenharia, biologia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam manter, restaurar ou melhorar a função de **órgãos e tecidos****

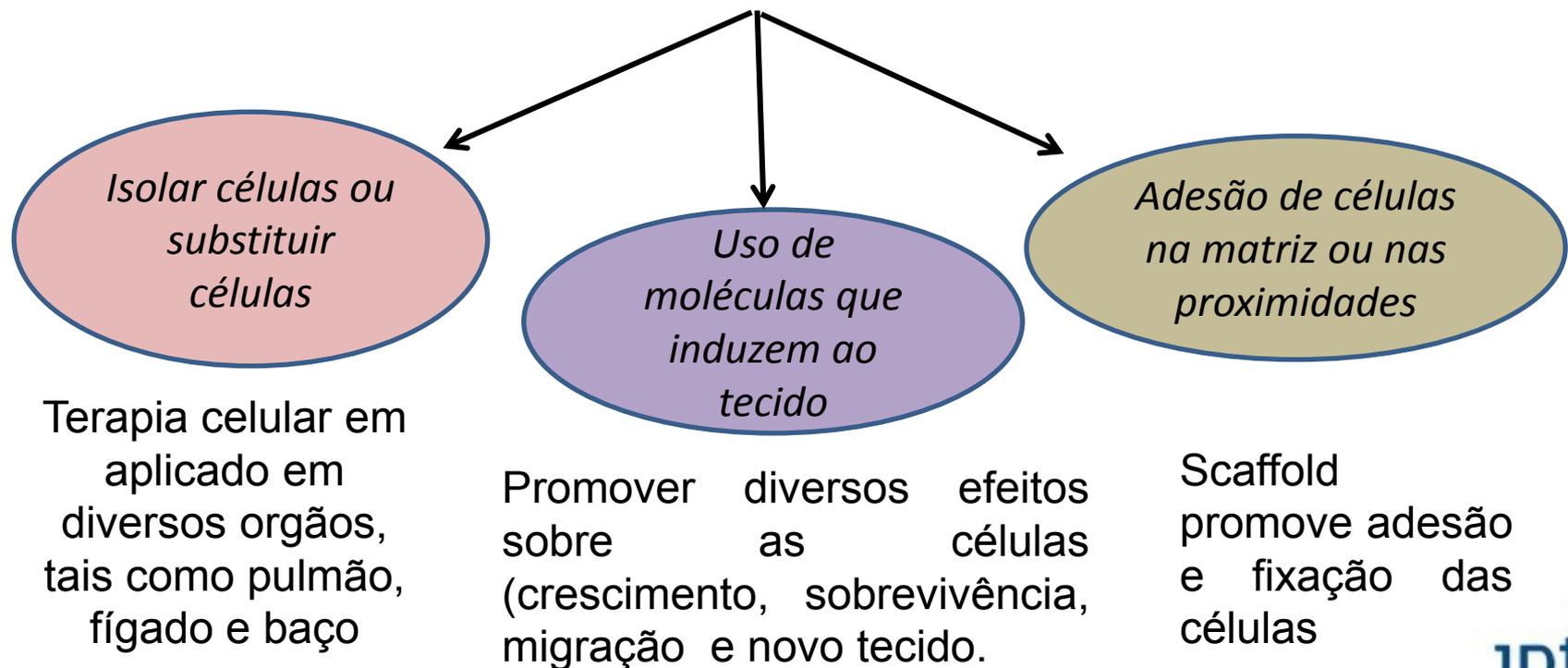
LANGER e VACANTI 1993.

# Engenharia Tecidual

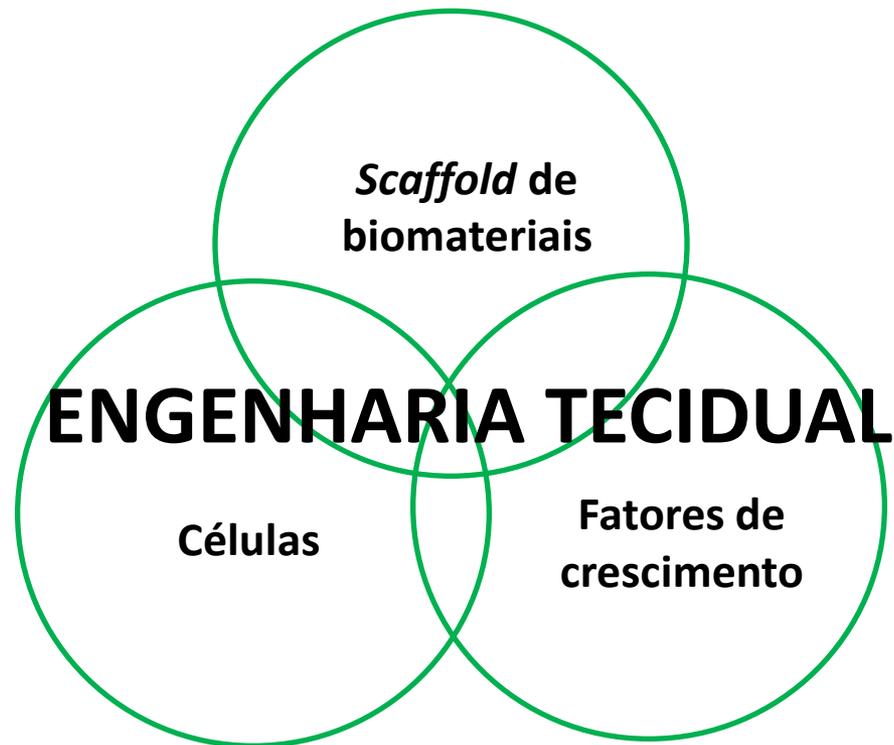
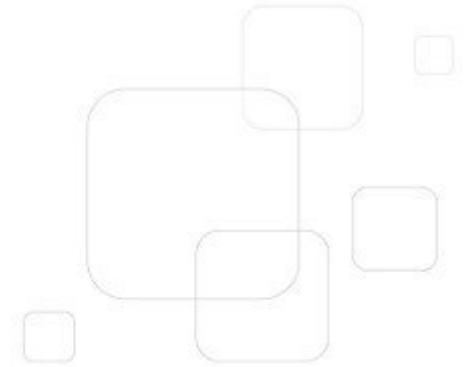
- **Década de 80:** O termo era associado a próteses e dispositivos de manipulação cirúrgica de tecidos;
- **Em 1991:** Primeiro registro do termo como ele é atualmente reconhecido, citado no artigo “Tissue Engineering”;
- **Em 1994:** Tissue Engineering Society International (TESI) e Tissue Engineering and Regenerative International Society (TERMIS).

# Engenharia Tecidual

## Estratégias (Langer e Vacanti, 1993)



# Engenharia Tecidual



# Engenharia Tecidual

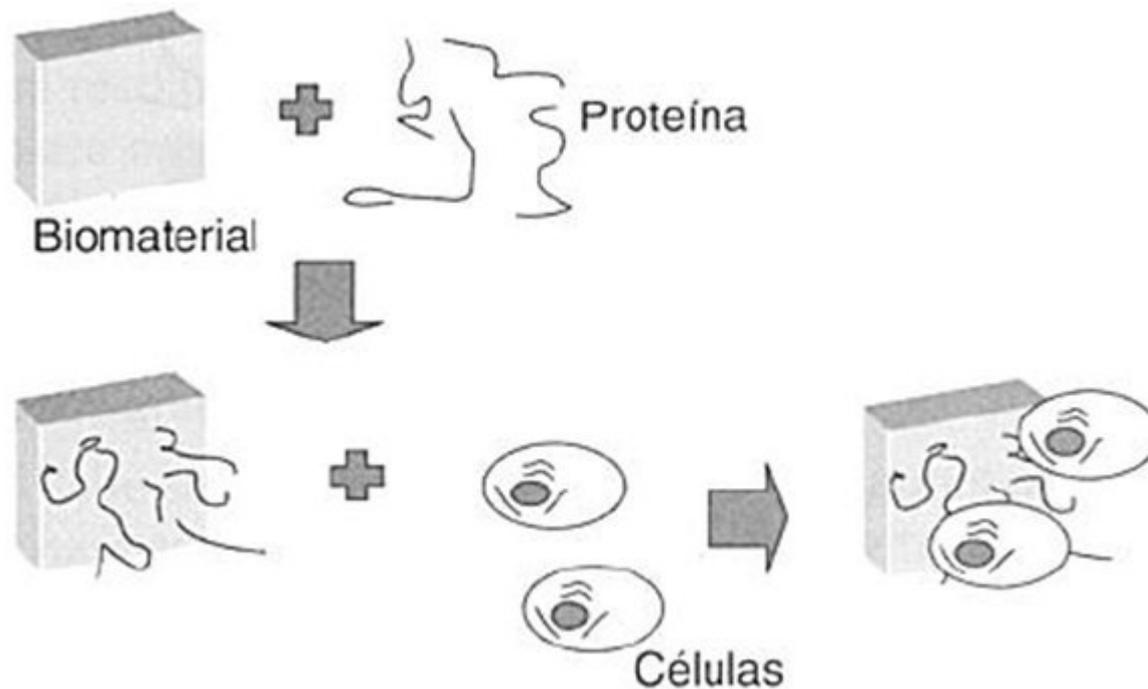
“Criar construções de tecidos que possam ser usadas para restaurar, reparar ou substituir tecidos danificados”

- ✓ Alternativa para transplante;
- ✓ Melhoria da qualidade de vida.

# Engenharia Tecidual

## Regeneração Tecidual

Adsorção da biomolécula -> interação celular -> reação tissular e integração

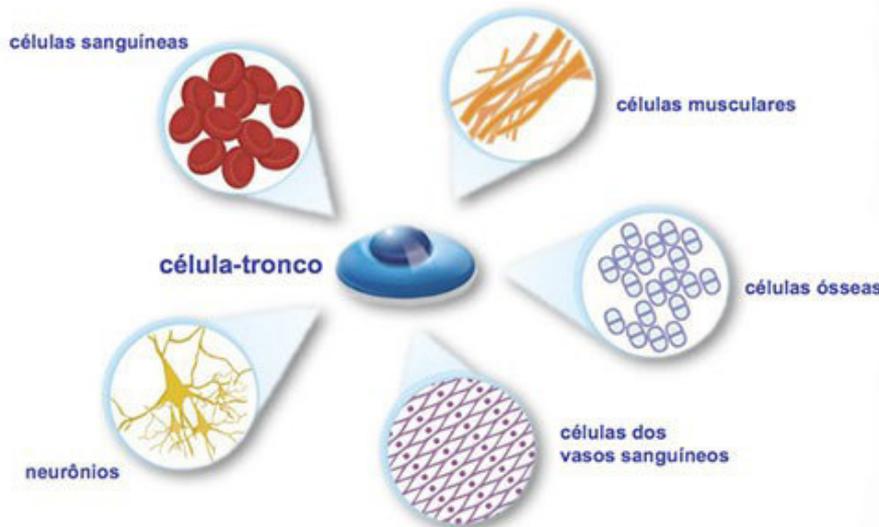
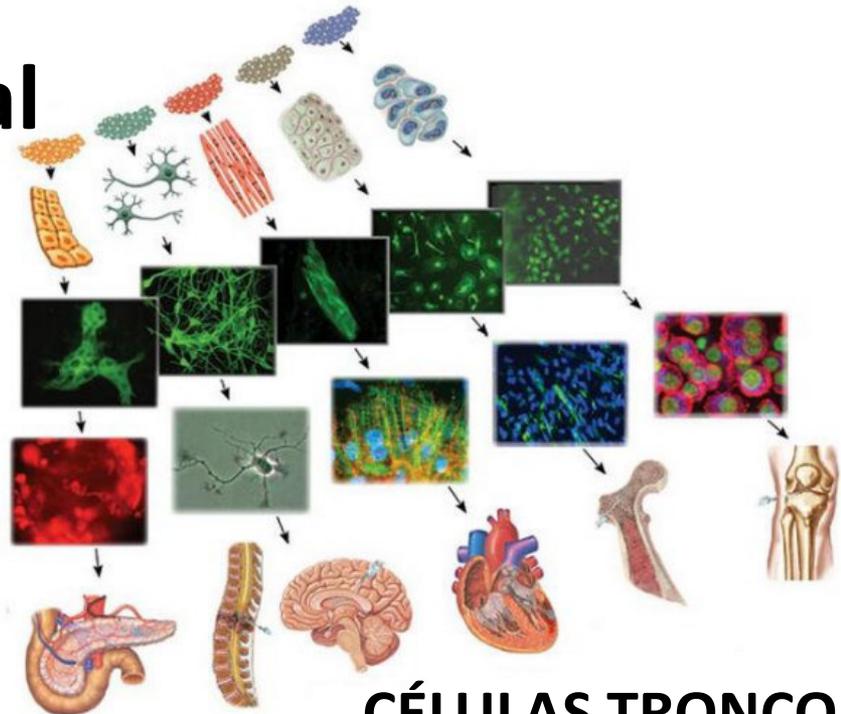


\* Bioreator ou *in situ*

# Engenharia Tecidual

## Células

- Diferentes características;
- Origem autógena, alogênica e xenogênica;

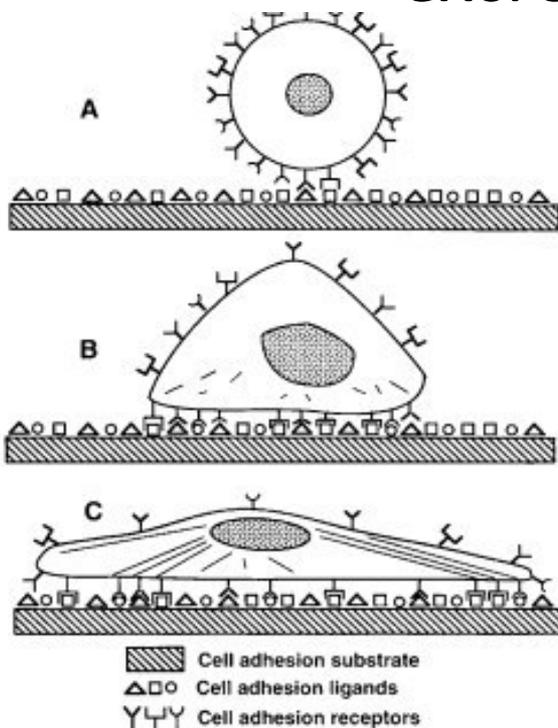


- Progenitoras;
- Autorenovadoras;
- Embrionárias: se diferenciam em outras células;
- Adulta: mantém e repara tecido em que reside;

# Engenharia Tecidual

Fator de crescimento

São proteínas que se ligam a receptores celulares induzindo a proliferação /diferenciação celular ou a excreção e produção de tecido



PDGF	Fator de crescimento derivado da plaqueta	Mitógeno, quimiotático, promove a angiogênese, ativa o TGF $\beta$
TGF	Fator de crescimento transformador - $\alpha$ . $\epsilon$ . $\beta$	Promove a formação da matriz extracelular, síntese de colágeno e elastina, proliferação e diferenciação celular
FGF	Fator de crescimento fibroblástico	Promove a proliferação de fibroblastos, célula endotelial e estimula a angiogênese. Importante nas lesões musculares e tendinosas
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina	Proliferação e diferenciação celular. Importante na formação óssea
EGF	Fator de crescimento epitelial	Mitógeno, promove a reepitelização e síntese de colágeno. Importante no tratamento de feridas, tratamento de pele e lesão na córnea
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular	Angiogênico (vascularização), diferenciação celular e síntese de colágeno.

Recrutamento celular realizado por proteínas aderidas na superfície do material

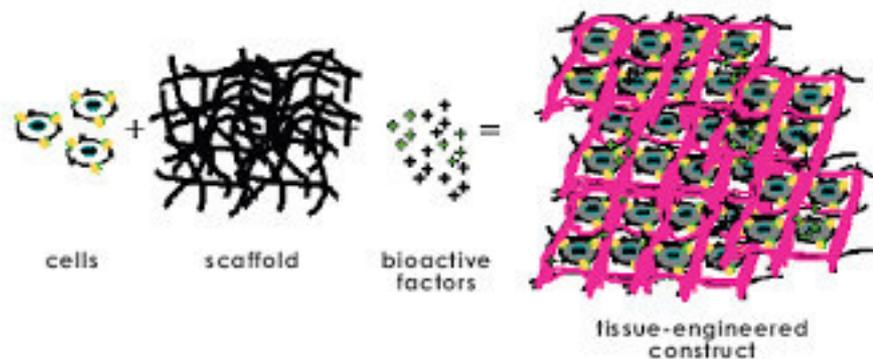
# Scaffold

Estrutura 3D que direciona o crescimento das células aderidas.

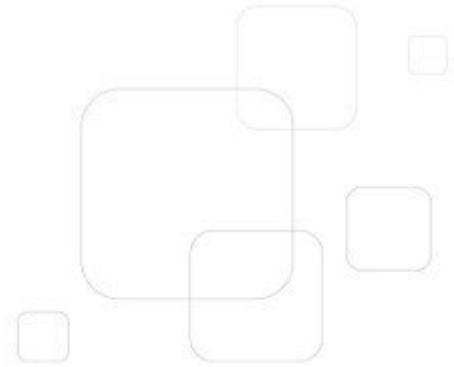
## Requisitos:

- Suporte estrutural;
- Biocompatível;
- Bioreabsorvido;
- Não citotóxico;
- Reprodutível;
- Poroso.

Esquema de interação célula e biomaterial



# Medicina regenerativa



Regeneration of large bone defects by bone substitute materials



# Biomateriais utilizados construção scaffold

- **Poliméricos:** Poli (ácido láctico) (PLA), Poli ( $\epsilon$ -caprolactona ) (PCL), Poli (hidroxibutirato) (PHB), Colágeno, Ácido Hialurônico.
- **Cerâmicos:** Biovidro, Hidroxiapatita, Trifosfato de Cálcio (TCP).
- **Metálicos:** Titânio, Tântalo, Magnésio.
- **Compósitos:** PLA e AH, colágeno e AH, PCL e gelatina

# Modelos de *scaffold*

Arquitetura do *scaffold*: Estrutura flexível e porosa

Nanofibras poliméricas

Obtido por: Eletrofiação

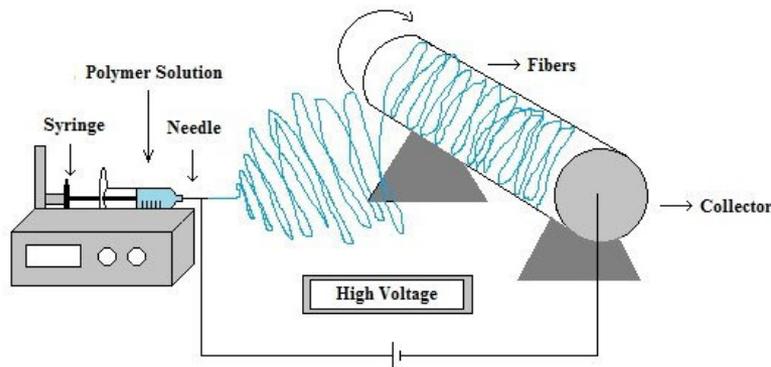
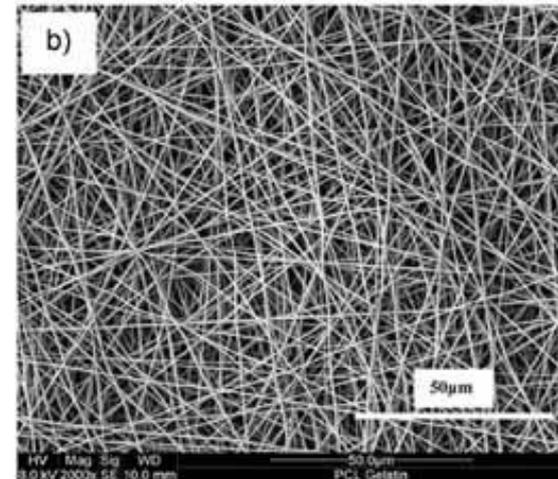
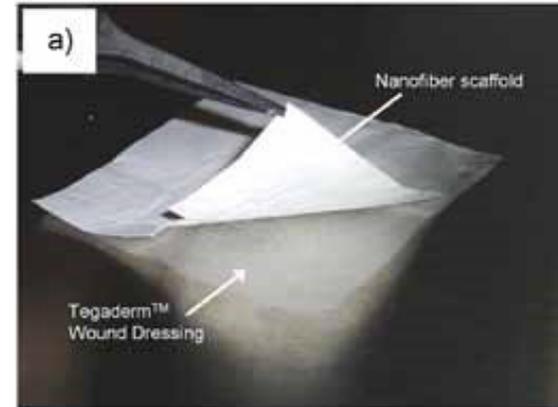


Ilustração esquemática do processo de eletrofiação



Nanofibras de PCL e gelatina, composto

(ZHANG et al 2007)

# Modelos de *scaffold*

Arquitetura do scaffold: Estrutura rígida e porosa

Obtido por: Impressão 3D

Aplicação: Regeneração óssea

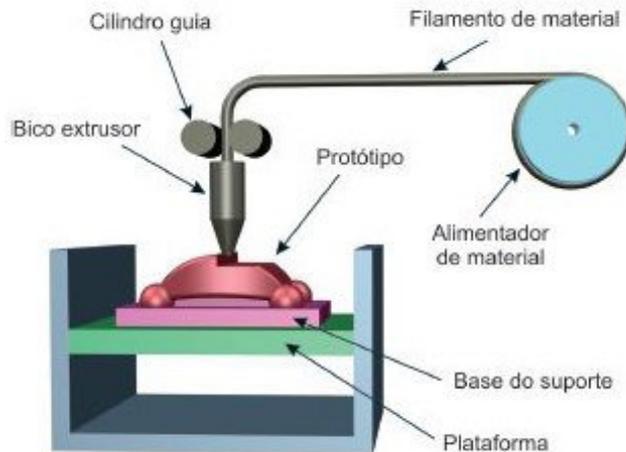
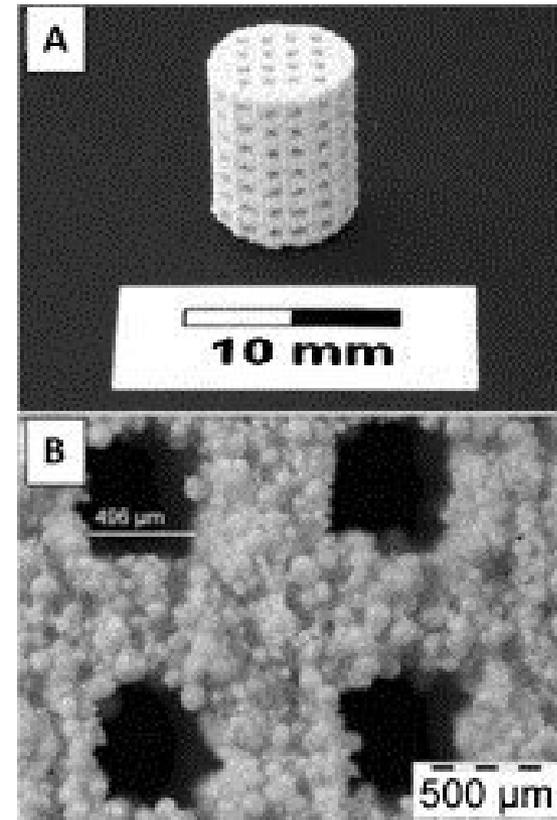


Ilustração esquemática do processo de impressão 3D



Arcabouço de hidróxiapatita

( LEUKERS et al 2005)

# Modelos de *scaffold*

Arquitetura do *scaffold*: Estrutura maleável e porosa

Obtido por: Liofilização

Aplicação: Regeneração de tecidos moles, cartilagens



Ilustração esquemática do processo de obtenção de *scaffolds* por liofilização

( GUARINO et al 2012)



Arcabouço de Poli ( etileno glicol) diacrilato ( PEGDA) para tecido osteocondral e disco intervertebral

# Modelos de *scaffold*

Relacionar propriedades do biomaterial utilizado e estrutura do *scaffold* com as respostas teciduais esperadas

- Identificar variáveis importantes e investigar

**COMO** a topografia, composição química ou propriedades mecânicas **PODEM INFLUENCIAR** a adesão, viabilidade celular e formação de tecido ?

# Produção de Nanofibras

## Métodos de fabricação de nanofibras

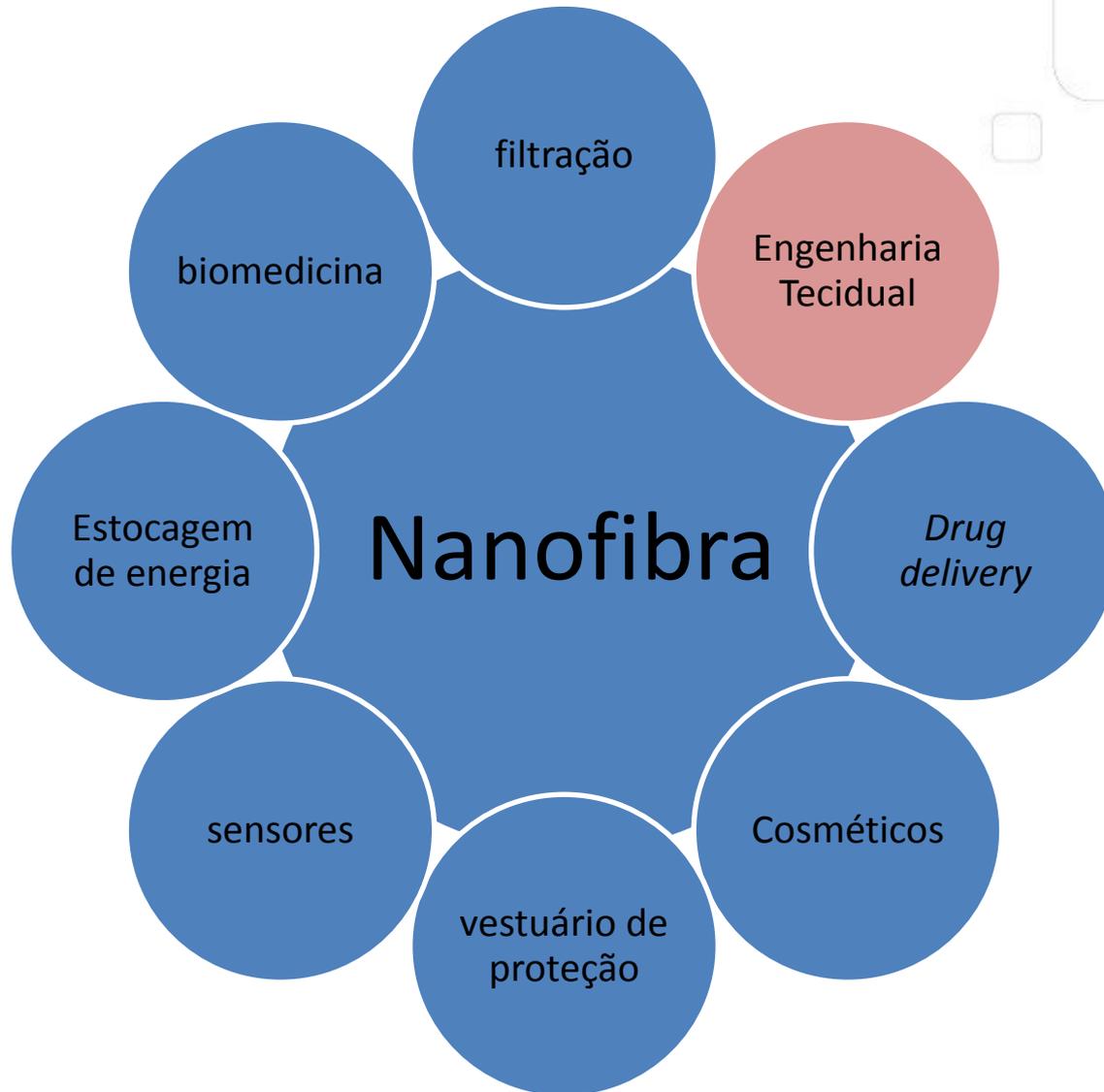
Processo	Laboratorio/ Industrial	Facilidade de processo	Vantagens	Limitações
Self assembly	Lab	Difícil	* Atinge fibras com diâmetro bem pequeno (5-8nm)	* Obtenção de fibras curtas (<1micron) * Baixo campo * Fabricação direta da matriz * Limitado a poucos polímeros
Separação de fases	Lab	Fácil	*Propriedades mecânicas adaptáveis, tamanho de poro, interconectividade *Reprodutibilidade lote a lote	* Baixo campo * Fabricação direta da matriz * Limitado a poucos polímeros
<b>Eletrofição</b>	Lab/Industrial	Fácil	*Rentável *Nanofibras longas contínuas *Produção de fibras alinhadas e orientadas *Propriedades mecânicas, tamanho, forma *Vários polímeros podem ser usados	* Uso de solventes orgânicos * Não há controle da estrutura de poros 3D

# Produção de Nanofibras

*Por que as nanofibras tem alto potencial para diferentes aplicações?*

- Área específica elevada (1 – 100 m<sup>2</sup>/g)
- Alta porosiade (ap. 90 %)
- Pequenos tamanhos de poros
- Controle do diâmetro das fibras
- Material leve e flexível
- Flexibilidade na funcionalização das superfícies

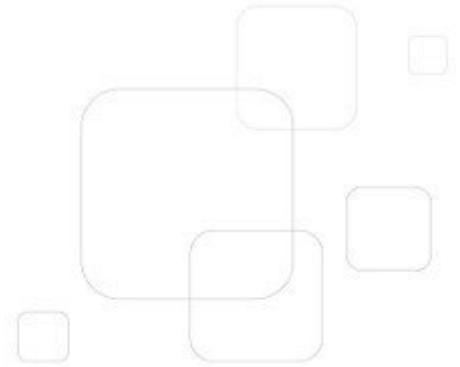
# Produção de Nanofibras



# Produção de Nanofibras

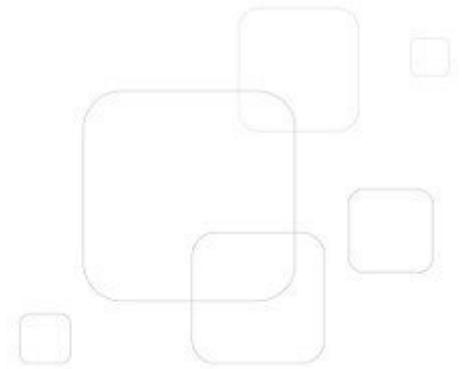
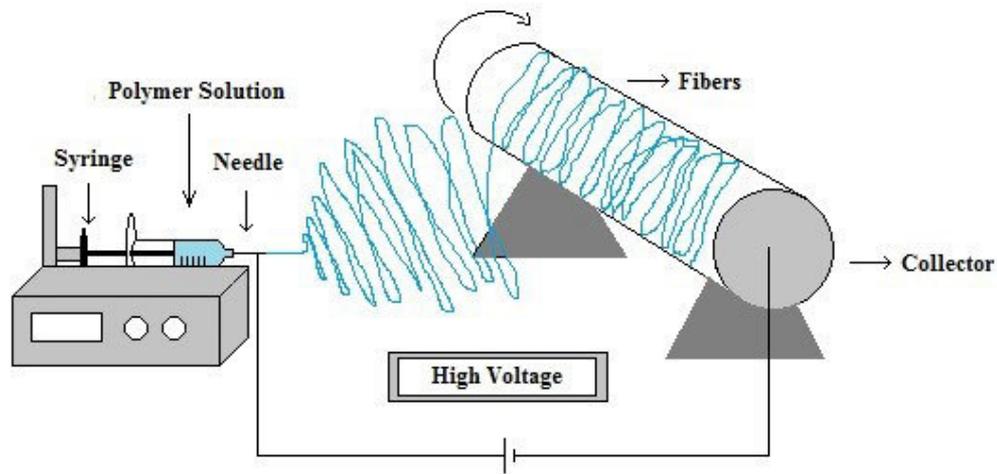
## Uso de agulha simples ou monoaxial

Uma alta tensão é aplicada na ponta da agulha / capilar o qual contem a solução polimérica com uma tensão superficial específica. Um gota é formada na ponta do capilar (conhecida como cone de Taylor) e encontra-se carregada e induz acúmulo de carga na superfície. Esta gota se deforma até formar um jato que se move na direção do coletor com simultânea evaporação do solvente formando uma fibra / membrana. O coletor das fibras encontra se aterrado para favorecer a ejeção do jato carregado na direção do coletor (Zanin *et al.* 2011).



# Produção de Nanofibras

## Monoaxial

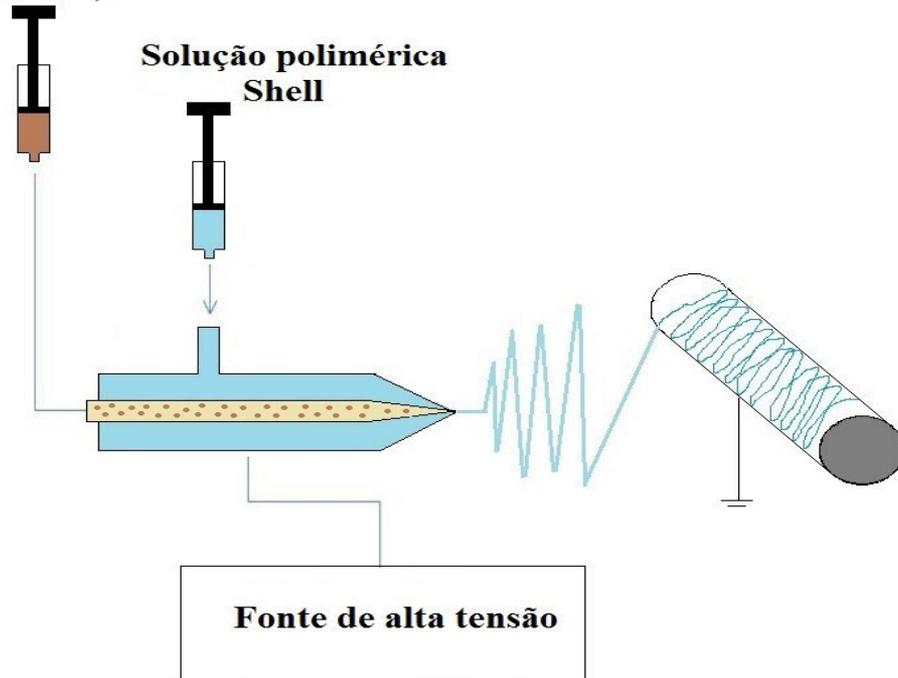


# Produção de Nanofibras

## *Coaxial*

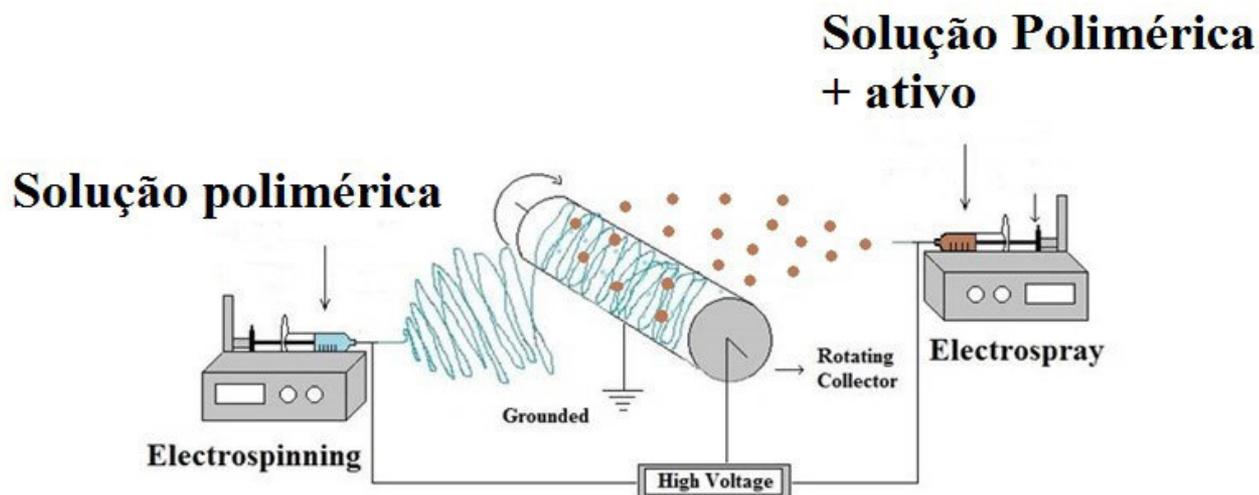
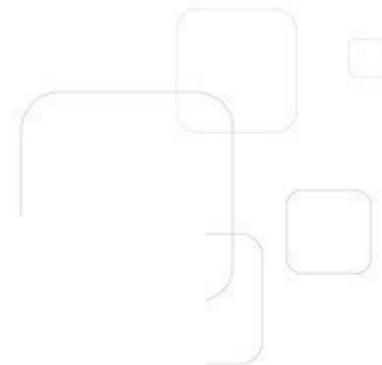
Solução Polimérica +  
ativo ("core")

Solução polimérica  
Shell

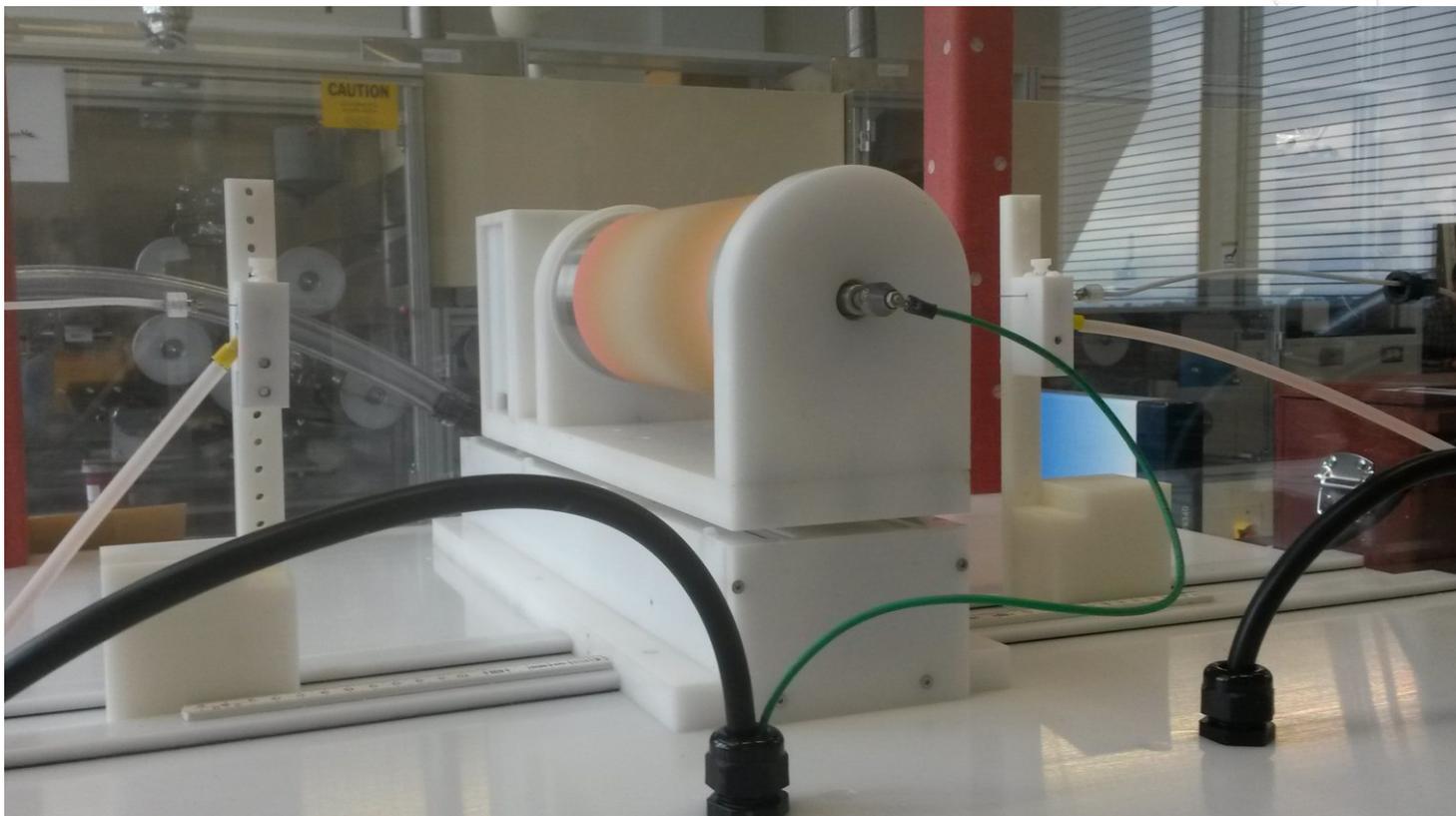


# Produção de Nanofibras

Eletrificação Electrospay



# Processo de Eletrofiiação



Equipamento escala laboratorial do NREL (USA)



# Processo de Eletrofiação

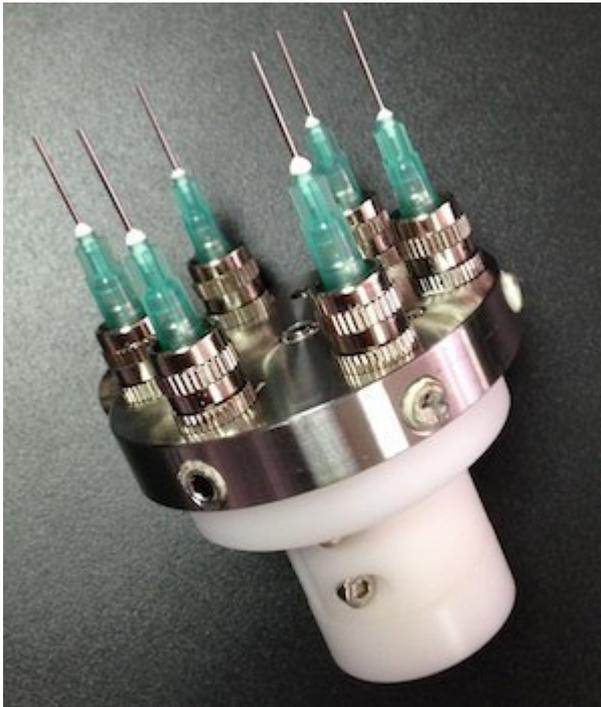


**Nanospinner 24-XP**

Equipamento escala piloto em fase de aquisição pelo Bionano - LPP

# Processo de Eletrofiação

- *Multi-spineret : Sistema com várias agulhas ou capilares*



# Polímeros aplicados em processo de eletrofiação

Tipo de Polímero	Polímero	Solvente
Polímeros naturais	Fibroína de seda	Ácido Fórmico
	Quitosana	Ácido acético, TFA
	Gelatina	Ácido acético
	Colágeno	HFIP (Hexafluorisopropanol)
Polímeros sintéticos	Fibrinogênio	HFIP
	PCL	Cloroformio / DMF, Ácido acetico
	PLA	DCM
	PVA	Água

# Polímeros aplicados em processo de eletrofição



Tipo de Polímero	Polímero	Solvente
Polímeros sintéticos		
	PGA	Água
	PEO	Água

# Degradable periods of synthetic polymer

Materials	Degradation period	Hidrophobicity
Polycaprolactone (PCL)	> 20 months	Hydrophobic
Poly L-lactic acid (PLLA)	20 $\approx$ 60 months	Hydrophobic
Polydioxanone (PDO)	6 months	Hydrophilic
Polyglycolic acid (PGA)	1 $\approx$ 4 months	Hydrophilic
Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)	2 months	Depend of PLA and PGA compositions. Increase of PLA => less hydrophilicity

# Efeitos dos parâmetros de processo na eletrofição

Parâmetros da Solução

Parâmetros de Processo

Parâmetros do Ambiente

# Caracterização física / Físico Química de Nanofibras

- Morfologia (SEM)
- Análise térmica (DSC e TG)
- Espessura
- Identificação de grupos funcionais (FT-IR)
- Resistência mecânica
- Determinação do Ângulo de contato (hidrofóbico / hidrofílico)
- Tamanho de poro, distribuição dos tamanhos de poros, porosidade
- Espectroscopia por energia dispersiva de raios X (EDS)
- Determinação do ativo incorporado na nanofibra
- Determinação do perfil de liberação do ativo
- Estudo de permeação cutânea do ativo incorporado na nanofibra (uso da Célula de Franz)

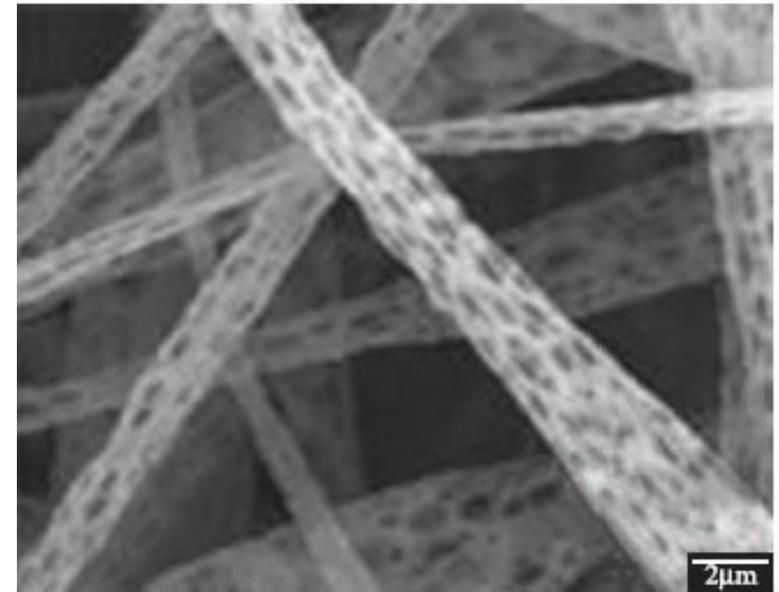
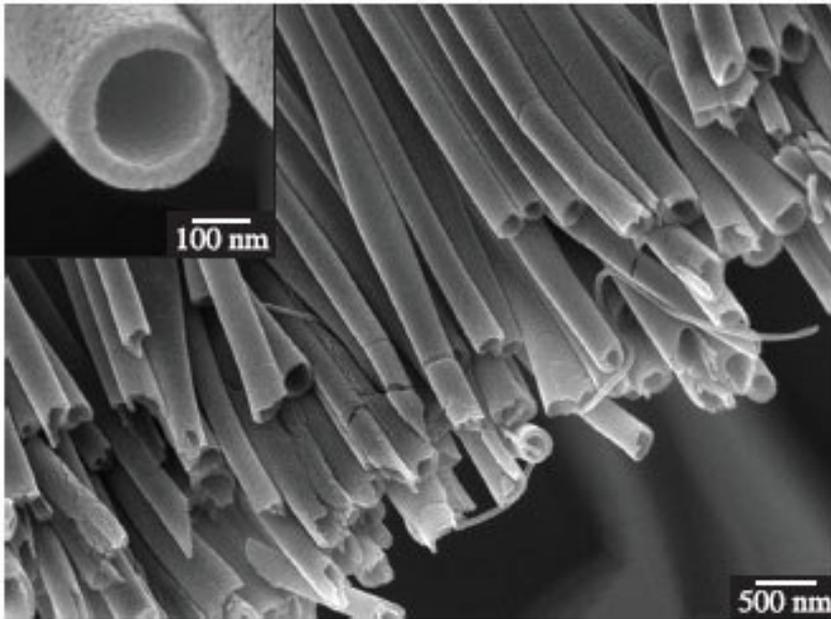
# Caracterização biológica de Nanofibras

Critérios para seleção do teste de avaliação toxicológica de dispositivo biomédico – ISO 10993-1

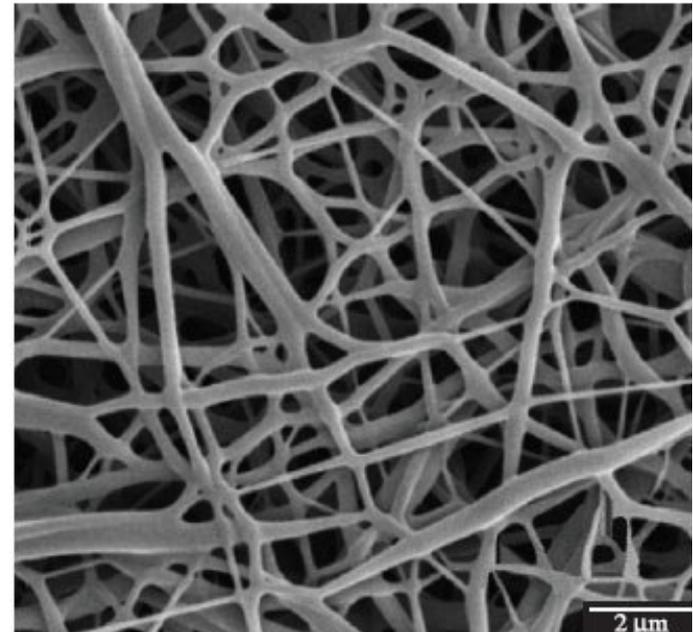
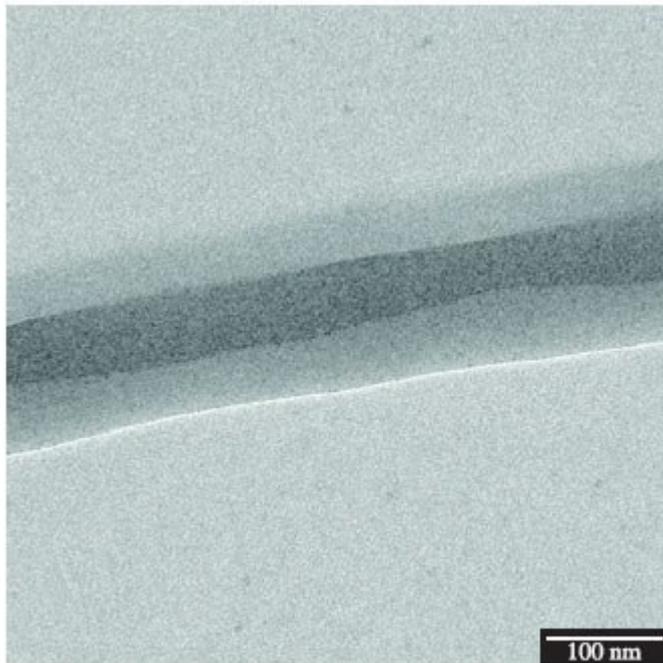
Dispositivo Biomédico categorizado por:			Efeito Biológico							
Categoria	Contato	Duração do contato A – limitado (≤ 24h) B – prolongado (>24h a 30 d) C – permanente (>30d)	Citotoxicidade	Sensibilidade	Irritação ou reatividade intracutânea	Toxicidade sistêmica	Toxicidade Subcutânea	Genotoxicidade	Implantação	Hemocompatibilidade
Superfície do dispositivo		A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X					
	Membrana da mucosa	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X		X	X		
	Modificação ou comprometimento da superfície	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X					
Dispositivo de comunicação externa	Fluxo sanguíneo, indireto	A	X	X	X					
		B	X	X	X					
		C	X	X	X		X	X		
	Tecido/osso/dentina	A	X	X		X	X	X		X
		B	X	X	X	X	X	X	X	
		C	X	X	X	X	X	X	X	
	Circulação sanguínea	A	X	X	X					X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X
Dispositivo implantável	Tecido/osso	A	X	X	X					
		B	X	X	X	X	X	X	X	
		C	X	X	X	X	X	X	X	
	Sangue	A	X	X	X	X	X		X	X
		B	X	X	X	X	X	X	X	X
		C	X	X	X	X	X	X	X	X

ISO 10993-1

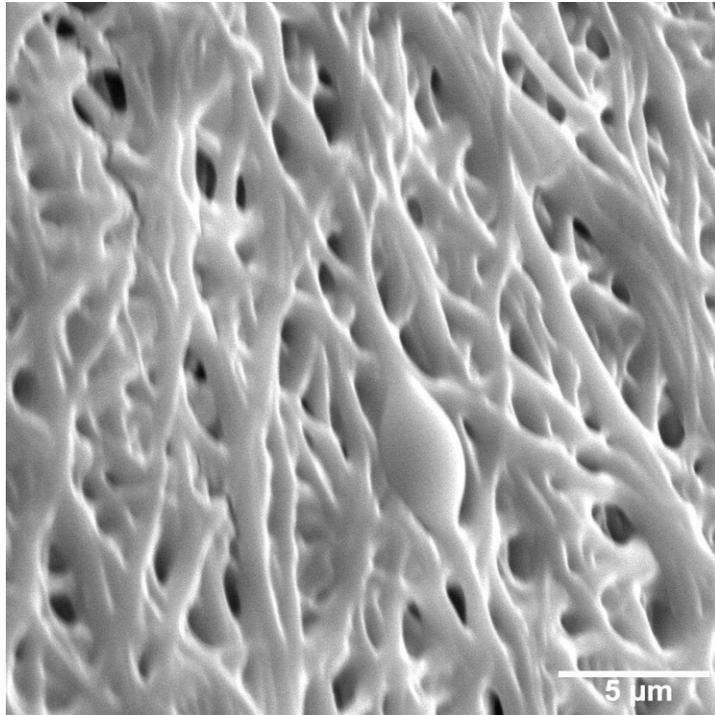
# Exemplo de arquitetura de nanofibra



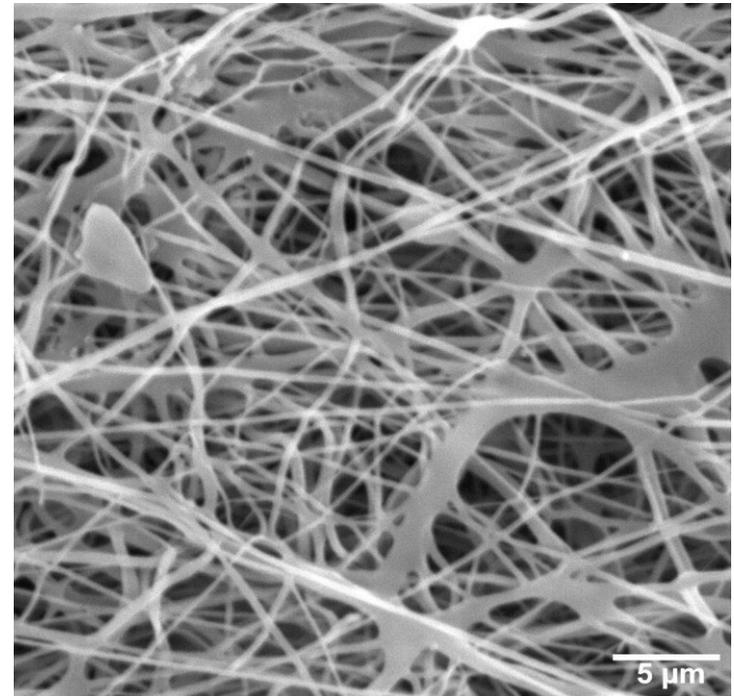
# Exemplo de arquitetura de nanofiber



# Exemplo de arquitetura de nanofibra

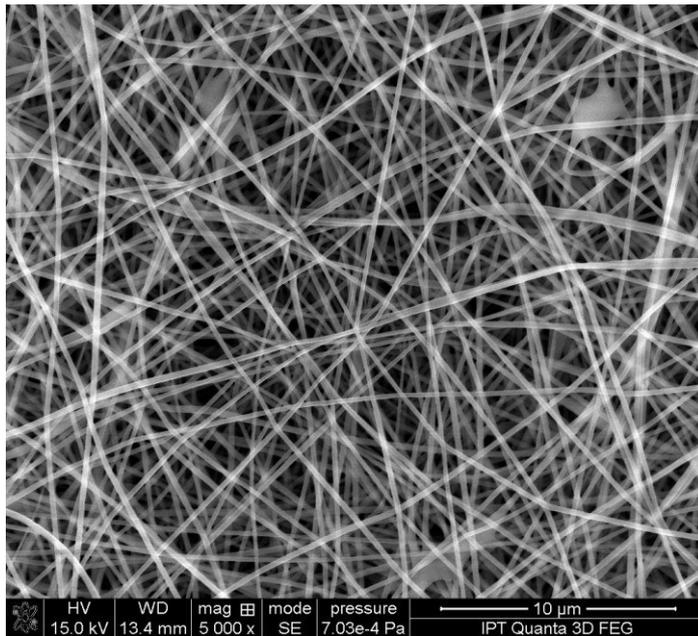


***PVA electrospun with a feed rate of 2.5 mL/h and tension of 11kV . SEM 3500x.***

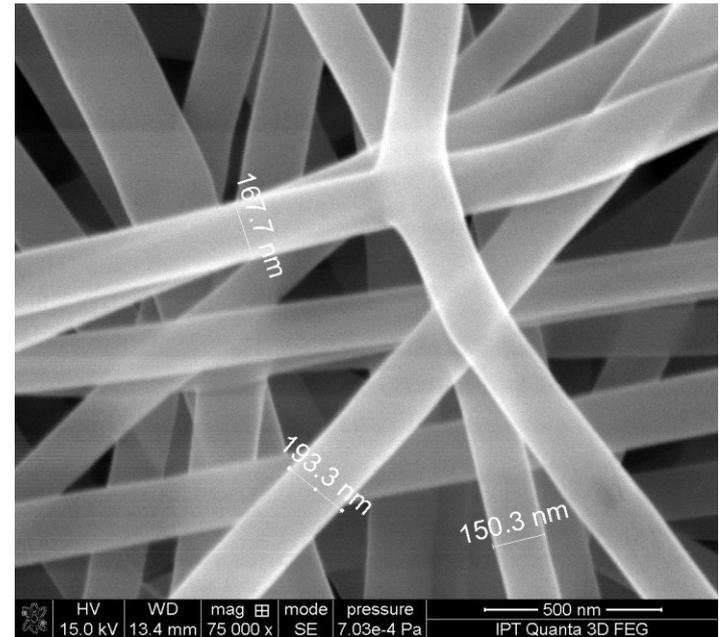


***PVA electrospun with a feed rate of 2 mL/h and tension of 22 kV . SEM 3500x.***

# Exemplo de arquitetura de nanofibra

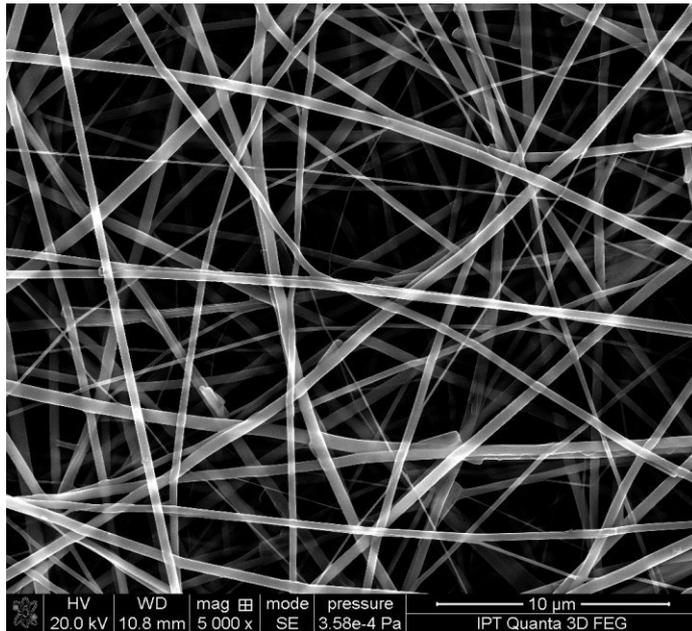


***PVP/PMMA electrospun with a feed rate of 1.7 mL/h and tension of 12.5kV . SEM 5000x***

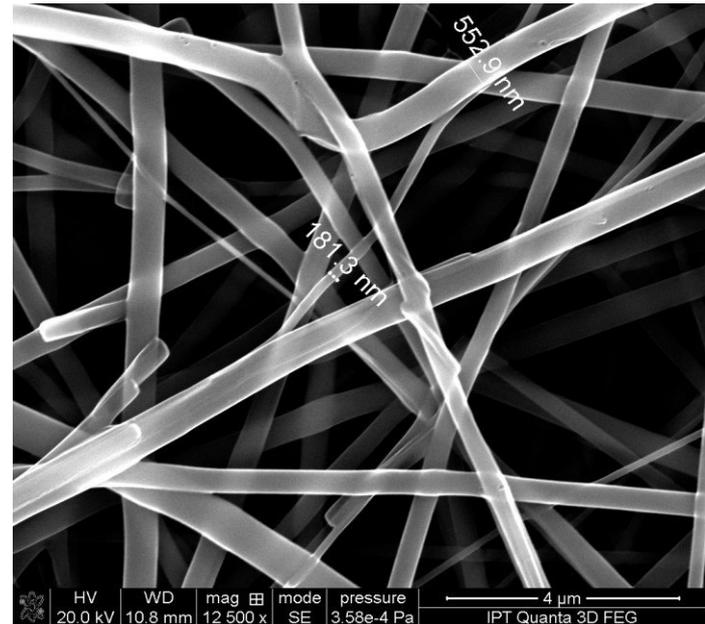


***PVP/PMMA electrospun with a feed rate of 1.7 mL/h and tension of 12.5kV . SEM 75000x***

# Exemplo de arquitetura de nanofibra

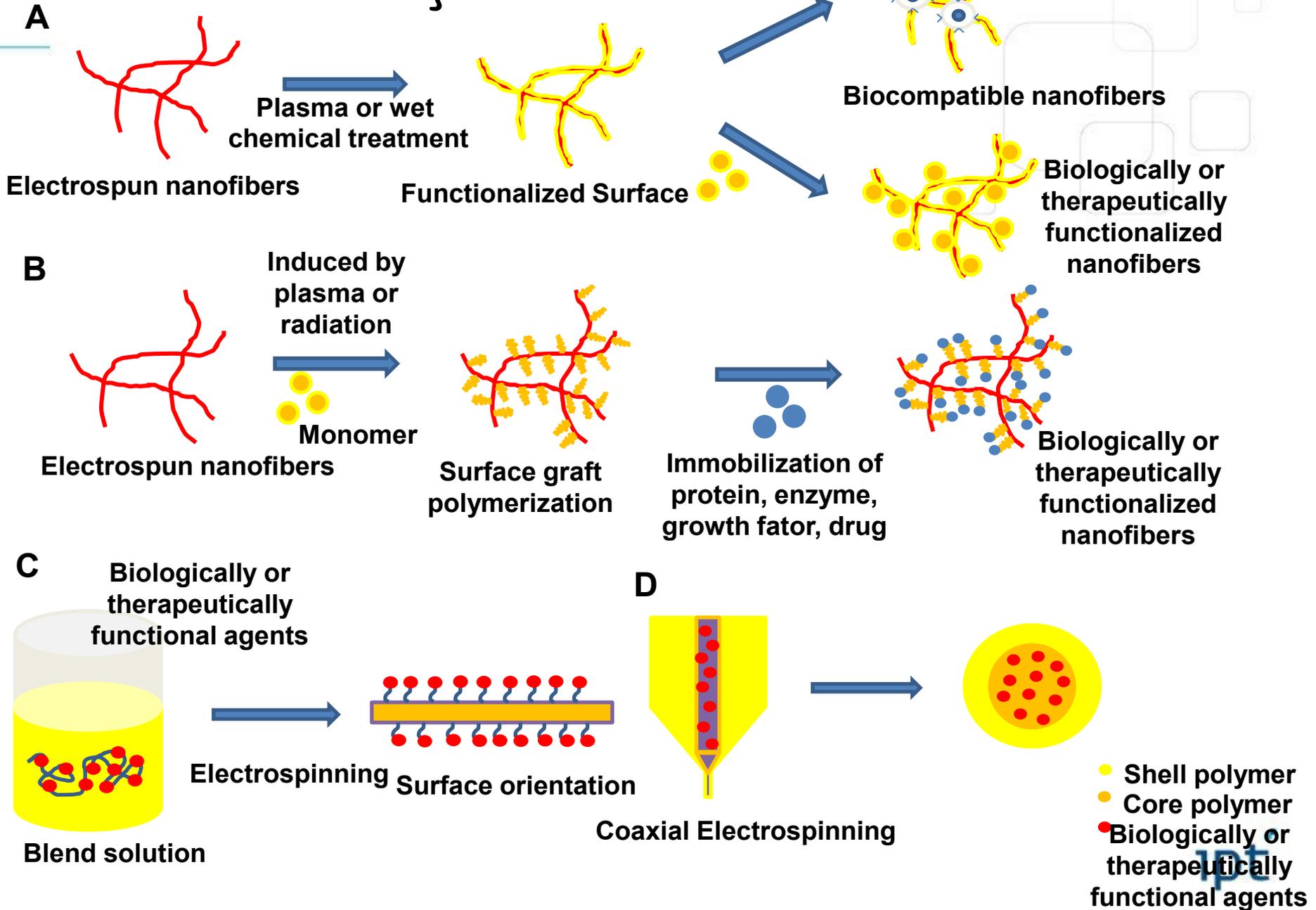


***PVA:active electrospun with a feed rate of 1.0 mL/h and tension of 12kV . SEM 5000x***



***PVA:active electrospun with a feed rate of 1.0 mL/h and tension of 12kV . SEM 12500x***

# Funcionalização das fibras

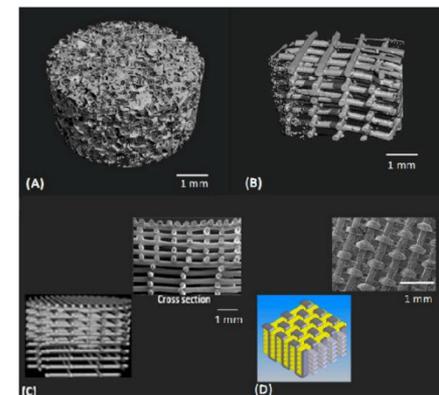


# Desafios na construção do *Scaffold*



**Achille`s Hill of tissue engineering:  
production of scaffolds for  
biological applications**

<http://www.mdpi.com/2079-4983/3/4/799/htm>



# Desafios na construção do *Scaffold*

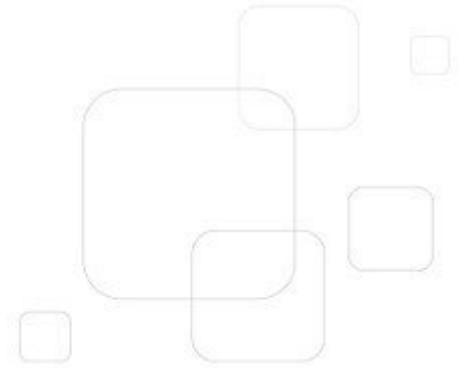
## CONSIDERAÇÕES / LIMITAÇÕES

- ✓ Vascularização dos tecidos construídos
- ✓ A inserção precisa de diferentes tipos celulares em scaffolds 3D poroso
- ✓ O tipo de material de construção, o qual pode interferir na diferenciação celular quando adesão de células tronco
- ✓ Biodegradabilidade dos materiais / polímeros
- ✓ Tempo de degradação do material compatível com o tempo de regeneração do tecido alvo

# Desafios na construção do *Scaffold*

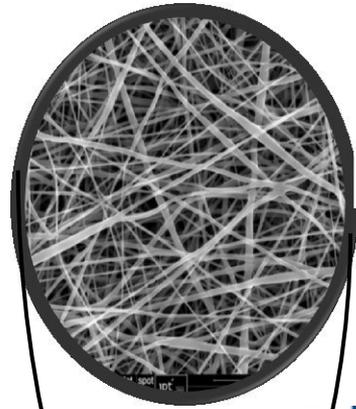
## CONSIDERAÇÕES / LIMITAÇÕES

- ✓ A escolha do polímero e solvente no processo de eletrofição são determinantes para a aplicação fim, considerando que o polímero possa ser eletrofiado e o solvente residual não seja um contaminante para produto final.
- ✓ Embora esta tecnologia aparentemente seja simples, o ajuste do processo necessita ser considerado para cada polímero empregado e um estudo rigoroso das variáveis de processo deve ser feito.
- ✓ Custos altos das biomoléculas e dos kits de quantificações das biomoléculas.

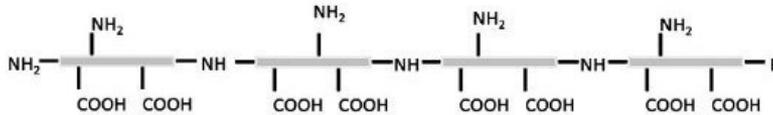
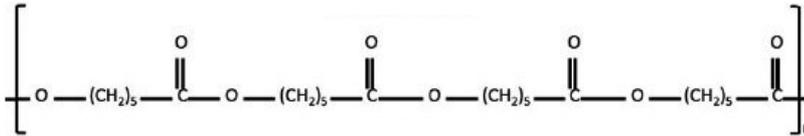
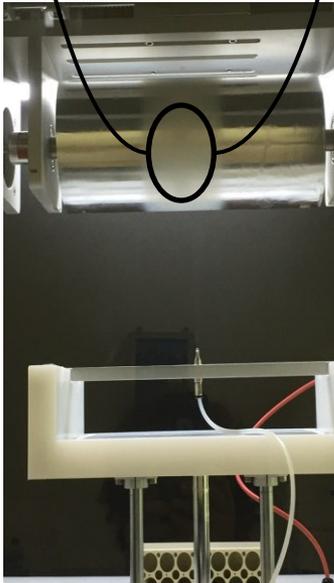
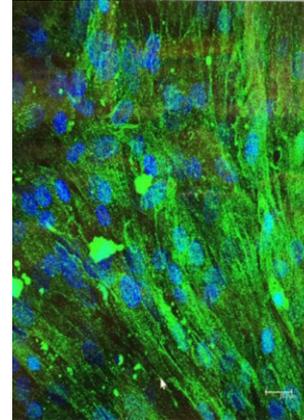
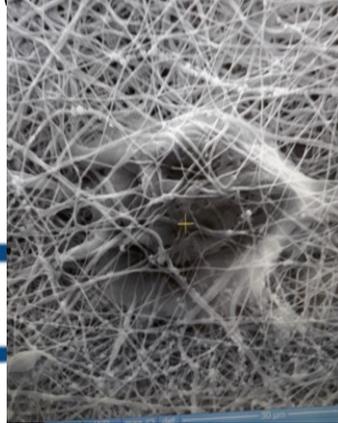


# Estudo de caso empregando Nanofibras como Scaffolds no IPT

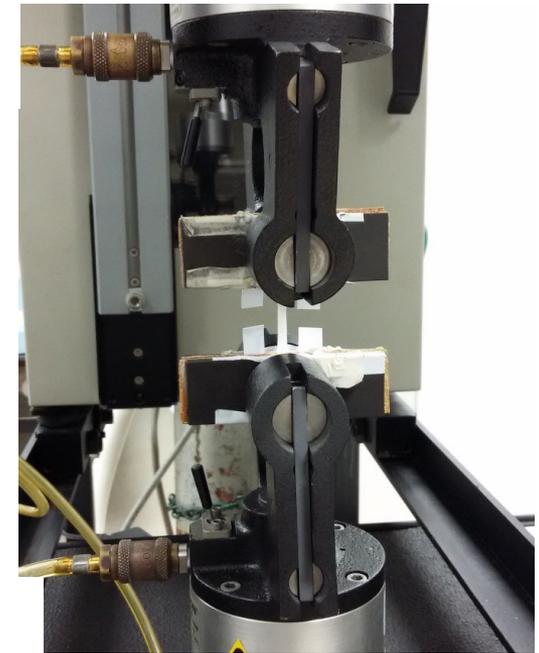
# Case studies of nanofiber Scaffold at IPT



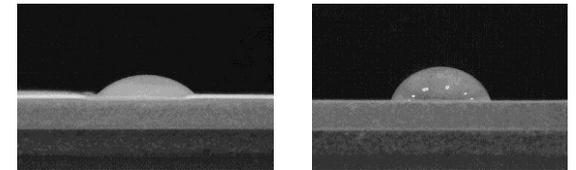
Stem Cell



Vanessa Tiemi Kimura (MSc.) Supervisors:  
 Dra. Wang Hui (EPUSP) /  
 Dra. Maria Helena Ambrosio Zanin  
 (IPT)



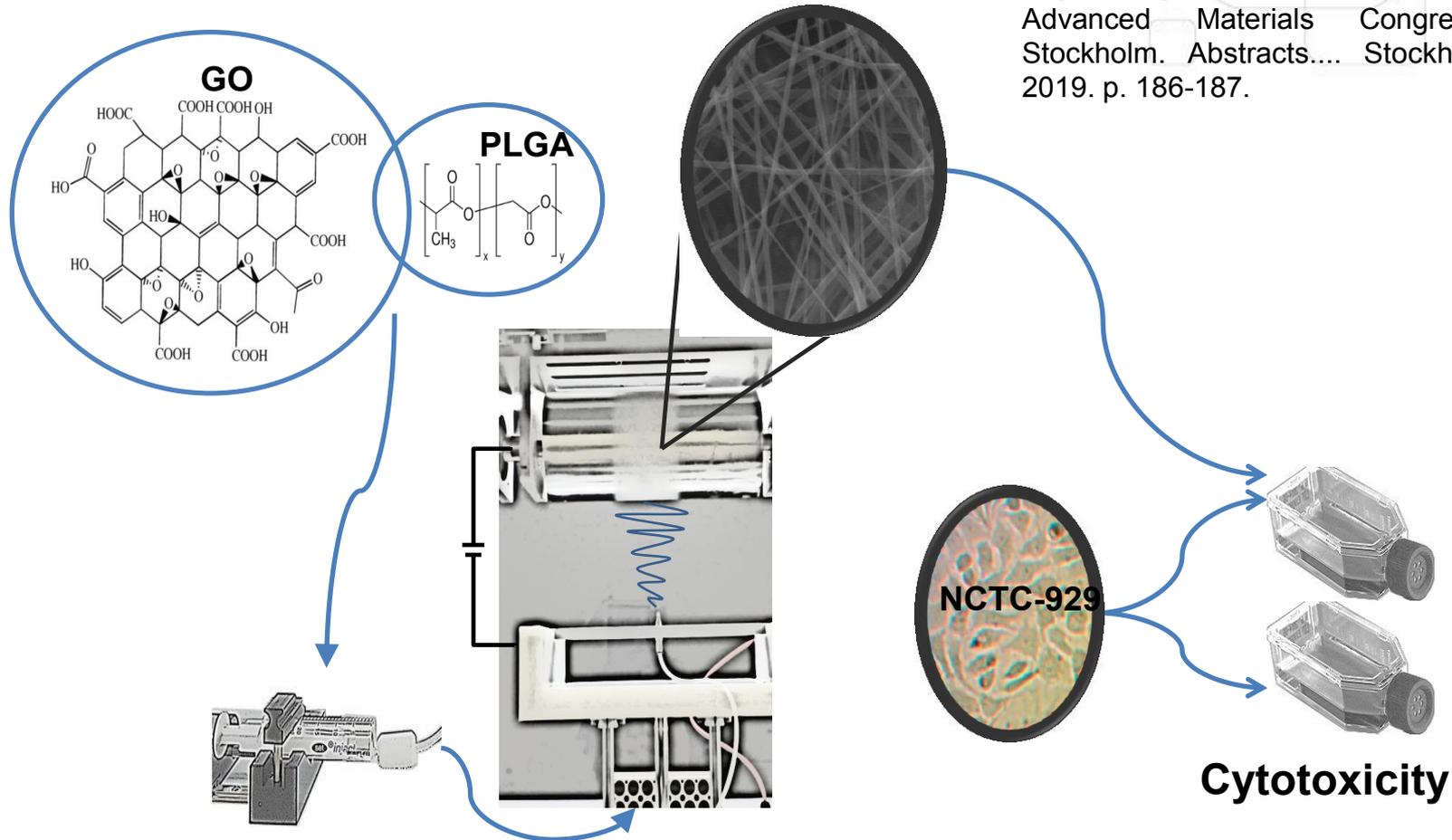
Mechanical tensile strength

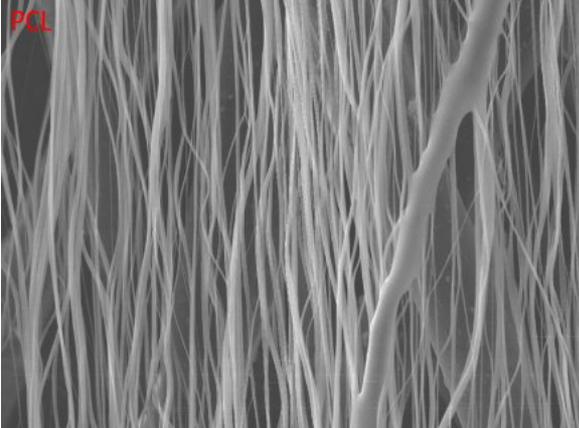


Wettability

# Case studies of Scaffold at IPT

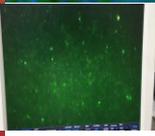
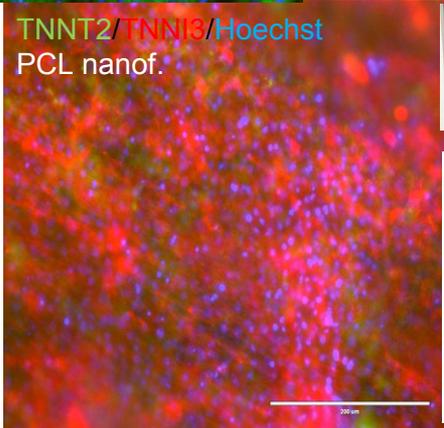
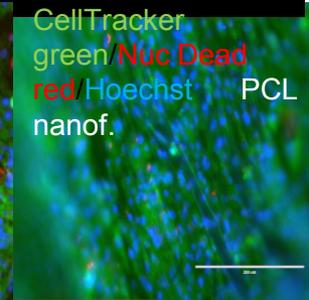
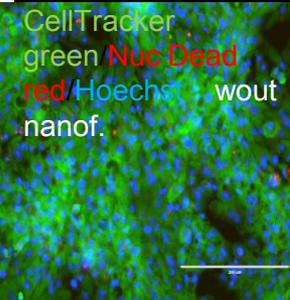
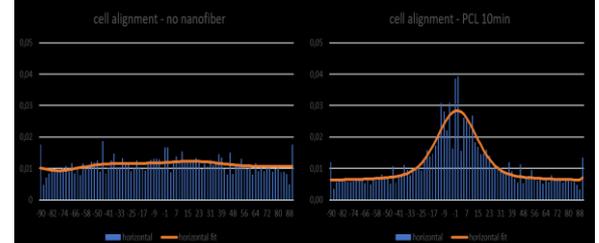
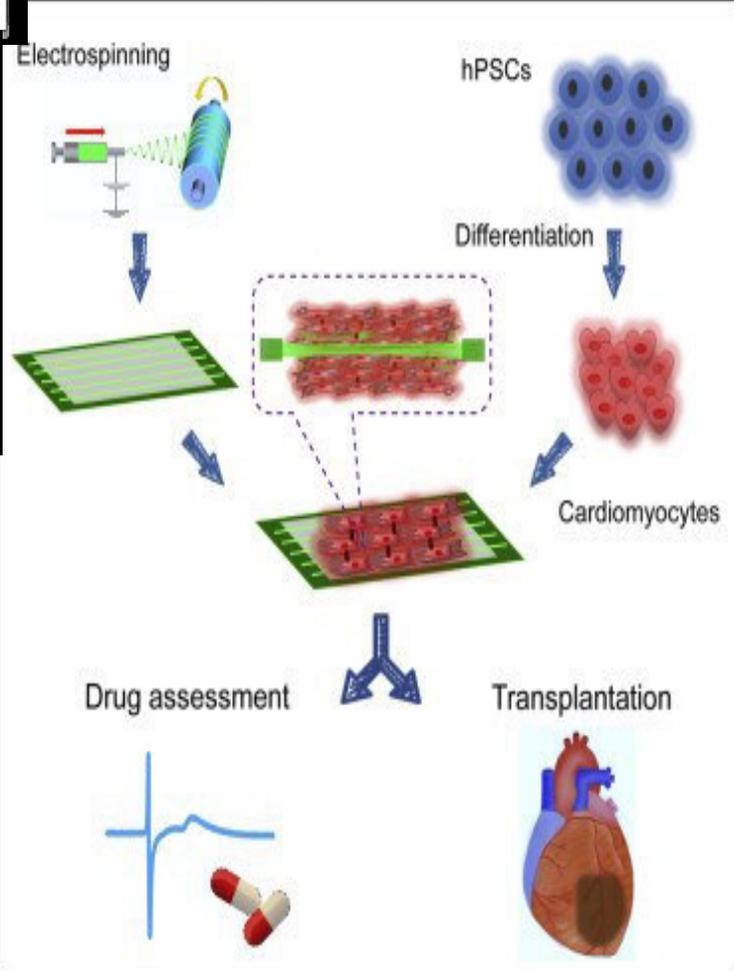
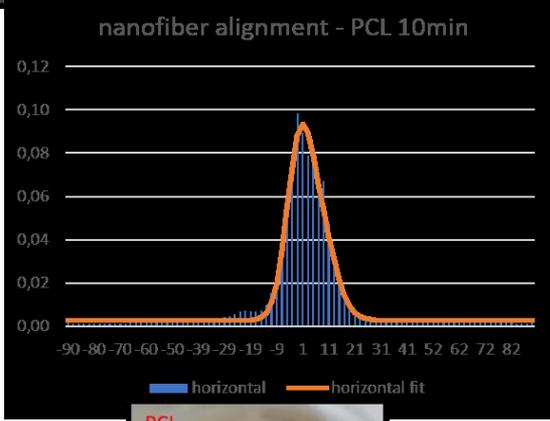
ZANIN, M. H. A.; KIMURA, V. T. ; SANT'ANNA, D. A. . Fabrication of Graphene oxide-PLGA hybrid nanofiber for tissue engineering application'. In: 27th Assembly of Advanced Materials Congress, 2019, Stockholm. Abstracts.... Stockholm: IAAM, 2019. p. 186-187.





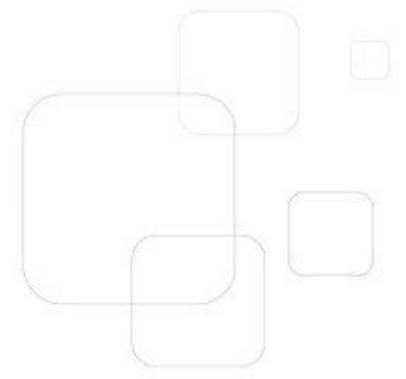
10  $\mu\text{m}^2$  EHT = 20.00 KV Mag = 1.00 K X Date :25 Jul 2019  
 Spot Size = 390 WD = 10.5 mm Signal A = SE1 ipt

# Scaffold de nanofibras alinhadas para cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotente



# Referências

- Langer, R., Vacanti, J. P., Tissue Engineering. Science, v.260, n.5110, p 920-926, 1993.
- [Chang](#), J., [Gupta](#), G. Tissue Engineering for the Hand: Research Advances and Clinical Applications , World Scientific Publishing, 2010
- Casagrande, L. Aplicação de princípios da engenharia tecidual no estudo da diferenciação de células tronco pulpares, UFRGS 2008;
- YZ Zhang, B Su, J Venugopal, S Ramakrishna, Biomimetic and bioactive nanofibrous scaffolds from electrospun composite nanofibers CT Lim Int J Nanomedicine. 2007 Dec; 2(4): 623–638. Published online 2007 Dec.
- Leukers, B. et al. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v.16, n.12, p.1121-1124, 2005.
- Guarino, V.; Gloria, A.; Raucci, M.G.; Ambrosio, L. Hydrogel-Based Platforms for the Regeneration of Osteochondral Tissue and Intervertebral Disc. Polymers 2012, 4, 1590-1612.





---

# Obrigada!

Dra. Maria Helena Ambrosio  
Zanin

[mhzanin@ipt.br](mailto:mhzanin@ipt.br)