

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS
CURSO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

ALANA SANTOS BENZ

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE
ACETATO DE CELULOSE PRODUZIDAS A PARTIR DA TÉCNICA DE
ELETROFIAÇÃO

BELO HORIZONTE

2018

ALANA SANTOS BENZ

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE
ACETATO DE CELULOSE PRODUZIDAS A PARTIR DA TÉCNICA DE
ELETROFIAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado no curso de graduação em Engenharia de Materiais no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Dra. Roberta Viana Ferreira
Co-orientador: Dr. Marcos Gonçalves Rios

BELO HORIZONTE

2018

ALANA SANTOS BENZ

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE
ACETATO DE CELULOSE PRODUZIDAS A PARTIR DA TÉCNICA DE
ELETROFIAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado no curso de graduação em Engenharia de Materiais no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Materiais.

Aprovado em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Roberta Viana Ferreira - **Orientadora** - **DEMAT/CEFET- MG**

Prof. Dr. Marcos Gonçalves Rios - **Co-Orientador** - **DEMAT/CEFET- MG**

Prof^a. Dra. Aline Bruna da Silva - **DEMAT/CEFET- MG**

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Roberta Viana meus sinceros agradecimentos pela orientação, pela ajuda constante em minha jornada de aprimoramento profissional e pessoal, pela confiança em meu trabalho e exímia dedicação para que essa linha de pesquisa se torne cada vez mais sólida e aplicável no campo da engenharia de tecidos. Sem o seu suporte nada disso seria possível.

Ao professor Dr. Marcos Rios pela co-orientação, pelos ensinamentos práticos, dicas do ponto de vista mercadológico e comercial e pelo compartilhamento de suas experiências de vida.

À professora Dra. Aline Bruna pelo suporte incondicional, pela contribuição com seus extensos conhecimentos técnicos na área e pelos materiais de apoio concedidos para que o trabalho pudesse ser finalizado.

À Ana Elisa Antunes, Dra. Erika Cristina Jorge, Marina Dutra, Aline Copola e membros da Biomimetic Solutions Limited pela gentil concessão de materiais e resultados provenientes das linhas de pesquisa realizadas pela empresa, permitindo que esse trabalho pudesse ser escrito.

Ao CEFET-MG e à UFMG pela estrutura, materiais e suporte técnico fornecido para que todas as análises pudessem ser realizadas.

Ao Guilherme Hoffman pelo constante apoio e aos professores que contribuem diretamente ou indiretamente para a realização e continuação dessa linha de pesquisa.

RESUMO

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar voltado para o desenvolvimento de substitutos biológicos que visam a restauração, manutenção ou melhoria da função tecidual. Atualmente a aplicação das técnicas de engenharia de tecidos se expandiram para o setor alimentício e linhas de pesquisas inovadoras têm sido desenvolvidas com o objetivo de reproduzir tecido muscular animal para consumo humano (*clean meat*). No entanto, a engenharia de tecidos ainda enfrenta limitações quanto a fabricação de estruturas a partir de matéria prima de baixo custo aliadas a técnicas padronizáveis. Nesse contexto, o acetato de celulose se torna particularmente interessante pois o mesmo é caracterizado como **um polímero de baixo custo de aquisição e proveniente de uma fonte natural** podendo ser utilizado para uma grande variação de aplicações. O presente trabalho consistiu da produção e caracterização de matrizes tridimensionais de acetato de celulose por meio da técnica de eletrofiação de forma que a morfologia e propriedades físico-químicas foram avaliadas. Foi realizada a cultura de células musculares (C2C12) com o objetivo de avaliar a potencial aplicação desse material como *scaffold* para produção de *clean meat*. Os resultados obtidos com a cultura de células C2C12 demonstram uma potencial aplicabilidade da técnica para a produção de *scaffolds* biocompatíveis resultando num ambiente favorável a adesão e proliferação celular.

Palavras-chave: acetato de celulose; *scaffold*; eletrofiação.

ABSTRACT

Tissue engineering is a multidisciplinary field focused in the development of biological substitutes that aim to restore, maintain or improve a certain tissue function. Currently the applications of the tissue engineering techniques have expanded to the food production sector and innovative research lines have been developed with the aim of reproducing animal muscle tissue for human consumption (clean meat). However, tissue engineering still faces constraints regarding the fabrication of structures from low-cost raw materials and standardized production techniques. In this context, cellulose acetate becomes particularly interesting because it is characterized as a neutral polymer, non-toxic with a low acquisition cost and can be used for a wide range of applications. The present work consists of the production and characterization of three-dimensional cellulose acetate matrices through the electrospinning technique and evaluation of the morphology and physical-chemical properties. The muscle cell culture was performed aiming to evaluate the potential application of this material as a scaffold for the production of clean meat. The results obtained with the C2C12 cell culture showed the potential applicability of the electrospinning technique for the obtention of biocompatible scaffolds resulting in an environment favorable for cell adhesion and proliferation.

Key words: cellulose acetate; scaffold; eletrospinning.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC– Acetato de celulose

BM-MSCs- Células-tronco mesenquimais da medula óssea

CEFET-MG– Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais

C2C12– Linhagem de células (mioblastos) advindas de ratos

DEMAT– Departamento de Engenharia de Materiais

DMF– Dimetilformamida

DNA– Ácido desoxirribonucleico

DSC– *Differential scanning calorimetry*

ES– Células-tronco embrionárias

FTIR– Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier

GS– Grau de Solubilidade

RGD– Arginina, Glicina e Aspartato

MEC– Matriz Extracelular

MEV– Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT– *Tetrazolium Reduction Assays*

PDLA– Poli (D-ácido láctico)

PDLLA– Poli (DL-ácido láctico)

PCL– Policaprolactona

PGA– Poli (ácido glicólico)

pH- Potencial Hidrogeniônico

PLLA – Poli (L-ácido láctico)

UC-MSCs- Células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical

UV- Ultravioleta

3D- Dimensão Tridimensional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema geral de criação de um dispositivo implantável baseado nas técnicas de engenharia de tecidos.....	15
Figura 2 - Esquema geral da aplicação da engenharia de tecidos no setor de clean meat	16
Figura 3 - Relação entre as propriedades do material/ <i>scaffold</i> para geração de tecido funcional.	21
Figura 4 - MEV das nanofibras de PLGA com estrutura orientada (c) e aleatória (d)	Error! Bookmark not defined.
Figura 5 - Esquema de indução de mudança no potencial da membrana celular a partir de nanofibras piezoelétricas.	27
Figura 6- Vista esquemática de um equipamento de eletrofição.....	28
Figura 7 - Esquema da formação de <i>beads</i> por instabilidade do sistema de eletrofição	30
Figura 8 - Reação de obtenção do acetato de celulose, GS= 2- 2.5.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 9 - Espectroscopia para a amostra de acetato de celulose	36
Figura 10 - Espectroscopia comparativa entre a amostra de acetato de celulose P.A. e a nanofibra.....	37
Figura 11 - Microscopia de varredura eletrônica para a amostra de nanofibra de AC ...	38
Figura 12- Histograma representativo da distribuição de diâmetros das nanofibras	39
Figura 13- DSC para a amostra de nanofibra de acetato de celulose.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 14 - Microscopia eletrônica de varredura realizada para a amostra de controle (A) e de nanofibra de acetato de celulose (B) para 2 dias de incubação.....	40
Figura 15 - Microscopia ampliada para a amostra de controle (A) e de nanofibra de acetato de celulose (B) para 2 dias de incubação.....	41
Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura realizada para a amostra de controle (A) e de nanofibra de acetato de celulose (B) para 7 dias de incubação.....	42
Figura 17 - Comparação da viabilidade celular das amostras.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modos vibracionais dos grupos identificados para a amostra de nanofibra ..37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivos Gerais	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	A engenharia de tecidos	14
3.2	Polímeros para engenharia de tecidos.....	16
3.2.1	Acetato de celulose	18
3.3	<i>Scaffolds</i>	19
3.3.1	<i>Scaffolds</i> e a engenharia de tecidos	19
3.3.2	Requisitos de projeto	20
3.3.2.1	Arquitetura de poros e transporte de massa	21
3.3.2.2	Resistência mecânica	22
3.3.2.3	Condutividade elétrica	23
3.3.3	Tipos de <i>scaffolds</i>	23
3.3.3.1	Estruturas tridimensionais descelularizadas.....	23
3.3.3.2	Hidrogéis.....	24
3.3.3.3	Nanofibras poliméricas	25
3.4	Eletrofiação.....	27
3.4.1	Técnica de eletrofiação	27
3.4.2	Parâmetros de equipamento	29
3.5	Análise de oportunidades de mercado	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Produção das nanofibras de acetato de celulose	32
4.1.1	Materiais	32
4.1.2	Procedimento	32
4.2	Caracterizações do Material.....	33
4.2.1	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	33

4.2.2	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	33
4.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	33
4.3	Avaliação da adesão, morfologia e viabilidade celular	33
4.3.1	Preparo do <i>scaffold</i> para o Cultivo Celular.....	34
4.3.2	Cultura Celular.....	34
4.3.3	Ensaio Colorimétrico (MTT).....	34
4.3.4	Microscopia Eletrônica de Varredura das nanofibras (MEV)- Caracterização estrutural	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
5.1	Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR).....	36
5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (mudar de lugar- dsc vem primeiro)	38
5.3	Avaliação da adesão, morfologia e viabilidade celular com C2C12	40
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar voltado para o desenvolvimento de substitutos biológicos que visam a restauração, manutenção ou melhoria da função tecidual (LANGER e VACANTI, 2015). A principal motivação da engenharia de tecidos vem da necessidade frequente de repor ou regenerar parte do organismo humano no setor médico. Atualmente a aplicação das técnicas de engenharia de tecidos se expandiram para o setor alimentício e linhas de pesquisas inovadoras têm sido desenvolvidas com o objetivo de reproduzir tecido muscular animal para consumo humano (*clean meat*) a partir de células de animais (ex. boi, peixe, frango).

A construção de tecidos a partir do conceito da engenharia de tecidos exige o uso de pelo menos três elementos: os *scaffolds*, as células e o microambiente fisiológico (LANGER e VACANTI 2015). Nesse contexto, os *scaffolds* possuem um papel crítico e podem ser definidos como matrizes tridimensionais que servem de suporte físico temporário para a adesão no cultivo de células *in-vitro*, mimetizando a matriz extracelular (MEC) natural do tecido. Os *scaffolds* podem ser constituídos de materiais sintéticos ou naturais dependendo do uso pretendido. Como polímero sintético promissor, o acetato de celulose (CA) tem se mostrado cada vez mais atrativo. O AC é derivado de um polímero natural e é biocompatível, biodegradável, não irritante e não tóxico. Além disso, possui excelentes propriedades mecânicas para potenciais aplicações, por exemplo, como filmes, membranas, *scaffolds* e dispositivos de administração de medicamentos, além do baixo custo da matéria prima e alta disponibilidade (TSIAPLA, *et.al*, 2018). A técnica de obtenção de *scaffolds* para a engenharia de tecidos depende quase inteiramente das propriedades de superfície e da função proposta para este material. Dentre as técnicas de produção a eletrofiação tem se mostrado vantajosa e versátil sendo particularmente interessante, pois mimetiza a matriz extracelular produzindo *scaffolds* com alta área superficial, excelentes propriedades mecânicas, alta porosidade e boa distribuição de poros.

O presente trabalho consistiu da produção e caracterização de matrizes tridimensionais de acetato de celulose. A produção das matrizes foi realizada **por meio da** técnica de eletrofiação e a morfologia e as propriedades físico-químicas foram avaliadas. Foi realizada a cultura de células musculares com o objetivo de avaliar a potencial aplicação desse material como *scaffold* para produção de *clean meat*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Sintetizar e caracterizar matrizes tridimensionais de acetato de celulose utilizando a técnica de eletrofiação.

2.2 Objetivos Específicos

- **Sintetizar** um *scaffold* de nanofibra constituído de acetato de celulose a partir da técnica de eletrofiação;
- Avaliar a viabilidade das células C2C12 cultivadas no *scaffold* produzido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A engenharia de tecidos

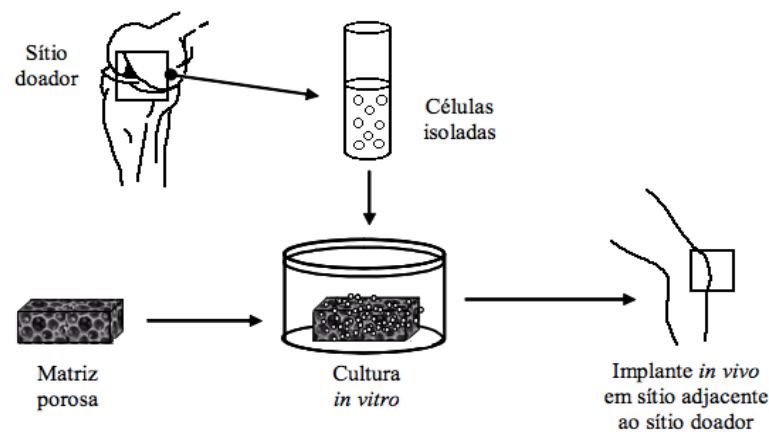
A engenharia de tecidos é parte do campo pertencente à medicina regenerativa e abrange desde estudos a nível molecular da genética e biologia até a engenharia de um órgão complexo. Historicamente o objetivo tem sido aplicar os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função de um tecido ou de um órgão inteiro (WOBMA *et al.*, 2016). Apesar de serem campos complementares, ainda permanece uma dificuldade para distinguir o conceito de engenharia de tecidos *versus* medicina regenerativa. Pode-se então realizar uma definição mais específica em que a engenharia de tecidos é o campo da ciência responsável pela produção e utilização de biomateriais biodegradáveis sintéticos ou naturais, semeados com células vivas e que visa regenerar ou mimetizar a forma ou a função de um tecido. Dessa forma, entende-se que a engenharia de tecidos fornece um conjunto de ferramentas que podem ser usadas para executar a medicina regenerativa. Contudo, não necessariamente todo procedimento da medicina regenerativa vale-se de recursos criados a partir da engenharia de tecidos (SHARPLES, F. E. *et al.*, 2003; LANZA, R. *et al.*, 2007).

A engenharia de tecidos decorre então de uma multidisciplinariedade de áreas envolvidas e pode recorrer ao conhecimento adquirido nos campos da biologia celular e de células-tronco, bioquímica, engenharia e biologia molecular, aplicando-os para a obtenção de novos materiais e desenvolvimento de novas técnicas (VACANTI, C. A. *et al.*, 2007). De forma geral, os desafios da área se concentram exatamente nos pontos que tangem a compreensão do comportamento celular e suas necessidades tanto quanto na fabricação de materiais apropriados para dar suporte as células.

Para o desenvolvimento de tecidos *in vitro* são necessários três elementos: (i) células, (ii) suporte tridimensional e (iii) sinalizadores químicos. O uso de células é necessário para produzir matrizes semelhantes à do tecido nativo. Os métodos datados na literatura que obtiveram maior sucesso basearam-se na utilização de uma linhagem de células primárias, ou seja, retiradas do próprio paciente ou animal e usadas em conjunto com *scaffolds*. No entanto, essa estratégia tem limitações, devido à natureza invasiva da coleta de células e ao potencial de as células estarem em estado de doença. Portanto, a atenção tem se concentrado no uso de células-tronco, incluindo células-tronco embrionárias (ES), células-tronco mesenquimais da

medula óssea (BM-MSCs) e células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical (UC-MSCs) (HOWARD, D. *et al.*, 2008). Já o segundo ponto crucial está vinculado a questões da engenharia de materiais e construção do suporte para a cultura de células *in vitro*, incluindo a necessidade da avaliação das propriedades mecânicas gerais, qualidade estrutural e geometria tridimensional do dispositivo. A conservação das características mecânicas e da geometria tridimensional após implantação de um dispositivo, por exemplo, permite manter espaço geométrico suficiente para futura ocupação pelo tecido vivo em formação (COELHO, 2003). A Figura 1 ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica da engenharia de tecidos para aplicações médicas. (por exemplo)

Figura 1- Esquema geral de criação de um dispositivo implantável baseado nas técnicas de engenharia de tecidos



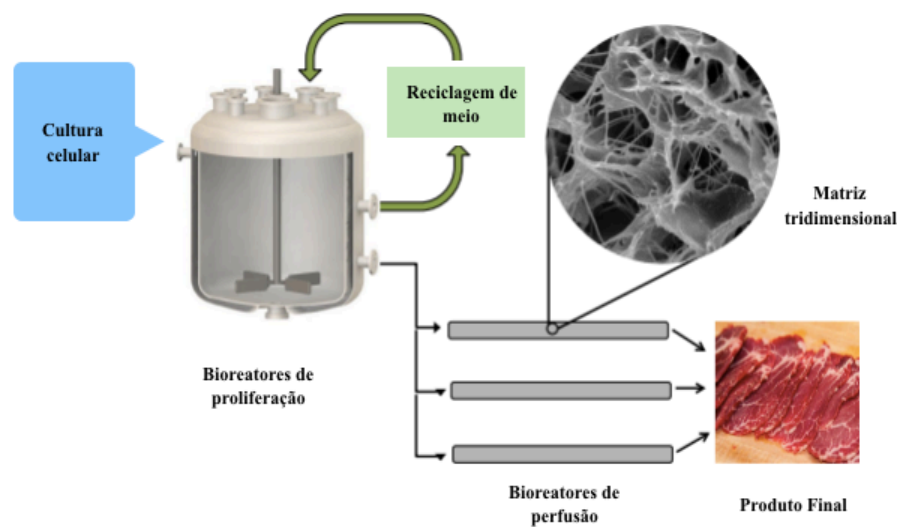
Fonte: COELHO, M (2003)

De forma geral, células são retiradas de tecidos adjacentes ao sítio com o defeito ósseo ou o qual deseja-se mimetizar. Dispositivos são construídos a partir dessas células quando estas finalizam seu desenvolvimento em uma estrutura tridimensional porosa bioabsorvível, resultando no que se pode chamar de "compósito". Esse dispositivo pode ser implantado no local que necessita recuperação (COELHO, 2003).

Ainda no que tange a aplicação do conjunto de técnicas da engenharia de tecidos o setor de *clean meat* ou carne limpa tem ganhado notoriedade. Recentemente, cientistas perceberam que, talvez, utilizando técnicas tradicionais de cultura de células seria possível cultivar células musculares *in vitro* para consumo, produzindo carne animal. A intensificação de estudos nesse campo a partir de 2006 levou ao desenvolvimento de uma pré concepção do que seria necessário

para produzir carne *in vitro* sob condições ideais. Essas etapas consistiriam na extração de células tronco ou células musculares de um animal **por meio de** um procedimento de biópsia, proliferação celular na presença de meios de cultura e fatores de crescimento, inserção das células proliferadas em plataformas de cultivo contendo *scaffolds* ideais e por fim, embalagem e distribuição. A Figura 2 **representa** o desenvolvimento idealizado da técnica da engenharia de tecidos para aplicação *clean meat*.

Figura 2 - Esquema geral da aplicação da engenharia de tecidos na indústria de clean meat



Fonte: Adaptado de SPETCH, L, LEGALLY, C (2017)

3.2 Polímeros para engenharia de tecidos

Especialmente para a engenharia de tecidos é importante compreender os conceitos de polímeros biodegradáveis, bioabsorvíveis e os processos de bioerosão. Os polímeros biodegradáveis são aqueles que sofrem degradação macromolecular e dispersão *in vivo* no organismo, mas os seus produtos e subprodutos de degradação permanecem nos tecidos durante bastante tempo (COELHO, 2003). Os polímeros biodegradáveis aplicados a engenharia de tecidos necessitam obedecer a parâmetros mais estritos onde não somente o polímero em si deve ser biocompatível, mas também os seus produtos de degradação visando não desencadear resposta inflamatória intensa. Esses polímeros podem ser provenientes de fontes naturais renováveis como milho, celulose, batata, cana-de-açúcar, podem ser sintetizados ou mesmo

serem provenientes do petróleo, por exemplo as policaprolactonas, as poliesteramidas, os copoliésteres alifáticos e os copoliésteres aromáticos (BRITO *et al.*, 2007).

Os polímeros bioabsorvíveis são materiais e dispositivos sólidos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem que ocorra necessariamente a clivagem da cadeia macromolecular ou redução de massa molecular. Os materiais poliméricos que apresentam degradação, diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo* sendo eliminados por rotas metabólicas do organismo sem efeitos colaterais residuais são chamados de biorreabsorvíveis (NASCIMENTO, *et.al.*, 2016). Grandes variedades de polímeros biorreabsorvíveis vêm sendo utilizadas em sistemas biológicos pela indústria, sendo que os mais tradicionais são os o poli(L-ácido lático) (PLLA), o poli(D-ácido lático) (PDLA), o poli(DL-ácido lático) (PDLLA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e a policaprolactona (PCL). Em seu processo de degradação, o polímero é quebrado em unidades menores por hidrólise simples e os produtos de sua decomposição podem ser eliminados do corpo por vias metabólicas como a via do ciclo do ácido cítrico ou diretamente por excreção renal.

Além de degradação, polímeros utilizados na engenharia de tecidos podem ser submetidos a processos erosivos e estes devem ser considerados, uma vez que também podem ocasionar perda de massa a dispositivos de forma homogênea, superficial ou degradação catastrófica. De acordo com estudos realizados por GIJPFERICH, 1996, existem diferentes formas de provocar a degradação de biopolímeros a partir de estímulos foto-, térmico-, mecânico e/ou químico. Todos os polímeros compartilham a propriedade de corroer sob a influência da luz UV ou radiação sendo importante se atentar ao processo de esterilização gama de dispositivos da engenharia de tecidos, evitando perdas significativas a nível molecular.

De forma geral, o mecanismo de erosão envolve a entrada água nas cadeias do polímero e que pode ser acompanhada de inchamento e expansão de volume. A entrada de água desencadeia a degradação química **por meio da** cisão da macromolécula polimérica, levando à geração de oligômeros e monômeros. A degradação progressiva provoca mudanças na microestrutura de polímeros sendo observada a formação de poros **por meio dos** quais os oligômeros e monômeros serão liberados para o meio. Concomitantemente, o pH dentro dos poros começa a ser afetado por esses produtos de degradação, que tipicamente possuem alguma funcionalidade ácido-base. Finalmente, oligômeros e monômeros são liberados levando à perda de massa sistêmica (GIJPFERICH, 1996). Os principais fatores que controlam o processo de erosão e degradação dos biomateriais poliméricos são a estabilidade química da cadeia

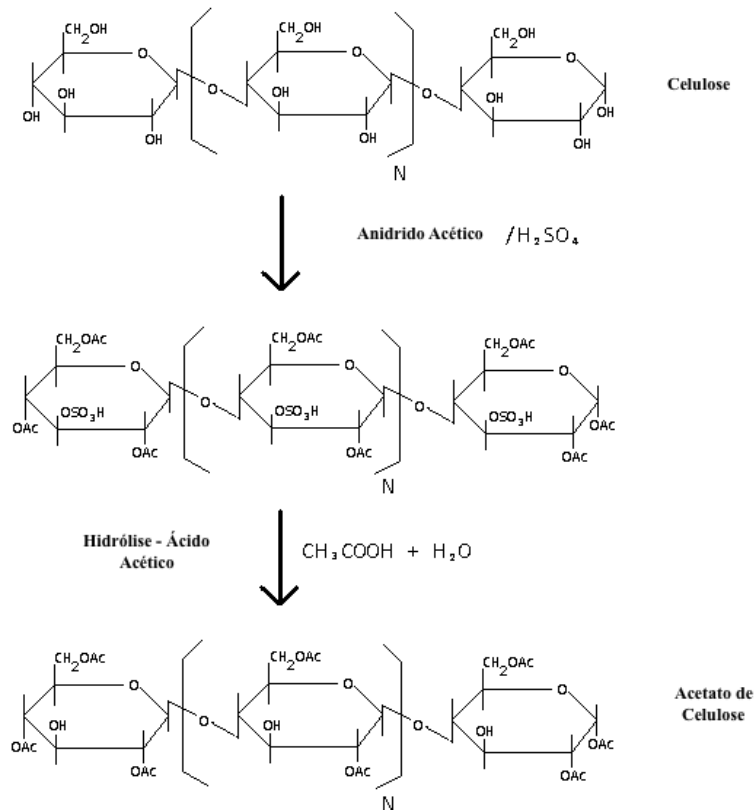
polimérica, a hidrofobicidade da unidade repetitiva (mero), a morfologia do polímero, a cristalinidade, a massa molar inicial do polímero e a presença de catalisadores e aditivos ou plastificantes. O ajuste da hidrofobicidade do sistema pode atuar evitando esse processo de absorção de água pelo polímero, reduzindo assim as taxas de hidrólise. Em polímeros hidrofóbicos a degradação é geralmente um fenômeno superficial com erosão lenta do polímero. Assim, qualquer tratamento que altere a hidrofobicidade do polímero permite o controle a ajuste da sua taxa de degradação (NASCIMENTO, *et.al.*, 2016).

3.2.1 Acetato de celulose

O acetato de celulose (AC) é um éster importante derivado da celulose. O acetato de celulose é caracterizado como um polímero neutro e com um baixo custo de aquisição, podendo ser utilizado para grandes variações aplicações que incluem produção de filmes e fibras, liberação controlada de fármacos, sensores e proteção de filmes ópticos e etc. Os filmes geralmente são feitos a partir de triacetato de celulose e as membranas e fibras a partir do acetato de celulose 2-2,5. Outro campo notável para a utilização do acetato de celulose é na síntese de partículas esféricas porosas, os chamados *beads* de acetato de celulose (FISCHER, S *et.al*, 2008).

O AC é obtido pela reação da celulose com anidrido acético (solvente), ácido acético (agente acetilante) na presença de ácido sulfúrico e ácido perclórico (catalisadores). O acetato de celulose é produzido pela substituição dos grupos hidroxila das unidades de glicose por grupos acetila. A solubilidade do acetato de celulose depende, entre outras coisas, do grau de substituição (GS), ou seja, do número médio de grupos acetila que substituem as hidroxilas por unidade glicosídica. O composto de acetato de celulose com grau de substituição de 2 - 2,5 é solúvel em acetona, dioxano e acetato de metila. A Figura 3 demonstra a reação geral de obtenção do acetato de celulose 2-2,5.

Figura 3 - Reação de obtenção do acetato de celulose, GS= 2- 2.5



Fonte: Adaptado de SHERWOOD.J *et.al*, 2015

O ácido acético é geralmente um bom solvente para o acetato de celulose com GS maior que 0,8. Segundo CERQUEIRA, D.E *et.al*, 2010 o grau de substituição é responsável por afetar a solubilidade, a biodegradabilidade e a cristalinidade do polímero. A celulose (GS = 0) é insolúvel na maioria dos solventes (S) mas ao aumentar o GS do acetato de celulose a solubilidade se altera, sendo que o GS=1 é solúvel em água, GS=2 é solúvel em tetraidrofurano ou acetona ou GS= 3 é solúvel em diclorometano ou clorofórmio.

3.3 *Scaffolds*

3.3.1 *Scaffolds* e a engenharia de tecidos

O objetivo da engenharia de tecidos é em suma, obter estruturas biológicas avançadas (órgãos e tecidos) a partir da combinação de células, *scaffolds* e estímulos elétricos, mecânicos ou químicos, visando estimular a regeneração de um tecido danificado ou geração de um tecido funcional. Um *scaffold* pode ser então definido nesse contexto como um suporte mecânico

temporário tridimensional e poroso que promoverá a adesão celular e a difusão de nutrientes (CHARTRAIN, N.A *et.al*, 2017).

Os *scaffolds* desempenham um papel crítico para o avanço da engenharia de tecidos, visto que para que células advindas de mamíferos possam se fixar, migrar e funcionalizar, as mesmas requerem quase em totalidade uma superfície sólida que desempenhe papel de substrato. Portanto, projetar tecidos **por meio da** mimetização de estruturas naturais dependerá da capacidade da produção dessas estruturas a partir de biomateriais com base em componentes sintéticos, naturais ou híbridos, que devem interagir com as células e a MEC da maneira mais previsível possível (SALTZMAN, W. M, 2004).

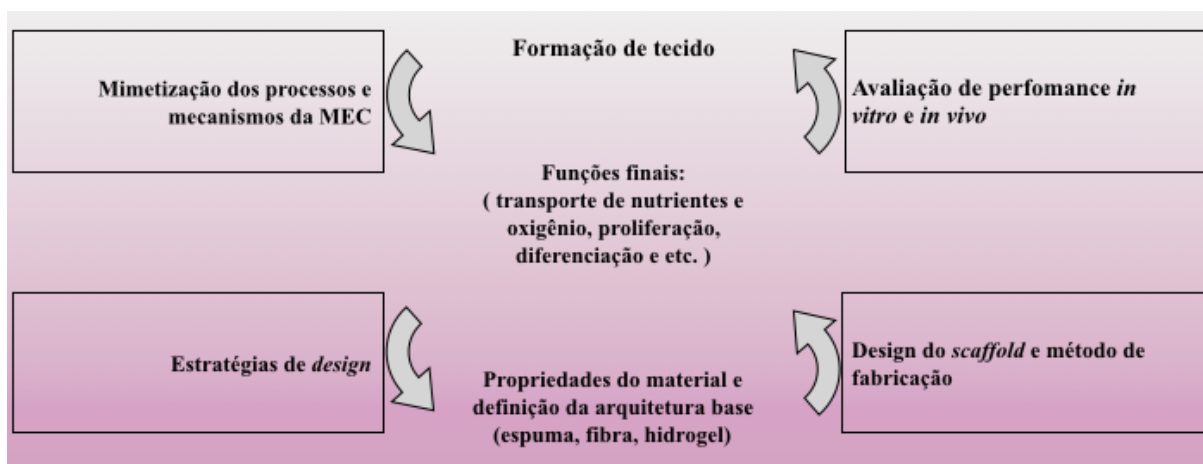
3.3.2 Requisitos de projeto

Uma tarefa central na concepção de *scaffolds* para engenharia de tecidos é entender as correlações entre as propriedades do material e as funções biológicas. Visando a geração de um ambiente biológico adequado que promova a adesão celular, a proliferação, a diferenciação e a vascularização, os *scaffolds* e seus materiais base devem atender a alguns requisitos básicos de projeto. Em termos do material utilizado para a fabricação dessas estruturas é amplamente conhecido da literatura que este deve ser biocompatível, biodegradável e os subprodutos da degradação devem ser não-tóxicos, além de idealmente incluir fatores de crescimento e de diferenciação para auxiliar a formação de tecido.

No que tange ao *scaffold* finalizado, as propriedades exibidas devem ser avaliadas não apenas no ambiente *in vitro*, mas também no contexto da função fisiológica do tecido (por exemplo, sob estimulação mecânica ou elétrica) e, finalmente, *in vivo*. De forma primária deve-se buscar um *design* de alta porosidade e poro-interconectividade, combinando valores de resistência mecânica e módulo de elasticidade compatíveis com a do tecido a ser mimetizado (CHARTRAIN, N.A *et.al*, 2017). Delimitar um comportamento mínimo esperado para o desempenho *in vivo* se torna mais complexo visto que tecidos vivos não são sistemas simples e lineares. Os papéis que estruturas presentes na MEC desempenham no sequenciamento de eventos biológicos por exemplo são específicos para cada tipo de célula e cineticamente complexos. Como consequência prática, a criação de *scaffolds* que mantenham uma combinação dinâmica de propriedades exibidas *in vitro* e *in vivo* (múltiplos fatores ambientais) podem impactar positivamente e profundamente o processo de formação de um dado tecido (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J, 2014). A Figura 4 demonstra de forma resumida as

correlações básicas entre os requisitos de projeto e as propriedades do *scaffold* para geração de tecido funcional.

Figura 4 - Relação entre as propriedades do material/ *scaffold* para geração de tecido funcional.



Fonte: Adaptado de LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J (2014)

3.3.2.1 Arquitetura de poros e transporte de massa

A porosidade do *scaffold*, o tamanho dos poros e a interconectividade são fatores importantes na manutenção da viabilidade celular e para prevenir a apoptose, ou morte celular. As geometrias resultantes de células individuais ou agregados celulares dentro dos poros dos *scaffolds* também são capazes de direcionar os eventos de proliferação, diferenciação e formação de tecido (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J. 2014). Verifica-se que quanto maior a porosidade, maior a quantidade de células que a estrutura tridimensional pode potencialmente acomodar, mas impacta diretamente na redução da resistência mecânica. YANG et al., 2001 mapeou em seu trabalho valores de porosidade efetivos para geração de alguns tipos de tecidos, encontrando valores em torno de 90 por cento para tecidos duros e entre 60-83,5 para tecidos moles. O tamanho ideal dos poros varia com a aplicação, por exemplo, entre 20-125 μm de diâmetro para regeneração da pele, entre 45-150 μm para a regeneração do tecido hepático e entre 100-400 μm para a regeneração óssea (OH et al., 2007). A interconectividade por sua vez permite o comportamento difusivo de nutrientes solúveis, fatores de crescimento e citocinas. As técnicas tradicionais de fabricação de *scaffolds* ainda não totalmente são capazes de controlar precisamente a geometria dos poros e, portanto, os fenômenos subjacentes de como a forma dos poros afetam a adesão e a viabilidade celular ainda não são compreendidos em totalidade (CHARTRAIN, N.A et.al, 2017).

Dentre as técnicas mais usadas atualmente para a produção de poros nos *scaffolds* podem ser ressaltadas três categorias principais: (1) processos de fabricação com adição de agentes porogênicos, (2) prototipagem rápida e (3) técnicas de fabricação de mantas fibrosas ou nanofibras. Na primeira categoria, materiais sólidos são incorporados a gases (ex. dióxido de carbono), líquidos (ex. água) ou outros sólidos (ex. parafina) e as misturas são processadas e depois fundidas ou extrudadas. Os agentes formadores de poros são removidos após a fabricação utilizando métodos como sublimação, evaporação e/ou fusão e a fase extraída é responsável pela geração dos poros na microestrutura do material. As técnicas atuais que utilizam esse princípio incluem lixiviação de partículas ou lixiviação salina, formação gasosa e liofilização (CHAN, B.P, LEONG, K.W, 2008). Na segunda categoria, estruturas porosas são fabricadas **por meio da** deposição rápida e programada de camadas de material e as técnicas atuais que utilizam esse princípio incluem estereolitografia, sinterização seletiva a laser, impressão 3D e modelagem por deposição fundida. Na terceira abordagem e que também será empregada neste trabalho a estrutura porosa é produzida utilizando-se de uma alta tensão ou energia térmica via técnicas de *eletrospinning*, *melt spinning* dentre outras.

3.3.2.2 Resistência mecânica

As propriedades mecânicas da matriz extracelular natural são de suma importância para conduzir funções macroscópicas do tecido (ex. suportar solicitações externas) e na regulação do comportamento celular via sinalização por mecanotransdução. No caso de aplicações médicas, como o papel principal do *scaffold* após a implantação é substituir temporariamente as principais funções mecânicas do tecido danificado, é essencial considerar o estado de carga fisiológica do tecido nativo (LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J. 2014). Para a reprodução de tecido animal para consumo humano (*Clean Meat*) os *scaffolds* devem apresentar valores de resistência mecânica suficientes para suportar as tensões cisalhantes advindas de equipamentos industriais de produção (ex. biorreatores) e módulo de elasticidade suficiente para suportar esforços de expansão advindos dos tecidos crescentes, mantendo seu *design* quando submetido a uma força de trabalho. Em ambas as aplicações, os suportes tridimensionais também devem permitir o manuseio sem a subsequente danificação da estrutura (ZOHORA, T.F, 2014).

3.3.2.3 Condutividade elétrica

Scaffolds responsivos a estímulos elétricos também são importantes para regular a adesão e a proliferação de células. Abordagens convencionais para fabricar estruturas tridimensionais com condutividade elétrica melhorada requerem algumas etapas chave que incluem o revestimento da superfície do polímero condutor ou o encapsulamento com particulados condutores. CHEN, X. et al, 2018 estudou o comportamento de *scaffolds* condutores elétricos produzindo-os a partir de um biomaterial abundantemente disponível, o algodão. Utilizando-se de técnicas de carbonização a alta temperatura (800 °C), modificação de superfície por oxidação e revestimento de polidopamina, notou-se uma melhora significativa da hidrofiliabilidade e citocompatibilidade das fibras. A estimulação elétrica acelerou a proliferação celular e a diferenciação das células nervosas.

3.3.3 Tipos de *scaffolds*

3.3.3.1 Estruturas tridimensionais descelularizadas

Reconhecendo o importante papel da MEC no direcionamento do comportamento celular e os inúmeros desafios associados a obtenção de *scaffolds* que reproduzam a complexidade do microambiente celular há um notável aumento no interesse da utilização de suportes tridimensionais que já contenham matriz extracelular naturalmente derivada. A técnica de engenharia de tecidos que permite a obtenção desses materiais é chamada de descelularização.

Scaffolds descelularizados são uma categoria de estruturas porosas obtidas **por meio de** etapas de tratamento químico, mecânico e/ ou biológico projetadas para extrair componentes celulares dos tecidos (ex. células nativas, DNA) enquanto idealmente causam mudanças mínimas na composição e arquitetura da MEC específica do tecido (YANG.Y, 2017). O objetivo da descelularização é extrair componentes antigênicos que desencadeiam uma resposta imune, preservando as propriedades bioquímicas, biomecânicas e biofísicas específicas da matriz extracelular. As estratégias de tratamento para descelularização geralmente utilizam-se de detergentes e/ou enzimas (SHAHINPOOR. M, SCHNEIDER, H.J, 2016). A MEC descelularizada pode então ser repovoada com as próprias células do paciente ou do animal para produzir um tecido personalizado.

Como vantagem dessa categoria de *scaffolds* tem-se a diversidade de materiais de partida que podem ser utilizados e seus formatos tais como órgãos, tecidos humanos, frutas, vegetais e etc. As desvantagens associadas a esses materiais estão no fato de que estruturas mais solúveis, como glicosaminoglicanos, fibronectina e / ou laminina são frequentemente diluídas e perdidas no processo de descelularização, além das preocupações de que a presença de detergente residual possa ter efeitos citotóxicos. Além disso, ainda segundo o trabalho desenvolvido por SHAHINPOOR. M, SCHNEIDER, H.J, 2016 frequentemente são relatadas limitações com relação a taxa de difusão de nutrientes dentro da estrutura o que demanda que os *scaffolds* descelularizados sejam processados na forma de folhas finas ou pequenos fragmentos.

3.3.3.2 Hidrogéis

Os *scaffolds* de hidrogéis são biomateriais hidrofílicos tridimensionais capazes de absorver e reter grandes quantidades de água sem ocorrer sua dissolução. Essa capacidade de inchar sob condições biológicas faz deles uma classe ideal de materiais para algumas aplicações biomédicas. A estrutura 3D é mantida por meio de interações físicas (entrelaçamento de cadeia, interações iônicas, interações hidrofóbicas e ligação de hidrogênio) ou ligações covalentes. Hidrogéis produzidos utilizando polímeros naturais incluem proteínas como colágeno e gelatina, assim como polissacarídeos como quitosana ou GAGs derivadas da MEC (SHAHINPOOR. M, SCHNEIDER, H.J, 2016).

Devido ao seu alto teor de água, os hidrogéis apresentam características como alta biocompatibilidade, permeabilidade ao oxigênio, nutrientes e outros metabólitos solúveis em água. Os *scaffolds* de hidrogel também oferecem o fácil controle de parâmetros estruturais como o teor de água, ajuste de arquitetura, além de se assemelharem aos tecidos moles naturais mais do que qualquer outro tipo de biomaterial polimérico. A maioria dos *scaffolds* de hidrogel são injetáveis e podem ser produzidos por fotopolimerização sob condições não agressivas a células vivas (ZHU, J *et.al*, 2011). Outra técnica muito utilizada para a obtenção dessas estruturas é a emulsificação e o processo envolve a agitação de uma mistura multifásica para gerar pequenas gotas aquosas de precursores de hidrogel dentro de um meio hidrofóbico (EL-SHERBINY, I.M, 2013). As desvantagens associadas ao uso de *scaffolds* de hidrogéis estão relacionadas principalmente com a limitação de aplicação pois são frequentemente associados a uma baixa resistência mecânica como consequência da grande quantidade de cadeias poliméricas separadas por moléculas de água.

3.3.3.3 Nanofibras poliméricas

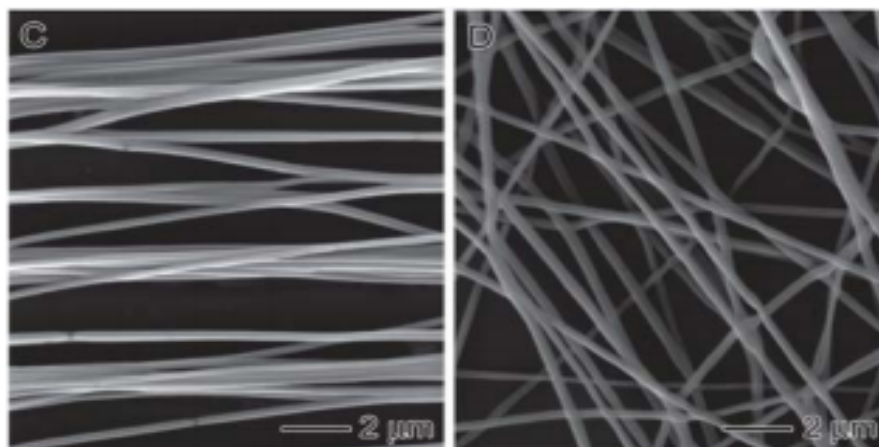
Os materiais nanofibrosos são extremamente importantes e frequentemente escolhidos como ponto de partida na engenharia de tecidos para a construção de *scaffolds*. A mimetização da matriz extracelular nativa é essencial para alcançar a regeneração funcional dos tecidos. Nesse contexto, a morfologia nanofibrosa tem sido uma das mais amplamente investigadas, uma vez que mimetiza a rede de colágeno fibrilar da matriz extracelular *in natura*. Os *scaffolds* de nanofibra são caracterizados por uma elevada área superficial, alta permeabilidade ao oxigênio e nutrientes que combinados com sua estrutura microporosa favorecem a adesão, proliferação, migração e diferenciação (BHATTARI, 2004). As estruturas nanofibrosas também demonstraram uma resposta mecânica superior em comparação com o desempenho de hidrogéis devido ao alinhamento das cadeias poliméricas na estrutura.

Os *scaffolds* nanofibrosos podem ser produzidos com uma vasta gama de materiais naturais (ex. colágeno, quitina, amido, alginato e etc.) e sintéticos (ex. PLA, PLLA, PVA, Poly- ϵ -caprolactona) utilizando-se de técnicas versáteis de fabricação como o *electrospinning*, evaporação do solvente e separação de fases. Segundo LANZA, R. LANGER, R., VACANTI, J. 2014, vantagens significativas foram relatadas para o uso de nanofibras sintéticas, que mimetizaram com eficácia as principais características da MEC, demonstraram comportamento mais padronizável do que os materiais naturais além de terem demonstrado maior viabilidade de reprodução em escala do que os estruturas descelularizadas. O autor ressaltou ainda a promissoriedade da co-fiação de diferentes materiais (sintéticos e naturais), permitindo a criação de topografias superficiais complexas, maior porosidade, aumento das atividades biológicas e ajuste das propriedades mecânicas resultantes.

As técnicas desenvolvidas atualmente permitem a produção de nanofibras depositadas aleatoriamente e/ou alinhadas. REIGIER, J. e HUNEULT, M. A, 2006 estudaram o impacto da diferença de orientação em fibras de PLGA implantadas na região do tendão. O material produzido pelos autores era composto por porções de fibras alinhadas e porções de fibras depositadas aleatoriamente, conforme Figura 5. Como resultado, a porção alinhada mimetizou com mais eficácia o alto nível de alinhamento das fibras de colágeno em um tendão e apresentou valores de resistência mecânica de 142,5 MPa enquanto o aleatório apresentou valores em torno de 52,7 MPa. O autor também avaliou a morfologia de células vivas em ambas as configurações e observou que as células semeadas na porção aleatória adquiriram formas irregulares e

orientação aleatória. Em contraste, as células semeadas na porção alinhada do material adquiriram formas alongadas e orientação na direção do alinhamento das fibras.

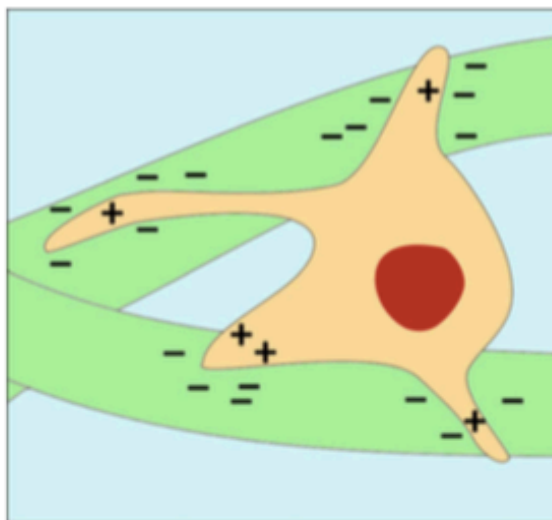
Figura 5 -MEV das nanofibras de PLGA com estrutura orientada (c) e aleatória (d)



Fonte: REIGIER, J. e HUNEAULT, M. A (2006)

Outra categoria de nanofibras extremamente promissoras são as fibras piezoelétricas. É mapeado na literatura que estímulos elétricos são essenciais para a sobrevivência e adesão celular visto que em um organismo vivo campos elétricos de magnitude até 500 mV mm^{-1} são endógenos, ou seja, originam do próprio interior do organismo. Esses campos elétricos naturalmente gerados são originados de espécies iônicas dissolvidas no interior da MEC, cuja movimentação dão origem a potenciais elétricos. SHAHINPOOR, M, SCHNEIDER, H.J, 2016, demonstrou em suas pesquisas que a aplicação de um campo elétrico em uma célula produz uma mudança no potencial de sua membrana celular, que por sua vez resulta em uma modificação do fluxo de íons **por meio da** membrana celular, conforme Figura 6.

Figura 6 - Esquema de indução de mudança no potencial da membrana celular a partir de nanofibras piezoelétricas.



Fonte: SHAHINPOOR. M, SCHNEIDER, H.J (2016)

Essa indução de carga elétrica na membrana celular pode resultar ainda no estímulo a diferenciação celular. Tal comportamento pode ser conseguido **por meio da** inclusão de partículas piezoelétricas poliméricas (ex. **PLLA, PVDF**) ou cerâmicas (CaTiO_3) em matrizes nanofibrosas.

3.4 Eletrofiação

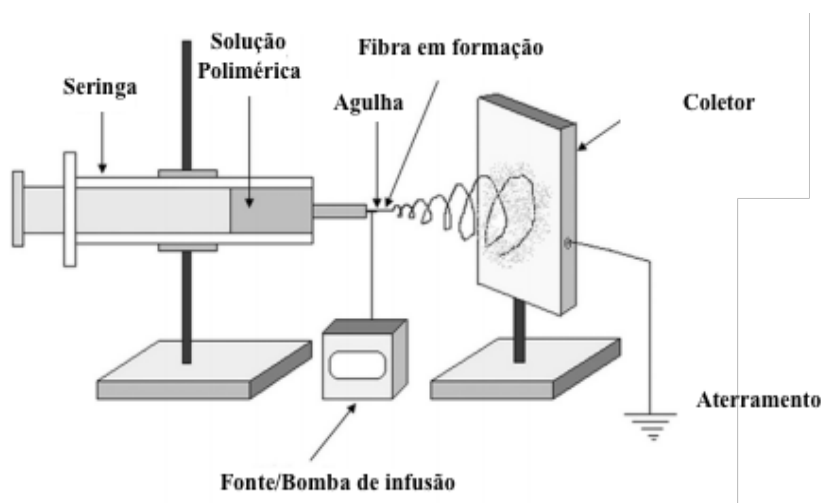
3.4.1 Técnica de eletrofiação

Com o grande avanço nos campos da nanotecnologia e das nanoestruturas a produção de matrizes tridimensionais a partir da técnica de eletrofiação tem se tornado cada vez mais interessante. A técnica de eletrofiação ou *electrospinning* apresenta vantagens consideráveis sob outras metodologias conhecidas para a obtenção de nanofibras tais como evaporação do solvente ou separação de fases, visto que é possível obter uma alta razão entre área superficial por volume além de permitir o controle sobre a espessura, composição e porosidade das malhas a partir de uma modificação simples do *setup* da máquina, tornando-a atrativa do ponto de vista comercial. Dentre as áreas mais beneficiadas pelo uso da técnica estão os setores médicos e atualmente verifica-se o uso do *electrospinning* em testes piloto de setores altamente inovadores como o campo da *clean meat*.

De acordo com o estudo de SHAIDNER, A *et.al*, 2015 cataloga-se que até o ano de 2015 as nanofibras obtidas pela técnica eletrofição foram preparadas testando-se apenas cerca de 100 tipos de polímeros diferentes de origens sintéticas e/ou naturais. Todas estas nanofibras foram preparadas utilizando solvente ou *melt spinning*. Dessa forma, mesmo com o uso difundido da técnica de eletrofição, a compreensão desse método ainda é muito limitada.

O processo propriamente dito de produção das fibras a partir da eletrofição é baseada no princípio físico de aplicação de um alto potencial elétrico capaz de induzir forças que estiram as moléculas poliméricas presentes em uma solução resultando na formação da fibra. Os componentes básicos do equipamento de eletrofição incluem uma fonte de alta tensão, uma agulha de diâmetro pequeno, um coletor, uma bomba de infusão e um tubo capilar com a solução polimérica, como apresentado na Figura 7.

Figura 7- Vista esquemática de um equipamento de eletrofição



Fonte: Adaptado de KATTI, D.S, ROBSINSON, K.W *et.al* (2004)

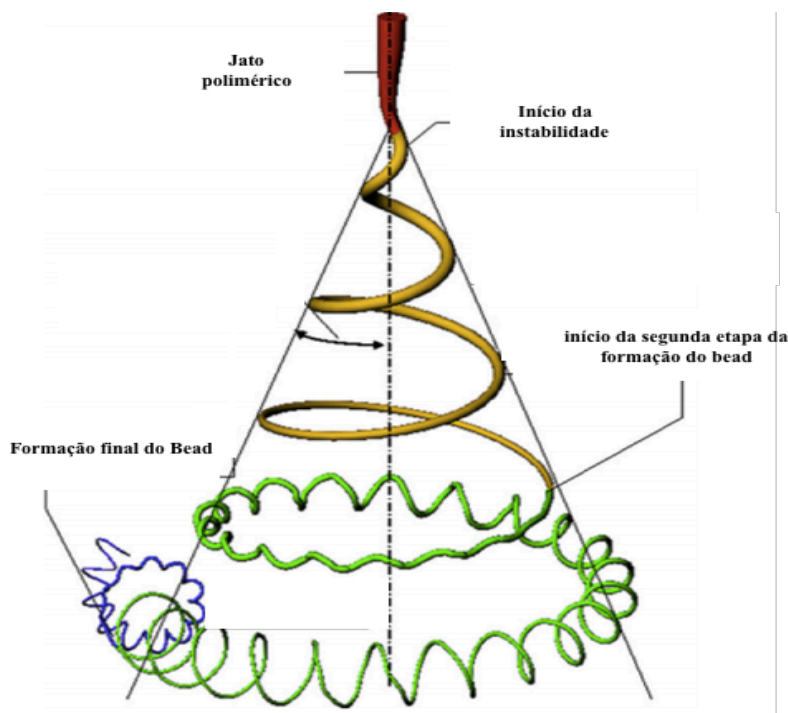
No início do processo uma fonte de alta tensão é utilizada para gerar um alto potencial elétrico entre a solução polimérica e o coletor (VENTURELI, R.B, 2017). O aumento no potencial elétrico leva inicialmente ao alongamento da superfície hemisférica da solução na ponta do tubo capilar para obter uma forma cônica conhecida como cone de Taylor. Um aumento adicional faz com que o potencial elétrico atinja um valor crítico, no qual ele supera as forças de tensão superficial presente na solução polimérica provocando a formação de um jato que é expelido da ponta do cone de Taylor. As forças presentes no sistema são responsáveis

pelo estiramento das cadeias poliméricas da solução resultando na formação de fibras com orientação aleatória e que podem ser recolhidas em um coletor metálico aterrado estacionário ou rotativo (KATTI, D.S, ROBSINSON, K.W *et.al*, 2004).

3.4.2 Parâmetros de equipamento

É mapeado na literatura que existem alguns fatores críticos que afetam o processo de eletrofiação e devem ser idealmente controlados. Esses fatores podem ser classificados como parâmetros de eletrofiação, de solução e parâmetros ambientais. Os parâmetros de eletrofiação incluem a tensão aplicada (kV), a distância entre a agulha e o coletor, a vazão da solução e diâmetro da agulha. Os parâmetros da solução incluem o solvente, a concentração do polímero, a viscosidade e a condutividade da solução. Os parâmetros ambientais incluem temperatura e umidade relativa do ar. No que se refere as influências advindas dos valores de tensão aplicados, HEIDER.A *et.al*, 2015 descreveu em seu estudo que uma redução do diâmetro médio das nanofibras depositadas é verificado quando o valor de tensão atribuído ultrapassa o ponto crítico do polímero. Como consequência é gerado uma diminuição do cone de Taylor e um aumento da velocidade do jato liberado, provocando a instabilidade do sistema e fazendo com que o jato se quebre em gotículas resultando na subsequente formação de *beads*. A Figura 7 ilustra o efeito da instabilidade do sistema sob a cadeia polimérica em estiramento.

Figura 8 - Esquema da formação de *beads* por instabilidade do sistema de eletrofiação



Fonte: Adaptado de HEIDER.A *et.al*, 2015

O aumento da vazão da solução polimérica acima do valor crítico também pode levar à formação de *beads*. HEIDER.A *et al*, 2015 observou que na eletrofiação do poliestireno a vazão de saída de 0,10 mL / min levou a formação de *beads*. No entanto, quando a vazão foi reduzida para 0,07 mL/ min, formaram-se nanofibras sem defeitos estruturais. Quando o processo foi avaliado em termos da distância da agulha e do coletor, um grupo numeroso de pesquisadores concluíram que nanofibras defeituosas e de grande diâmetro são formadas à medida que a distância entre ambos diminui. Apesar das vantagens explícitas, a técnica de eletrofiação encontra algumas limitações práticas que demandam de novos estudos na área como uma possível toxicidade dos resíduos químicos nas fibras pós-processamento e a baixa capacidade produtiva dos equipamentos atuais (KHORSHIDI. S *et.al*, 2015).

3.5 Análise de oportunidades de mercado

Com o progresso tecnológico e o aumento dos investimentos no campo de biomateriais, pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de *scaffolds* que suportam o desenvolvimento de tecidos artificiais e tratamento de lesões cresceram consideravelmente e são responsáveis por

avanços significantes no setor de saúde. De acordo com o estudo de mercado performedo pela empresa Grand View Research, o mercado global de *scaffolds* para aplicações em medicina regenerativa atingiu USD 295 milhões em 2016 e poderá atingir USD 1,5 bilhões até 2024, crescendo a uma taxa anual de 43,9% de 2016 a 2021. Ainda segundo o relatório, espera-se o segmento de produção de nanofibras apresente a maior taxa de crescimento anual nos próximos anos. Além do campo de medicina regenerativa, a empresa Biomimetic Solutions avaliou que as oportunidades no mercado global de *scaffolds* para *clean meat* podem chegar a USD 332 milhões em 2026 (FERREIRA, R.V *et.al*, 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção das nanofibras de acetato de celulose

4.1.1 Materiais

Para a produção das nanofibras empregou-se o acetato de celulose massa molar (Mn) 30.000 g/mol da marca Aldrich Chemistry como polímero base para a construção do *scaffold*, a Dimetilformamida (DMF) - $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$, P.M 73,09 da marca Chemistry e a Acetona- $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ da marca VETEC (Sigma Aldrich), M.M 58.08 g/mol **foram utilizados como solvente.**

4.1.2 Procedimento

Para a obtenção das nanofibras de acetato de celulose baseou-se em trabalhos anteriores, cujos parâmetros ótimos para produção da solução do mesmo (12 wt%) e a as condições do electrospinning foram estabelecidas. (SILVA, A.B *et.al*, 2015). Para o preparo da solução, pesou-se 0,96 g do pó do polímero. **Acrescentou-se acetona e DMF (dimetilformamida) em uma proporção de 3:1.** O frasco contendo a solução foi vedado com papel alumínio e parafilme e deixada no agitador magnético por 2h a temperatura de 30°C.

Em uma segunda etapa, ajustou-se o equipamento de eletrofiação para iniciar a operação com a solução preparada anteriormente. Para preparar o substrato a ser colocado no coletor do equipamento, cortou-se uma folha de alumínio nas dimensões de 10.5 mm de largura, 30 mm de comprimento e 0.08 mm de espessura. Essa folha de alumínio foi acoplada no coletor giratório do equipamento e a solução de acetato foi vertida na seringa do equipamento de eletrofiação, verificando-se se o seu orifício se encontrava voltado para o meio da folha de alumínio. A máquina de eletrofiação foi ajustada para a voltagem de 15 kV, rotação 380 rpm e o processo foi iniciado. O ciclo de produção da fibra foi de 3 horas e verificou-se constantemente se o orifício da agulha presa à seringa estava entupida visando não interromper o processo de formação das fibras. As fibras produzidas sob a folha de alumínio foram cortadas, esterilizadas, identificadas e armazenadas em uma pasta de plástico para posteriores caracterizações.

4.2 Caracterizações do Material

4.2.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As nanofibras de acetato de celulose produzidas pelo método de *electrospinning* (15 Kv) e o acetato de celulose foram analisados utilizando-se a técnica de transmitância. Os resultados foram obtidos utilizando-se o equipamento *Shimadzu*, modelo *IRPrestige-21* na faixa de comprimento de onda de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas a grupos químicos.

4.2.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Utilizou-se o analisador térmico *Shimadzu DSC-60* para se investigar o comportamento térmico das amostras. Para este ensaio, amostras do material foram submetidas a dois ciclos de aquecimento com o primeiro entre 35 e 350°C . A rampa de aquecimento utilizada seguia a taxa de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sob uma atmosfera de nitrogênio.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi utilizada para se verificar a qualidade da formação das nanofibras, regularidade da superfície da amostra, se houve a formação de *beads* que poderiam prejudicar sua aplicação e verificar a presença de porosidade no material. O equipamento utilizado para esta análise foi o *Shimadzu* modelo *SSX-500*, com a utilização de uma tensão de 15 kV. Para avaliar a distribuição do tamanho de raio das fibras, utilizou-se o software *ImageJ*.

4.3 Avaliação da adesão, morfologia e viabilidade celular

Visando a validação biológica das nanofibras de acetato de celulose realizou-se testes *in vitro* para se avaliar a biocompatibilidade do material. Utilizou-se o ensaio colorimétrico de MTT e a microscopia eletrônica de transmissão para se verificar a viabilidade, adesão, morfologia, crescimento e diferenciação das células.

4.3.1 Preparo do *scaffold* para o Cultivo Celular

Para o preparo e posterior realização destas caracterizações, amostras das nanofibras seguiram um protocolo de cultivo celular. Estas foram cortadas e inseridas em placas de cultivo celular de 24 poços, nos quais 12 foram preenchidos com os *scaffolds* e o restante foram utilizados como controles positivo e negativo dos testes. Cada amostra foi estudada em triplicata e cada estudo realizado em duplicata.

A fabricação do meio de cultura contou com a utilização de: Dulbecco's Modifiel Eagle's Medium (DMEM) high glucose (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), e 1% de anti-anti (Gibco). O meio de diferenciação foi constituído de: Dulbecco's Modifiel Eagle's Medium (DMEM) high glucose (Gibco), suplementado com 2% de soro de cavalo (Gibco), e 1% de anti-anti (Gibco). Foi empregada uma linhagem de mioblastos imortalizados de camundongos (C2C12) para serem cultivados nos *scaffolds*.

4.3.2 Cultura Celular

As nanofibras foram previamente hidratadas sendo submersas em 200 μL do meio de cultura durante 24 horas à 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 . Em seguida esta solução foi removida para a adição das células. 150 μL de meio de cultura contendo 8×10^4 células foram adicionados a cada poço da placa contendo o *scaffolds*. Os *scaffolds* e as células foram incubados por 2 horas a 37°C e sob atmosfera de 5% CO_2 , em seguida o volume dos poços foi completado até 500 μL com meio de cultura. As células foram mantidas nestas condições durante 48 horas e 7 dias. A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT, a adesão e morfologia foram avaliadas por MEV.

4.3.3 Ensaio Colorimétrico (MTT)

Para a realização deste teste utilizou-se as células coletadas após a centrifugação do *scaffold* semeado com as mesmas em tempos diferentes de incubação: 2 e 7 dias. Em seguida as mesmas foram fixadas para serem incubadas com a solução de MTT. Para este ensaio foi utilizado o reagente para MTT (Invitrogen) sob uma concentração de 5 mg/mL, de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas nesta solução durante 2 horas sob uma temperatura de 37°C sob atmosfera com 5% de CO_2 para a formação dos cristais de formazan. Os cristais formados de cada amostra foram posteriormente dissolvidos em poços separados de

1 mL contendo ácido isopropanoico. Por fim cada amostra foi identificada e transferida para uma placa com 96 poços e enviadas para a análise final no leitor de ELISA (Biotek), no qual foi avaliado a absorvância para o comprimento de onda igual à 595 nm referente aos cristais de formazan dissolvidos. A quantidade destes cristais é proporcional ao número de células viáveis e os resultados foram obtidos pela análise em triplicata para cada amostra.

4.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura das nanofibras (MEV)- Caracterização estrutural

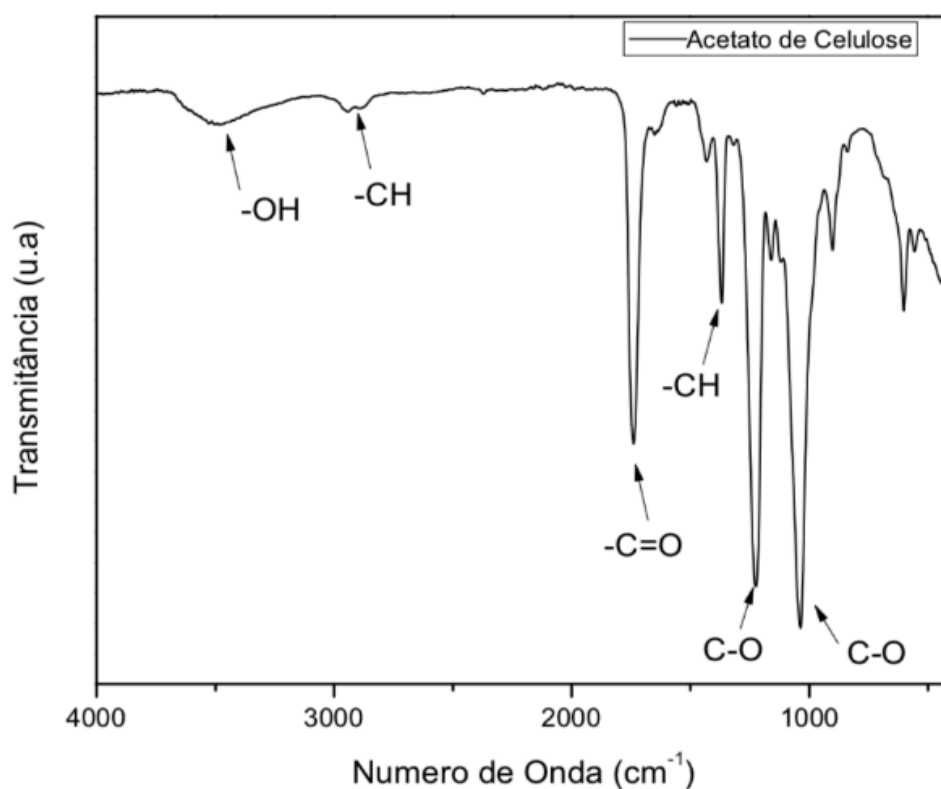
As amostras foram preparadas adicionando-se uma solução de 2,5 % de glutaraldeído durante 24 horas para fixa-las no *scaffold*, seguido por uma desidratação gradual das amostras em soluções de etanol com concentrações de 35%, 50%, 70%, 85%, 95% e 100% durante 15 minutos. Após a desidratação foi realizada a secagem supercrítica das amostras utilizando-se o equipamento Bal-tec / Leica. As imagens foram obtidas utilizando-se um equipamento modelo *Shimadzu SSX-5000*, e as análises foram feitas em triplicata para as amostras com 2 e 7 dias de incubação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR)

O espectro na região do infravermelho obtido para as nanofibras produzidas está representado na Figura 9.

Figura 9 - Espectroscopia para a amostra de acetato de celulose



Fonte: Autora

Os modos vibracionais dos grupos identificados em FTIR para a nanofibra de acetato de celulose produzida encontram-se representados na tabela 1.

Tabela 1 - Modos vibracionais dos grupos identificados para a amostra de nanofibra

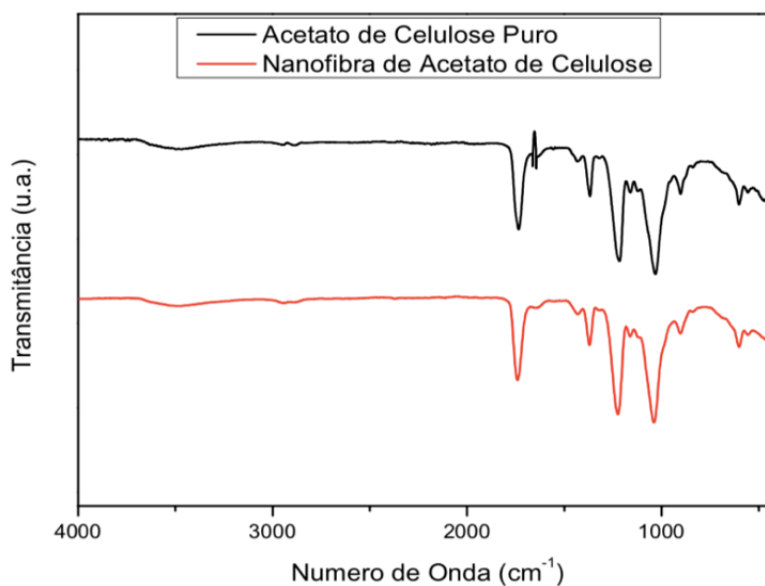
Identificação	Grupo Característico	Número de Onda (cm ⁻¹)	Referência
I	Ligação -OH	3496	(XUEZZHONG, H.,2017)
II	Ligação C-H	2967-2876	(XUEZZHONG, H.,2017)
III	Ligação C=O	1739	(BARUD, H.S., <i>et.al.</i> 2008)
IV	Ligação C-H	1370	(BARUD, H.S., <i>et.al.</i> 2008)
V	Ligação C-O	1224	(BARUD, H.S., <i>et.al.</i> 2008)
VI	Ligação C-O	1032	(XUEZZHONG, H.,2017)

Fonte: Autora

A partir da espectroscopia infravermelha com transformada de Fourier (FTIR) foram identificadas as bandas de vibração para a nanofibra produzida e posteriormente comparadas com as nanofibras de AC obtidas por outros autores e datadas na literatura (Tabela 1). Além disso, não foram observados picos que indicassem a presença de acetona e DMF residual. O acetato de celulose possui uma cadeia carbônica derivada da reação de acetilação da celulose, onde grupos acetil são incorporados a estrutura (CH₃-C=O).

Visando complementar a caracterização química do material, realizou-se uma comparação entre os espectros vibracionais obtidos para o pó de acetato de celulose utilizado na fabricação do material e da nanofibra de AC (Figura 10).

Figura 10 - Espectroscopia comparativa entre a amostra de acetato de celulose P.A. e a nanofibra



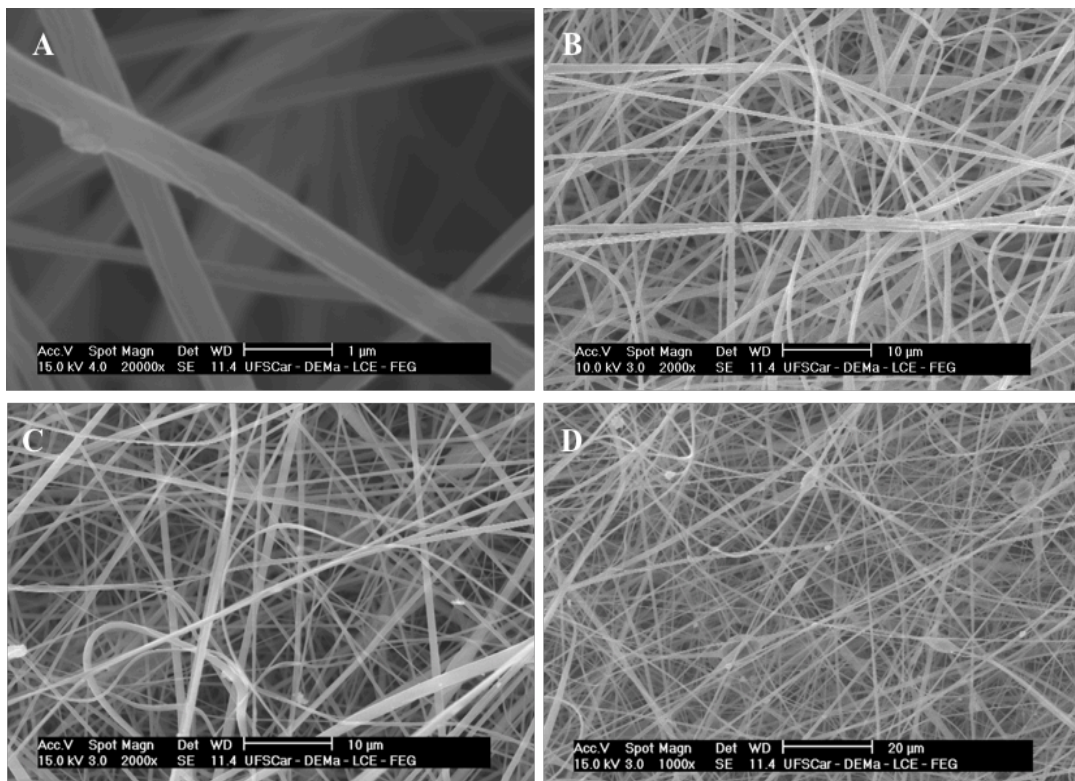
Fonte: Autora

Durante o procedimento experimental não foram propostas alterações ou modificações na estrutura química do acetato de celulose, porém para validar a eficácia do método é necessário avaliar a inexistência de picos vibracionais que indiquem a presença de DMF e acetona residuais. KHORSHIDI. S *et.al*, 2015 descreveu em seu trabalho que a técnica de eletrofiação pode encontrar algumas limitações práticas como uma possível toxicidade advindas de resíduos químicos nas fibras pós-processamento. De acordo com relatório emitido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 2011 o DMF é classificado como uma substância tóxica e indutora do fenômeno de apoptose ou morte celular. As bandas vibracionais identificadas para a nanofibra em comparação com o pó de acetato de celulose foram similares e apontam inicialmente para uma ausência de grupos químicos referentes aos solventes utilizados.

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (mudar de lugar- dsc vem primeiro)

As imagens obtidas **por meio da** microscopia eletrônica de varredura estão representadas pelas letras A, B, C e D na Figura 11.

Figura 11 - Microscopia de varredura eletrônica para a amostra de nanofibra de AC

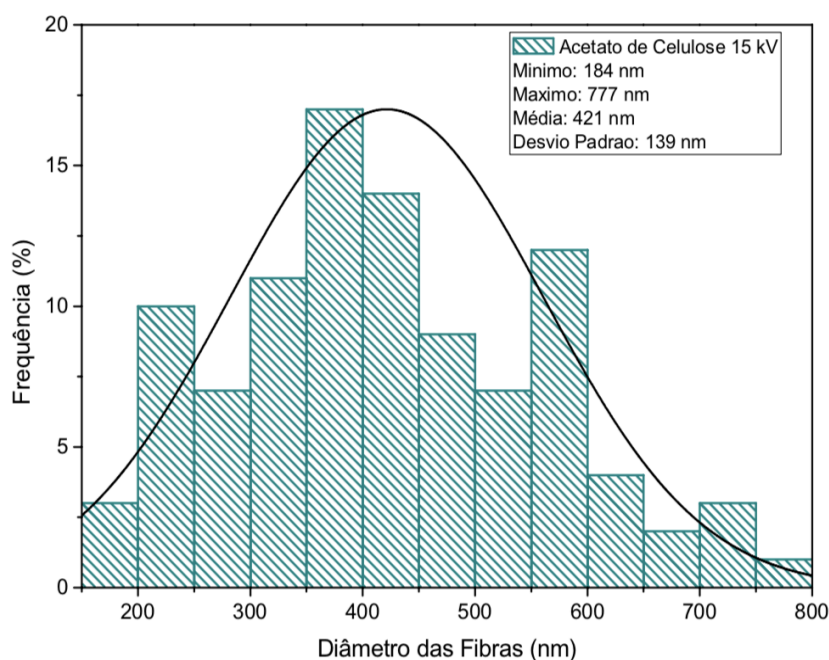


Fonte: Autora

A partir da análise das imagens de microscopia eletrônica e partindo-se da utilização da tensão de 15 kV no equipamento de eletrofiação, percebeu-se a formação de nanofibras contendo poucos *beads* e irregularidades em sua superfície. HEIDER.A *et.al*, 2015 estudou a influência dos valores de tensão no processo de eletrofiação e descreveu que fibras altamente irregulares são geradas quando o valor de tensão aplicada ultrapassa um ponto crítico do polímero, no qual provoca uma instabilidade no jato polimérico e sua subsequente quebra em gotículas (*beads*). A quantidade de *beads* verificados nas nanofibras foram pontuais, o que pode ser um indicativo de que o valor de tensão aplicado (15 kV) foi viável para a produção das nanofibras de acetato de celulose com qualidade superficial.

A distribuição de diâmetros das nanofibras de AC produzidas está representada na Figura 12.

Figura 12- Histograma representativo da distribuição de diâmetros das nanofibras



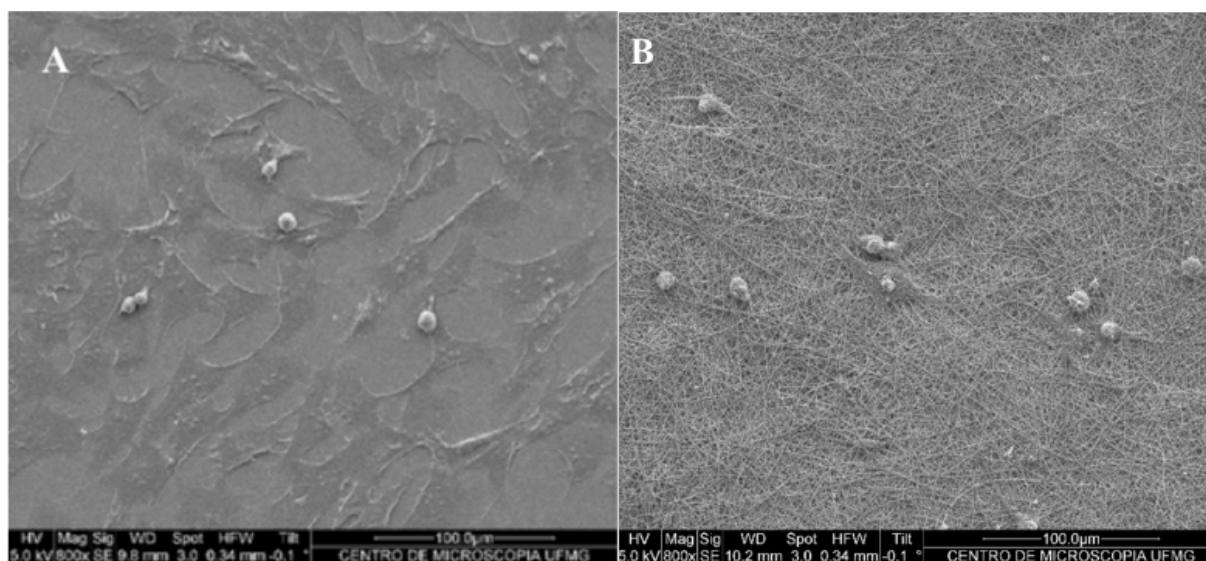
Fonte: Autora

O histograma é uma representação estatística muito comum para avaliar a homogeneidade da distribuição do diâmetro de fibras em uma dada amostra (RIDOLFI, D.M, 2014). A partir da análise da Figura 12 é possível verificar uma distribuição larga e dispersa para a amostra, contendo fibrilas com diâmetros que variam de 184 nm até 777 nm, com média em torno de 421 nm. Além disso, de acordo com medições realizadas no software Origin Pro cerca de 70% das fibras estão abaixo de 400 nm de diâmetro.

5.3 Avaliação da adesão, morfologia e viabilidade celular com C2C12

A partir da cultura celular realizada obteve-se as imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 13) para o controle preparado (A) e amostra contendo a nanofibra de acetato de celulose (B) para 2 dias de incubação.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura realizada para a amostra de controle (A) e de nanofibra de acetato de celulose (B) para 2 dias de incubação

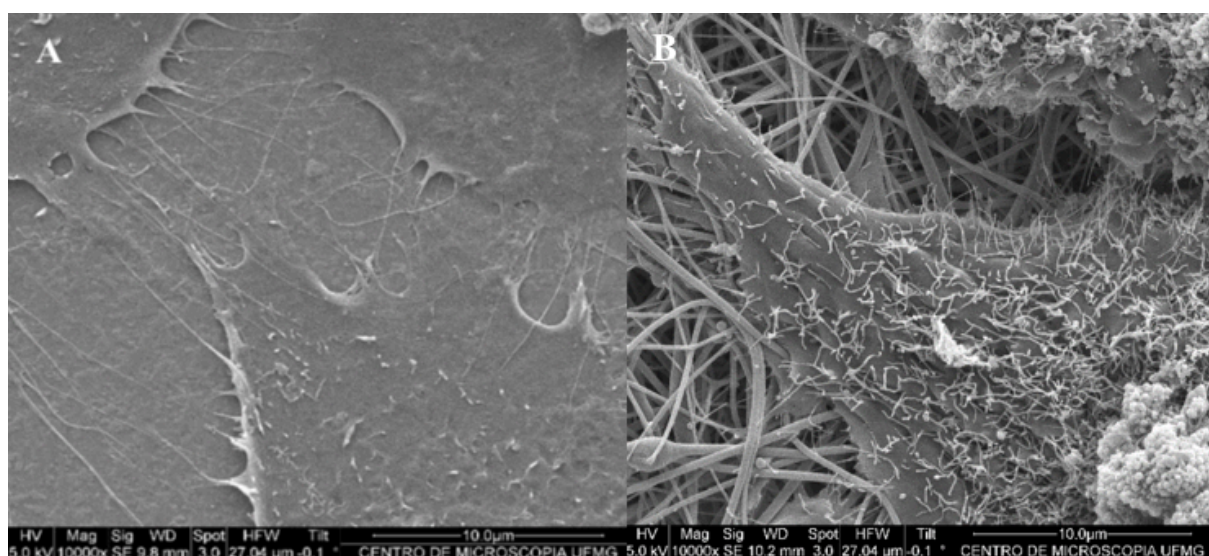


Fonte: Autora

A partir das imagens, observa-se que a superfície do controle é bidimensional e propicia a adesão e o ancoramento dos mioblastos (C2C12). Esse fato pode ser comprovado pelo formato achatado e alongado de algumas células. Para a amostra B, pode-se inferir que as nanofibras de acetato de celulose propiciaram uma boa superfície para a adesão e ancoramento celular pois também é observada a morfologia achatada e alongada de parte dos mioblastos.

A partir de uma ampliação da microscopia para a amostra da nanofibra (B) é possível observar os prolongamentos ou emissões do citoplasma. Na Figura 14 estão representadas imagens ampliadas nas quais são verificadas emissões da membrana celular para a amostra cultivada em ambiente bidimensional (amostra de controle) e em tridimensional (*scaffold* de AC).

Figura 14 - Microscopia ampliada para a amostra de controle (A) e de nanofibra de acetato de celulose (B) para 2 dias de incubação

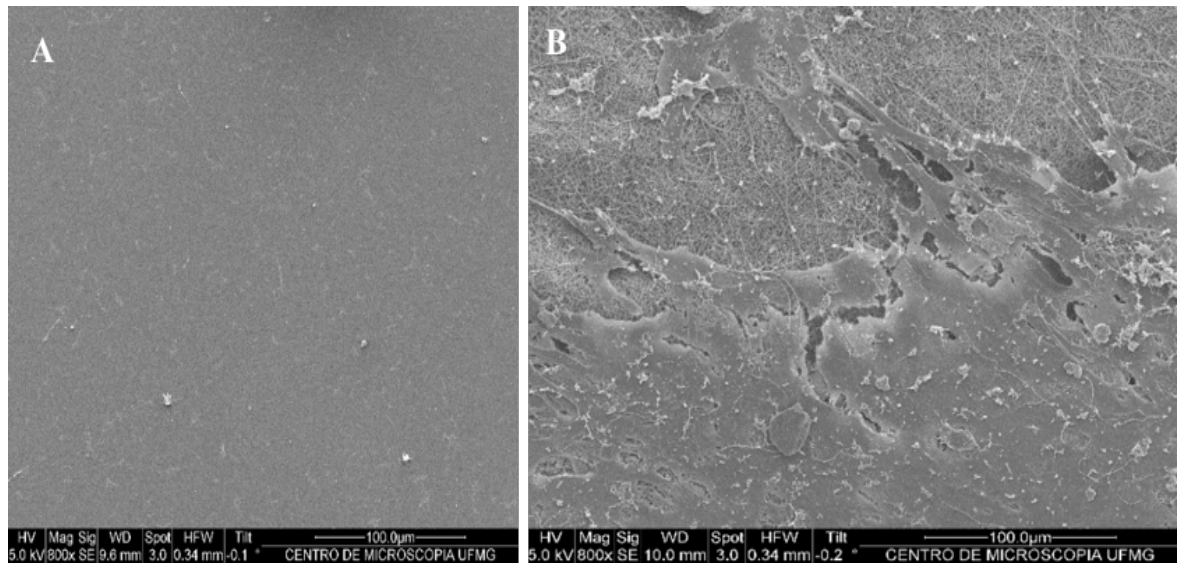


Fonte: Autora

JACQUEMET, G *et.al*, 2015 sugeriu que uma das principais funções da filopodia em ambientes bidimensionais é o reconhecimento da topografia e rigidez da MEC. CHAINOGLU, E *et.al*, 2016 produziu em seu trabalho nanofibras de acetato de celulose biofuncionalizadas com RGD e também observou, a partir do MTT realizado para 3 e 7 dias, emissões de membranas. De acordo com o autor, em um ambiente tridimensional esse fenômeno é indicativo de migração celular, detecção e interação com o biomaterial. (reforçar barra de aumento)

A partir da observação dos resultados para 7 dias de incubação (Figura 15) observa-se que houve uma alta ocupação da superfície do controle (A) com alto grau de uniformidade.

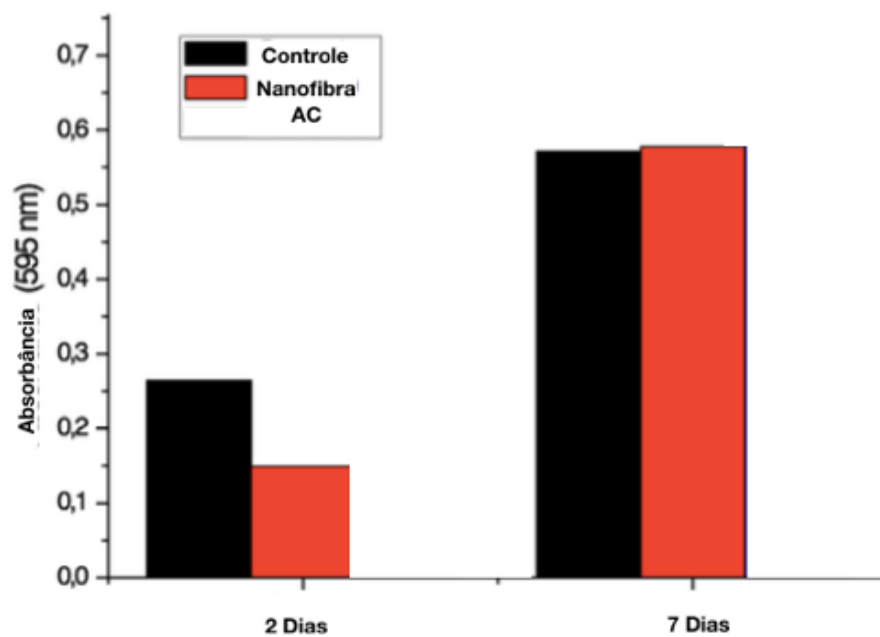
Figura 15 - Microscopia eletrônica de varredura realizada para a amostra de controle (A) e de nanofibra de acetato de celulose (B) para 7 dias de incubação



Fonte: Autora

Visando-se comparar a viabilidade celular das nanofibras de acetato de celulose na presença de mioblastos (C2C12) com o controle realizou-se o teste MTT e obteve-se o gráfico que relaciona a absorbância do formazan produzido pelas mitocôndrias das células em função dos dias de incubação no controle e na nanofibra de acetato de celulose (Figura 16).

Figura 16 - Comparação da viabilidade celular das amostras



Fonte: Autora

Segundo RISS, T.L, 2016 o ensaio de MTT baseia-se na atividade celular para se determinar a viabilidade das mesmas sobre o material. Enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis, ou seja, com suas atividades metabólicas normais, são capazes de converter os sais de tetrazólio de coloração amarela e solúvel em água num produto de coloração azul arroxeadada, o formazan, insolúvel em água. Os cristais de formazan são então dissolvidos e lidos em espectrofotômetro, resultando no gráfico de que mensura a absorbância *versus* tempo de incubação. Os resultados obtidos a partir do teste de MTT são então um indicativo da quantidade de células ativas e viáveis em uma dada amostra.

A partir da Figura 16 observa-se uma menor viabilidade celular da amostra da nanofibra em comparação com o controle no período de incubação de 2 dias. Para 7 dias de incubação, a viabilidade celular das nanofibras foi maior do que a observada no controle. Pode-se inferir que com o decorrer do tempo a nanofibra produzida se torna mais viável ao crescimento celular do que o próprio controle, que foi estabelecido como referência positiva ao início dos testes. Para os próximos trabalhos os testes serão conduzidos de forma a avaliar a capacidade do material induzir o fenômeno de diferenciação dos mioblastos em células musculares.

6 CONCLUSÃO

A demanda pela produção de *scaffolds* eficientes, produzidos a partir de biopolímeros de baixo custo tem se mostrado cada vez mais sólida, englobando não somente a possibilidade de utilização em áreas médicas mas como no setor de produção de carne *in vitro*. Neste trabalho, utilizou-se de abordagens iniciais para avaliar o desempenho de alguns parâmetros produtivos da técnica de *electrospinning* na construção de um *scaffold* nanofibroso de acetato de celulose viável para aplicação no setor de *clean meat*. O procedimento realizado no presente trabalho resultou na obtenção de nanofibras com relativa qualidade superficial e baixa concentração de defeitos (*beads*) resultando num ambiente favorável a adesão e proliferação celular. Somente a análise química realizada (FTIR) não foi capaz de detectar a presença de solvente residual identificada posteriormente a partir do DSC. Esse resultado indica uma necessidade do aprimoramento da técnica de evaporação dos solventes utilizados principalmente visando aplicações em *clean meat*, que demandam de produtos finais livres de substâncias não aprovadas para alimentação.

A viabilidade celular, adesão e morfologia de células vivas (mioblastos - C2C12) foram avaliadas quando em contato com o material, e percebeu-se um aumento da viabilidade quando comparada a amostra de controle bidimensional após 7 dias, demonstrando eficácia na interação inicial desse biopolímero com os receptores celulares. Apesar da limitação de capacidade produtiva e a frequente instabilidade da solução polimérica no sistema, a obtenção dos *scaffolds* de acetato de celulose pela técnica de eletrofiação mostrou-se promissora. Estudos futuros necessitam ser realizados a fim de se prosseguir com a validação do comportamento da nanofibra *in vivo*, sob efeito de esforços mecânicos ou mesmo com a adição de cargas ou funcionalização em sua superfície.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITO, G. F. **Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes**. Biopolímeros, Campina Grande, 5 Janeiro 2011. 15-22.

BHATTARAI, S., et al. **Novel biodegradable electrospun membrane: scaffold for tissue engineering**. Biomaterials, 17 Junho 2004. 2595 - 2602.

CHEN, X. et al. **Three-dimensional electrical conductive scaffold from biomaterial-based carbon microfiber sponge with bioinspired coating for cell proliferation and differentiation**. Carbon, Singapura, 20 Agosto 2018. 174 - 182.

CHANGNOLOU, E. et al. **Development of Biofunctionalized Cellulose Acetate Nanoscaffolds for Heart Valve Tissue Engineering**. World Journal of Nano Science and Engineering, 2016, 6, 129-152

COELHO, M. **Desenvolvimento de metodologia para produção de estruturas tridimensionais porosas de vidro bioativo para aplicação em engenharia de tecidos**. UFMG. Belo Horizonte, p. 156. 2003.

FERREIRA, R et al. **Market Analyses report: Bottom up strategy - Biomimetic Solutions**, (2018)

GARG, K.; BOWLIN, G. **Electrospinning jets and nanofibrous structures**. Biomicrofluidics, 30 Março 2011.

GILPIN, A., & YANG, Y. **Review Article Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications**. Biomedical Engineering, 30 Abril 2017.

HEIDER, A., *et.al.* **A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical**. Arabian Journal of Chemistry, 23 Novembro 2015.

HOWARD, D. *et.al.* **Tissue Engineering: strategies, stem cells and scaffolds.** Journal of Anatomy, 27 Novembro 2008. 66-72.

JACQUELMET, G. *et.al.* Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion Current Opinion in Cell Biology, 2015, 23–31

KANANI, A.; BAHRAMI, S. **Review on Electrospun Nanofibers Scaffold and Biomedical Applications.** Materials Sciences and Applications, 15 Agosto 2010.pp. 93 - 115.

KHORSHIDI, S.; SOLOUK, A. e et al. **A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications.**

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering.** 4^a. ed. Londres: Elsevier, 2014.

LEONG, C. A. W. **Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations.** European Spine Journal, Hong Kong, 13 Novembro 2008. 467 - 479.

NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. **Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso.** Polímeros, 8 Dezembro 2006. 360-370.

OH, S. H. et al. **In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method.** Biomaterials, 2007. 1664-1671.

RIDOLFI, D.M. **Produção e caracterização de nanofibras de quitosana com nanocristais de celulose para aplicações biomédicas.** Unicamp, 2014. 30-34

SCHNEIDER, H. J.; SHAHINPOOR, M. **Smart Materials for Tissue Engineering Fundamental Principles.** Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017.

SHARPLES, F. E. A. Adult stem cells. In: SHARPLES, F. **Stem cells and the future of regenerative medicine.** Washington: National Academy Press, 2003. p. 19-30.

THIRUVADIGAL, D; ANITHA.S; BRABU, B. **Optical, bactericidal and water repellent properties of electrospun nano-composite membranes of cellulose acetate and ZnO.** Carbohydr. Polym. 2012, 87, 1065–1072.

VASITA, R.; KATTI, D. **Nanofibers and their applications in tissue engineering.** Internacional Journal of Nanomedicine, 1 Março 2006. pp. 15 - 30.

VENTURELLI, R.; GRIPA, S. **ELETROFIAÇÃO: UMA ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE NÃOTECIDOS.** Revista UNIFEBE, 2017 Dezembro 22. pp. 150 - 165.

XIE, J. et al.. **“Aligned-to-random” nanofiber scaffolds for mimicking the structure of the tendon-to-bone insertion site.** Nanoscale. 11 Maio 2010.

ZOHORA, F. T.; AZIM, A. Y. M. A. **BIOMATERIALS AS POROUS SCAFFOLDS FOR TISSUE ENGINEERING APPLICATIONS: A REVIEW.** European Scientific Journal, Julho 2014. 186 - 209.

ZHU, J.; MARCHANT, R. **Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds.** Expert Review of Medical Devices, 11 de Setembro de 2011. pp. 607 - 626.

KHORSHIDI, S.; SOLOUK, A. e et al. **A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue-engineering applications.**