

# AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE *SCAFFOLDS* BIODEGRADÁVEIS DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) PLA, PRODUZIDOS POR SEPARAÇÃO DE FASES TERMICAMENTE INDUZIDA SEGUIDA DE LIOFILIZAÇÃO.

Karen J. S. Grancianinov<sup>1,2</sup>, Diogo P. Lauda<sup>2</sup>, Kennedy W. Santos<sup>1</sup>, Ana Paula Lemes<sup>3</sup>, Ivone R. Oliveira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, Brasil

<sup>2</sup>SELAZ – Indústria e Comércio de Aparelhos Biomecânicos, São José dos Campos, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Federal do Estado de São Paulo, São José dos Campos, Brasil  
karenjulie03@gmail.com

**Resumo.** *Scaffolds* de poli (Ácido Láctico) PLA, têm sido largamente estudados para regeneração óssea, mediante às suas excelentes propriedades biodegradáveis e biocompatíveis, além de mimetizarem razoavelmente a estrutura do tecido ósseo natural. Diversos estudos publicados nos últimos anos produzem *scaffolds* por meio da técnica de Separação de Fases Termicamente Induzida (TIPS) seguida de Liofilização, uma vez que esta proporciona uma rápida e fácil obtenção de *scaffolds* com elevada porosidade e boas propriedades mecânicas. A fim de se estudar a viabilidade desta técnica, *scaffolds* de PLA foram sintetizados e caracterizados por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e Porosimetria de Mercúrio, no qual foi possível identificar morfologias e porosidades compatíveis com as relatadas na literatura, necessitando-se apenas de estudos futuros, associado ao teste de diversos parâmetros do processo que possibilitarão produzir *scaffolds* altamente favoráveis para aplicação de reparação óssea. Conclui-se que a aplicação da técnica TIPS seguida de Liofilização é favorável para a produção de *scaffolds* de PLA

**Palavras-chave:** *Poliácido láctico (PLA), scaffolds e separação de fases termicamente induzida (TIPS).*

## 1. INTRODUÇÃO

Grande parte da população brasileira já apresentou ou apresenta falhas e defeitos ósseos, provenientes de lesões traumáticas, fraturas e doenças congênitas ou mal prognosticadas. Mediante a este fato, a engenharia tecidual tem desenvolvido diversos modelos de biomateriais que permitem a reparação tecidual, dentre eles destacam-se as estruturas tridimensionais porosas (*scaffolds*).

Os *scaffolds* representam uma classe de biomateriais promissores, pois sua rede porosa é capaz de induzir e guiar a proliferação celular promovendo assim o crescimento do tecido ósseo (Murphy et al., 2000). No entanto para permitir uma regeneração óssea adequada, estes biomateriais devem permitir o crescimento ósseo, concomitantemente e paulatinamente à taxa a que ocorre a degradação e ainda proporcionar as condições ideais para as etapas da neoformação óssea, promovendo assim inflamação, angiogênese, condrigênese e finalmente osteogênese (Pereira, 2013), (Amaral, 2013). Portanto os *scaffolds* devem cumprir um conjunto de requisitos, entre os quais: ser biocompatíveis, porosos, biodegradáveis, bioreabsorvíveis, osteocondutivos, estáveis e devem apresentar propriedades mecânicas que permitam a regeneração tecidual sem danos à estrutura celular (Tavares, 2014).

Buscando atender a estes requisitos, diversos estudos têm buscado desenvolver *scaffolds* constituídos por matriz polimérica, pois estes biomateriais mimetizam de forma razoável o osso natural (Barroca, 2008), além de que permitem o controle da taxa de degradação por meio de alterações em suas características físicas e químicas (Furth et al., 2007).

Frente a isso, o poliácido láctico (PLA), tem sido largamente aplicado na engenharia tecidual, principalmente para o desenvolvimento de *scaffolds* (Subia et al., 2010), (Conoscenti et al., 2017), devido a exibirem excelentes propriedades, tais como: biodegradabilidade,

biocompatibilidade, (Yu et al., 2010), além de ser um polímero que se destaca perante as suas excelentes propriedades mecânicas, tais como resistência e módulo de elasticidade elevados (Carrasco et al., 2010).

Paralelamente a isso, diversos *scaffolds* estão sendo produzidos pela técnica TIPS seguida de liofilização, pois este método fornece resultados promissores, com alta capacidade no controle da composição e porosidade, possibilitando assim a criação de *scaffolds* homogêneos com elevados índices de porosidade (Conoscenti et al., 2017).

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar a viabilidade de produção de *scaffolds* de PLA por meio da técnica TIPS seguida de Liofilização, mediante diferentes temperaturas de congelamento (-196°C e -80°C).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Para a síntese dos *scaffolds* foi utilizado o Poli (Ácido Lático), reconhecido por PLA PLI005, adquirido da empresa *Naturework*, (densidade: 1,25 g/cm<sup>3</sup> e temperatura de fusão 170°C -180°C) e solvente 1,4 Dioxano da NEON (Densidade: 1,0320 g/mL)

Para a produção dos *scaffolds* de PLA foi utilizado um liofilizador da LABCONCO. Os moldes utilizados para conformar os *scaffolds*, referiram-se a tubos criogênicos com volume de 5 ml da marca NALGENE.

### 2.2 Métodos

***Preparação dos Scaffolds pela técnica TIPS seguida de Liofilização.*** Primeiramente, preparou-se uma solução de PLA a 5,5%, no qual 3,23g de PLA foi dissolvido em 57 ml de 1,4- Dioxano, sob agitação magnética com aquecimento a 60°C durante aproximadamente 1 hora. Após a preparação da solução polimérica, esta foi inserida em 8 tubos criogênicos e sucedeu-se a separação de fases termicamente induzida, por 10 minutos.

Com o objetivo de manter a microestrutura adquirida pela separação de fases, a solução foi submetida à diferentes condições de congelamento. Portanto, quatro tubos criogênicos contendo a solução polimérica foram submetidos ao congelamento em ultrafreezer a -80°C por 4 dias e os outros quatro tubos criogênicos foram submetidos ao congelamento em nitrogênio líquido a -196°C por 1 hora.

Após o congelamento, as soluções foram liofilizadas a temperatura de -82°C sob vácuo de 0,220 mBar por 24 horas, removendo-se o solvente e a água, originando-se assim os *scaffolds* de PLA.

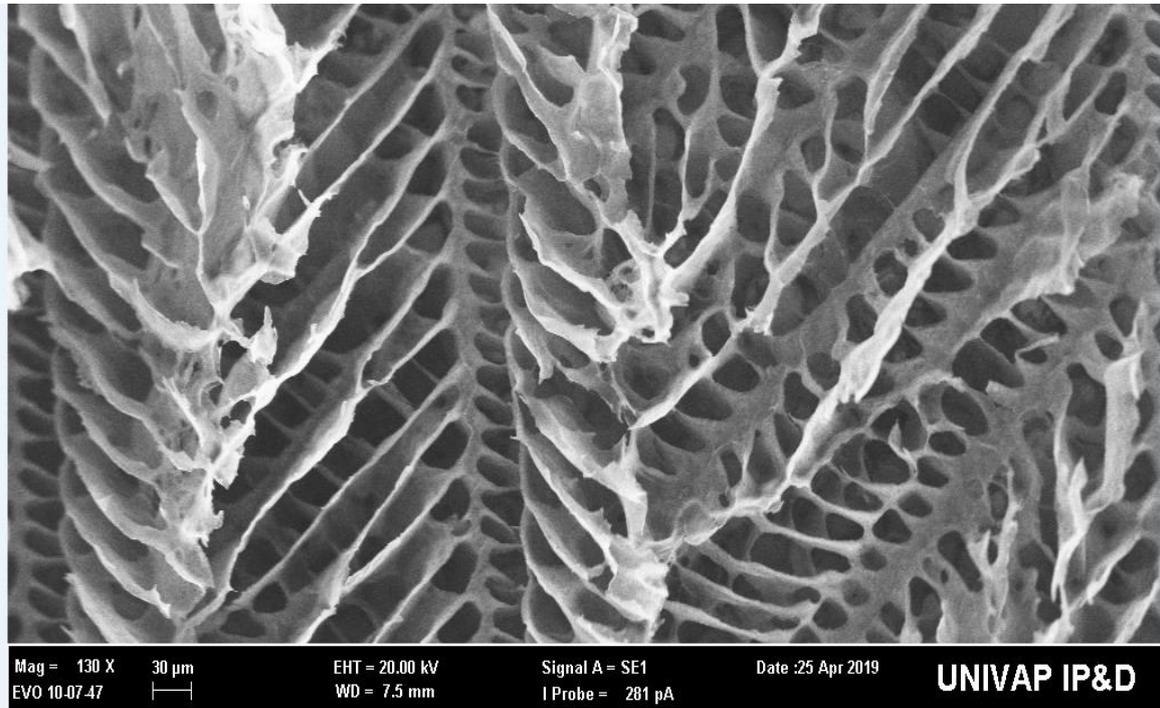
***Caracterização dos Scaffolds.*** A morfologia dos *scaffolds* foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, EVOMA10 Zeiss) utilizando-se uma voltagem de aceleração dos elétrons de 10KV e corrente de 40 mA por 60s. As aproximações das imagens foram feitas em: 130x e 370x.

As medições de porosidade e diâmetro médio de poros, foram definidas pela técnica de Porosimetria de Mercúrio (MICROMERITICS, AutoPore IV 9500 V1.09) mediante a dois ranges de pressão, sendo estes: 0,5 Psi a 50Psi (Baixa pressão) e 50 Psi a 33.000 Psi (Alta pressão).

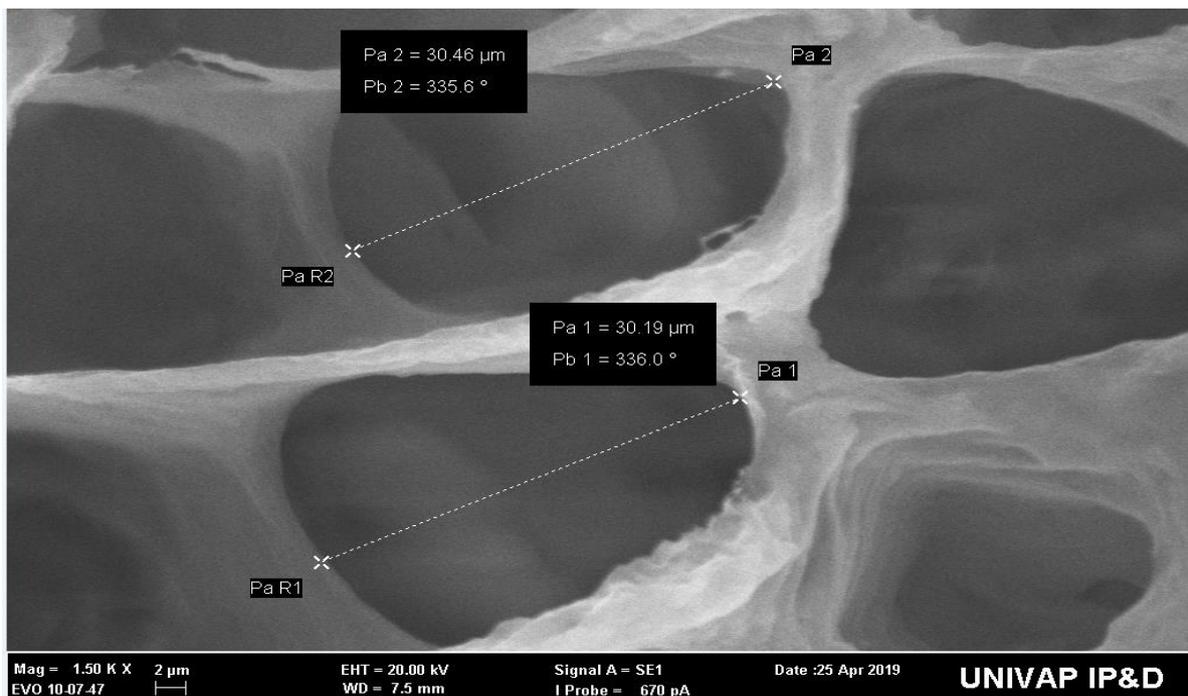
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as micrografias referentes aos *scaffolds* produzidos a partir da temperatura a  $-80^{\circ}\text{C}$ , bem como a Figura 2 apresenta as micrografias dos *scaffolds* produzidos a partir de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Na “Tabela 1” estão apresentados os resultados quanto às medições de porosidade e diâmetro médio de poros.

**Figura 1-** Micrografias dos *scaffolds* obtidos, a partir da temperatura a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

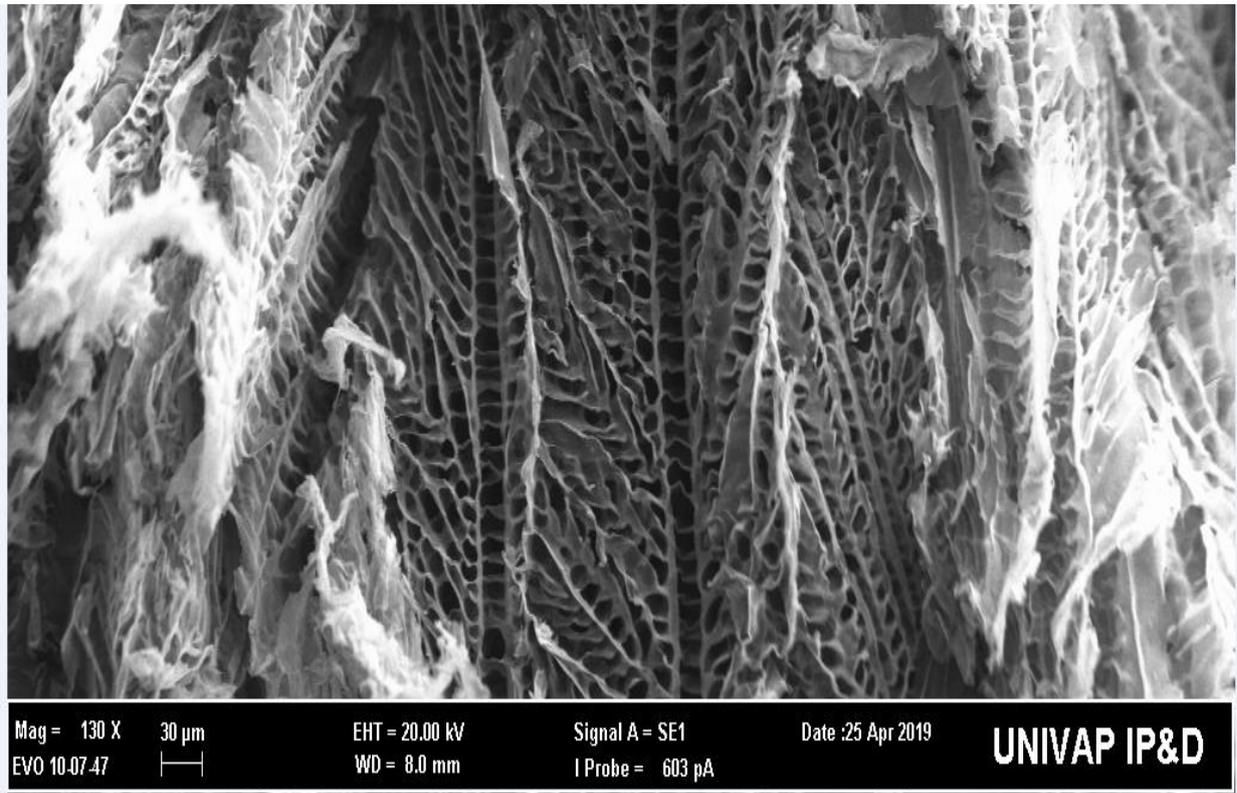


(a) Micrografia obtida em 130x a 30 μm

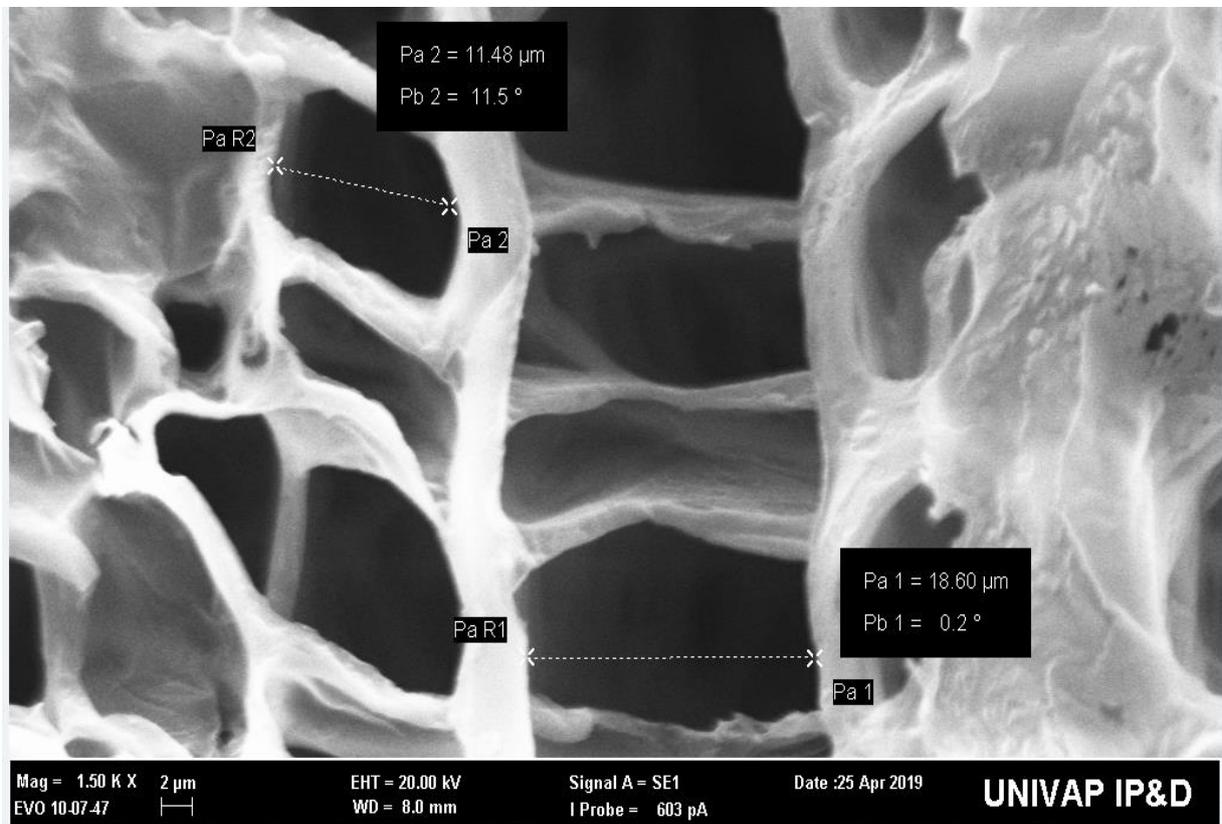


(b) Micrografia obtida em 1500x a 2 μm

**Figura 2- Micrografias dos *scaffolds* obtidos, a partir da temperatura a  $-196^{\circ}\text{C}$ .**



(a) Micrografia obtida em 130x a 30  $\mu\text{m}$



(b) Micrografia obtida em 1500x a 2  $\mu\text{m}$

**Tabela 1- Medições de Porosidade e Diâmetro médio de poros, dos *Scaffolds* obtidos a partir de diferentes temperaturas de congelamento.**

|                                | <i>Scaffolds</i> a -80°C | <i>Scaffolds</i> a -196°C |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <b>Porosidade</b>              | 86,55%                   | 96,27%                    |
| <b>Diâmetro médio de poros</b> | 31,57 µm                 | 10,39 µm                  |

As observações quanto às micrografias apresentadas e os dados da medição de porosidade referente às duas condições de congelamento aplicadas, demonstraram que a técnica TIPS seguida de Liofilização, mostrou-se adequada para a síntese dos *scaffolds*, pois foram obtidas estruturas: altamente porosas (acima de 80%) com morfologias compatíveis com a literatura.

De acordo com a “Fig. 2”, pode ser observada que as morfologias dos *scaffolds*, para ambas as condições avaliadas, exibiram estruturas anisotrópicas, as quais são caracterizadas pela presença de canais tubulares abertos com pequenas divisões ou poros. Portanto, as morfologias aqui identificadas são compatíveis com as relatadas pela literatura, pois este tipo de morfologia refere-se à síntese de *scaffolds* que utilizam preferencialmente a técnica TIPS, a partir de temperaturas de congelamento muito baixas, tais como o trabalho de Zhang e Maquet (Zhang et al., 1999), (Maquet et al., 2004).

A partir da “Tabela 1”, pode-se observar que a porosidade total para ambas as condições, exibiram resultados satisfatórios, dentro de uma faixa de 86,55% a 96,27%. A literatura relata que a porosidade de *scaffolds* provenientes da técnica TIPS, é aumentada quando se utiliza uma solução polimérica com baixo teor de polímero (Barroca, 2008). À vista disso, a porosidade identificada neste trabalho está coerente com a literatura, pois diversos trabalhos identificaram porosidades a partir de 80% para *scaffolds* preparados com porcentagem baixas de PLA (Barroca, 2008), (Maquet et al., 2004), (Nam et al., 1999).

O *scaffold* obtido a partir de -80°C apresentou diâmetro médio de poros, superior ao *scaffold* obtido em -196°C, no entanto ambos os diâmetros de poros adquiridos foram inadequados, não atingindo o requisito de tamanho entre 100 µm e 300 µm (Pereira, 2013). Este fato pode estar associado a alguns parâmetros utilizados no processo, tais como a natureza do solvente utilizado e tempo de separação de fases.

#### 4. CONCLUSÕES

Mediante a aplicação da técnica TIPS seguida de Liofilização para a produção de *scaffolds*, foi possível confirmar a viabilidade desta técnica, pois foram adquiridas estruturas altamente porosas com morfologias adequadas, mas com diâmetro de poros baixos, o que requer um estudo futuro composto de diversas variações de parâmetros do processo, a fim de gerar *scaffolds* apropriados para regeneração óssea.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fapesp #2016/15032-3, UNIVAP, UNIFESP e CNPq #301665/2015-0 pelo apoio a esta pesquisa, bem como a empresa SELAZ por fornecer diversos materiais necessários e dar suporte a todas as fases da pesquisa realizada.

## REFERÊNCIAS

- Amaral, M. B. D. (2013). “Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e microtomografia computadorizada”. Tese de Doutorado, Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- Barroca, N. B. (2008). “Scaffolds à base de Polímeros Piezoelétricos para regeneração óssea”. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro, Aveiro.
- Carrasco, F., Pagès, P., Gámez- Perez, J., Santana, O. O. e Maspocho, M. L. (2010). “Processing of poly(lactic acid): Characterization of chemical structure, thermal stability and mechanical properties”. *Polymer Degradation and Stability*, vol 95, 116-125.
- Conoscenti, G., Schneider, T., Stoelzel, K., Pavia, F. C., Brucato, V., Goegele, C. e Schulze-Tanzil, G. (2017). “PLLA scaffolds produced by thermally induced phase separation (TIPS) allow human chondrocyte growth and extracellular matrix formation dependent on pore size”. *Materials Science and Engineering: C*, vol 80, 449-459.
- Furth, M. E., Atala, A. e Van Dyke, M. E. (2007). “Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine”. *Biomaterials*, vol. 28, 5068–5073.
- Maquet, V., Boccaccini, A. R., Pravata, L., Notingher, I., e Jérôme, R. (2004). “Porous poly ( $\alpha$ -hydroxyacid)/Bioglass® composite scaffolds for bone tissue engineering. I: preparation and in vitro characterisation”. *Biomaterials*, vol 25, 18, 4185-4194
- Murphy, W. L., Kohn, D. H., e Mooney, D. J. (2000). “Growth of continuous bonelike mineral within porous poly (lactide-co-glycolide) scaffolds in vitro”, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, vol 50, 1, 50-58.
- Nam, Y. S., e Park, T. G. (1999). “Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method”. *Biomaterials*, vol 20, 19, 1783-1790.
- Pereira, R. V. (2013). “Desenvolvimento de Scaffolds biodegradáveis de PLDLA/biovidro 58S produzidos por Sinterização Seletiva a laser”, Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Subia, B., Kundu, J. e Kundu, S. C. (2010). “Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications”. *Tissue engineering*, 141, 141-158.
- Tavares, D. S. C. (2014). “Fabricação e Caracterização de Scaffolds compósitos de polímero-hidroxiapatite e polímero-vidro para engenharia de tecido”. Tese de Doutorado, Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica, Aveiro.
- Yu, N. Y., Schindeler, A., Little, D. G. e Ruys, A. J. (2010). “Biodegradable poly ( $\alpha$ -hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering”. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 93, 1, 285-295.
- Zhang, R., e Ma, P. X. (1999). “Poly ( $\alpha$ -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology”. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*, vol 44, 4, 446-455.

## **EVALUATION OF SYNTHESIS OF BIODEGRADABLE POLY (LACTIC ACID) PLA SCAFFOLDS, PRODUCED BY THERMICALLY INDUCED PHASE SEPARATION FOLLOWED BY FREEZE - DRYING.**

Karen J. S. Grancianinov<sup>1,2</sup>, Diogo P. Lauda<sup>2</sup>, Kennedy W. Santos<sup>1</sup>, Ana Paula Lemes<sup>3</sup>, Ivone R. Oliveira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Institute for Research and Development - University of Vale do Paraíba, São José dos Campos, Brazil

<sup>2</sup>SELAZ – Industry and trade of biomechanical appliances, São José dos Campos, Brazil

<sup>3</sup>Federal University of the State of São Paulo, São José dos Campos, Brazil

karenjulie03@gmail.com

**Abstract:** *Scaffolds of poly (Lactic Acid) PLA, have been widely studied for bone regeneration, through their excellent biodegradable and biocompatible properties, besides to reasonably mimic the structure of the natural bone tissue. Several studies published in recent years, produce scaffolds using the technique of Thermally Induced Phase Separation (TIPS) followed by Freeze-Drying, since this provides a quick and easy to obtain scaffolds instituted with high porosity and good mechanical properties. In order to study the viability of this technique, PLA scaffolds were synthesized and characterized by Scanning Electron Microscopy and Mercury Porosimetry, in which it was possible to identify morphologies and porosities compatible with those reported in the literature, requiring only of future studies, associated with the test of several process parameters, that will enable to produce highly favorable scaffolds for the application of bone repair. It is concluded that the application of the TIPS technique followed by Freeze-Drying is favorable for the production of PLA scaffolds.*

**Keywords:** *Lactic polyacid (PLA), scaffolds and thermally induced phase separation (TIPS).*