

POROSIDADE DE SCAFFOLDS: PICNOMETRIA X PROCESSAMENTO DE IMAGENS

M. M. O. Simbara, E. C. Lins e S. M. Malmonge

Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Federal do ABC,
Santo André, Brasil

e-mail: marcia.simbara@ufabc.edu.br

Resumo: Diversos biomateriais vêm sendo explorados para a confecção de *scaffolds* para uso em engenharia tecidual, sendo a porosidade uma de suas características mais importantes. Apesar de haver padronização internacional para avaliação de *scaffolds*, as metodologias lá descritas não são adequadas para estruturas fibrosas e, mesmo para porositas convencionais, são limitadas. O presente trabalho tem como objetivo avaliar e comparar duas técnicas para medição de porosidade para *scaffolds* poliméricos. *Scaffolds* porosos e fibrosos foram produzidos por evaporação de solvente contendo cristais como agentes porogênicos e por *airbrushing*, respectivamente. O grau de porosidade foi calculado por picnometria e por processamento de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O método de picnometria é mais simples e barato, e é adequado para estruturas porosas convencionais. O método de processamento de imagens, no entanto, necessita de um algoritmo mais complexo quando a estrutura tem mais de uma camada. Já para *scaffolds* fibrosos, a penetração de líquido entre as fibras aumenta o volume de vazio, o que levanta questionamentos sobre o que seria a porosidade real da estrutura; desta forma, o método de imagens pode, por vezes, ser mais adequado. Conclui-se, portanto, que ambas as técnicas são válidas para avaliar a porosidade de *scaffolds*, porém a escolha de uma ou outra deve levar em consideração fatores como disponibilidade de equipamentos/recursos, espessura da amostra e sua aplicação.

Palavras-chave: *scaffolds*, porosidade, engenharia tecidual

Abstract: Several biomaterials have been studied for use in scaffolds for tissue engineering, with porosity being one of their most important characteristics. Porosity is a highly important feature for scaffolds in tissue engineering. Although there is international standardization of scaffold assessment, the methodologies described in there are not proper for fibrous structures and, even for the conventional porous ones, they are very limited. This work aims to evaluate and compare two techniques for porosity measurement in polymeric scaffolds. Porous and fibrous scaffolds were produced by solvent casting with particulate leaching and by airbrushing, respectively. The degree of

porosity was calculated by pycnometry and by processing of scanning electron microscopy (SEM) images. The pycnometry method is simpler and cheaper, and it is proper for porous structures. The imaging method, though, requires a more complex algorithm when the structure is made of more than one layer. For fibrous scaffolds, though, liquid penetration among the fibers increases void volume, which raises questions about what is the structure's real porosity; therefore, the imaging method sometimes can be more suitable. In conclusion, both techniques are valid for scaffold porosity assessment, but their choice must take into consideration factors such as equipment/resources availability, specimen thickness and its application.

Keywords: *scaffolds*, porosity, tissue engineering

Introdução

Técnicas de engenharia tecidual empregando biomateriais na forma de estruturas porosas tridimensionais, os *scaffolds*, apresentam-se como grande promessa no tratamento de danos teciduais extensos. A maioria das estratégias emprega o cultivo de células sobre *scaffolds* bioreabsorvíveis que mimetizam a matriz extracelular natural, facilitando a organização das células, controlando seu comportamento e direcionando a formação de tecidos específicos. Desta forma, é de suma importância que o *scaffold* apresente porosidade adequada, de acordo com a função a ser exercida [1]. A porosidade é, de fato, uma das primeiras características a se analisar em um *scaffold*.

Durante o *workshop* "Standards & Measurements for Tissue Engineering Scaffolds: What Do We Have & What Do We Need?", realizado em maio de 2013 pela ASTM (American Society for Testing and Materials), foram levantadas as principais prioridades para padronização futura na área de *scaffolds* para engenharia tecidual. A necessidade de metodologias para caracterizar tipos específicos de *scaffolds* foi uma das primeiras identificadas [2]. Dentre estes diferentes tipos, as estruturas fibrosas foram os grandes alvos de debate. Isso porque elas possuem parâmetros diferentes para caracterização, e porque, apesar de sua crescente importância na área, ainda não há metodologias padronizadas para sua análise [2]. Embora haja a ASTM F2450-10 *Assessing Microstructure of Polymeric*

Scaffolds for Use in Tissue-Engineered Medical Products, as metodologias lá descritas para determinação de porosidade são aplicáveis basicamente a estruturas porosas tradicionais e muitas não podem ser utilizadas para materiais moles, que deformam com facilidade [3].

O presente trabalho tem como objetivo apresentar e comparar algumas metodologias de caracterização de porosidade de *scaffolds* fibrosos e porosos confeccionados a partir dos biomateriais poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV), poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e uma blenda (PHBV:PCL 75:25), vista a falta de padronização apropriada vigente.

Materiais e métodos

Materiais – PHBV (12% wt 403121-100G) e PCL (440744-250G, Mn 70000-90000) foram adquiridos da Aldrich. Foi utilizado clorofórmio da Vetec Química e da Synth. Cloreto de sódio (NaCl) foi adquirido da Vetec Química. O etanol (99,8%) utilizado era da Isofar.

Preparação dos *scaffolds* porosos – Foi utilizada a técnica de evaporação de solvente contendo cristais como agentes porogênicos para produzir membranas de composição PHBV puro, PCL puro e PHBV:PCL 75:25. Foram produzidas soluções poliméricas 5% p/v de cada composição (1,25g de polímero em 25mL de clorofórmio), com a ajuda de um agitador magnético. A cada solução foram adicionados 25g de NaCl (100% p/v) de $180\mu\text{m} < \phi < 300\mu\text{m}$. As soluções foram vertidas em placas de Petri e, após a evaporação do solvente, foram retiradas do molde e mantidas em água destilada por 48 horas para a lavagem do sal.

Preparação dos *scaffolds* fibrosos – A técnica de *airbrushing* foi utilizada para produzir estruturas fibrosas de mesma composição que as porosas. Em um *airbrush* comercial (Sagyma, SW130K, diâmetro do bico 0.5mm), foram carregadas soluções poliméricas de 4% p/v em clorofórmio (concentração ideal para utilização deste método [4]). O equipamento foi conectado a um compressor odontológico (Fiac, CD TOP 7/30) ajustado para pressão de 30 psi. A distância entre o *airbrush* e o coletor foi mantida a 25cm durante todo o experimento.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)– Um microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo (Jeol, JCM6010LA) foi utilizado para coletar imagens dos *scaffolds* fibrosos. Foram tiradas fotos de diferentes regiões das amostras. Antes submetê-las ao MEV, elas foram recobertas com ouro (Leica, Baltec SDC 040).

Porosidade por picnometria – A porosidade média de cada membrana (n=3 para porosos e n=2 para fibrosos) foi medida com um picnômetro, conforme método descrito por LeBlon *et al* [5], mas como os polímeros são hidrofóbicos, etanol foi utilizado no lugar de água. Uma balança semi-analítica (Shimadzu, AW220) foi utilizada para pesar o que foi necessário.

Porosidade por processamento de imagens - As imagens obtidas por MEV foram carregadas no *software* *MATLAB*. Valores de *threshold* foram selecionados para

proporcionar melhor diferenciação entre as áreas de *background* (que representam os espaços vazios da amostra) e de fibras, da seguinte forma: um valor de *threshold* de 5% significa que todos os *pixels* com valores menores que 5% do valor máximo encontrado em todas as imagens foram zerados, entrando para a contagem do *background*. Para todas as amostras, foram simulados 6 valores diferentes, variando de 5% a 30% em intervalos de 5%. Para cada amostra e para cada aumento, foram selecionados os *thresholds* que produziam as imagens mais fidedignas. A porosidade foi calculada através da razão entre a quantidade de zeros (vazios) e a quantidade total de *pixels* de cada imagem.

Resultados

Os valores de porosidade obtidos por picnometria são apresentados na Tabela 1 (porosos) e 2 (fibrosos).

Tabela 1: Grau de porosidade dos *scaffolds* porosos determinados por picnometria.

	Grau de porosidade (%)		
	PHBV	PCL	Blenda
Amostra 1	92.41	94.54	93.13
Amostra 1	92.16	92.81	92.85
Amostra 3	92.56	93.71	93.52
Média	92.38 \pm 0.20	93.69 \pm 0.87	93.17 \pm 0.34

Tabela 2: Grau de porosidade dos *scaffolds* fibrosos determinados por picnometria.

	Grau de porosidade (%)		
	PHBV	PCL	Blenda
Amostra 1	65.42	86.52	84.20
Amostra 2	30.00	86.87	74.28
Média	47.71 \pm 25.05	86.70 \pm 0.25	79.24 \pm 7.01

Os valores encontrados utilizando o método de processamento de imagem são mostrados nas Tabela 3, 4 e 5.

Tabela 3. Grau de porosidade para os *scaffolds* de PCL determinados por processamento de imagens com *threshold* de 15%.

Região	Aumento	Porosidade (%)	Porosidade média (%)
1	35x	2,82	2,82
2	50x	3,44	6,63
3		9,82	
4	55x	6,84	6,84
5	100x	4,10	4,10
6	250x	9,46	7,40

7		6,00	
8		6,73	
9	500x	13,27	9,14
10		7,22	
11		6,94	
12	800x	9,69	8,73
13		7,77	
14	1000x	10,41	10,41
15	1200x	9,77	9,77
		Média final	7,31 ± 2,55

Tabela 4. Grau de porosidade dos *scaffolds* PHBV determinados por processamento de imagens com *threshold* de 15%.

Região	Aumento	Porosidade (%)	Porosidade média (%)
1	50x	5,91	6,82
2		4,39	
3		10,17	
4	100x	10,29	22,45
5		34,60	
6	250x	8,65	20,75
7		32,85	
8	500x	18,77	18,77
		Média final	17,20 ± 7,08

Tabela 5. Grau de porosidade para PHBV:PCL 75:25 determinados por processamento de imagens (*).

Região	Aumento	Porosidade (%)	Porosidade média (%)
1	30x	2,77	2,77
2	50x	2,65	2,65
3	100x	3,48	2,90
4		2,31	
5	200x	3,28	3,29
6	250x	4,16	5,31
7		0,48	
8		0,57	
9		0,54	
10		21,68	
11		4,44	
12	500x	1,53	9,53
13		0,23	
14		26,85	
15	1000x	7,97	4,71
16		1,45	
		Média final	4,45 ± 2,47

* Valores de *threshold* variando entre 10 e 15%.

Discussão

Considerando que foi utilizado 100% p/v de NaCl para a obtenção de poros, os valores mostrados na Tabela 1 estão compatíveis com o esperado. Apesar do número de amostras ser pequeno, o desvio baixo indica que o método gera resultados confiáveis para estas estruturas.

Já para as fibras, pode-se observar que há um erro grande tanto no PHBV quanto na blenda, o que é justificado pela presença de regiões muito heterogêneas. Quando não há sistema automatizado para a fabricação de *scaffolds* por *airbrushing*, depende-se muito do operador para garantir a homogeneidade da membrana.

O PHBV é um polímero mais rígido e forma membranas mais quebradiças, com mais partículas que fibras. Já o PCL e a blenda (apesar de ser 75% PHBV) produzem fibras soltas e mais flexíveis (Figura 1).

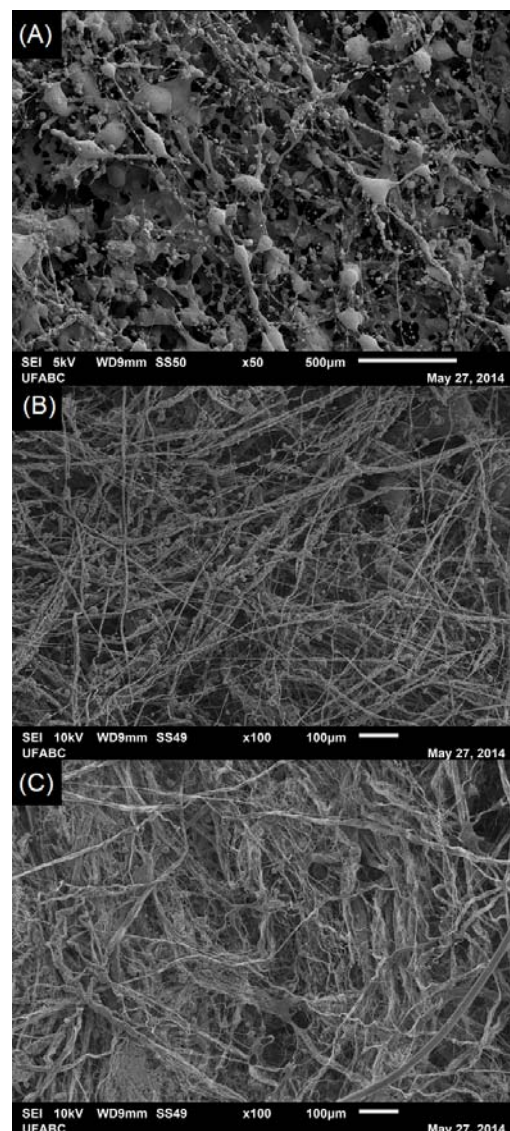


Figura 1. Imagens de MEV de *scaffolds* de (A) PHBV, (B) PHBV:PCL 75:25 e (C) PCL produzidas por *airbrushing*.

No caso dos *scaffolds* de PCL e da blenda, acredita-se que a imersão em líquido do método da picnometria faz o volume de vazio aumentar, pois as fibras conseguem se movimentar no álcool. Já no caso do PHBV isso não ocorre devido à maior rigidez da estrutura, que não é influenciada pelo líquido. Isso leva à discussão do que é realmente a porosidade do material, visto que em muitas aplicações, o *scaffold* está imerso em líquidos corpóreos e muitas vezes até submetido a algum fluxo. Desta forma, deve-se analisar as condições reais às quais a estrutura será submetida.

O método de imagens é mais caro, considerando-se o custo do equipamento de MEV e de recobrimento, então quando a picnometria é adequada, seu uso é preferível. Além disso, para as estruturas porosas, de espessura significativa, são necessárias imagens de fraturas e de várias camadas para que seja obtida a porosidade da amostra toda, e não somente da superfície. O algoritmo escrito por Aly *et al* [6] para o cálculo de porosidade de *scaffolds* porosos é mais complexo do que o utilizado neste trabalho para medir a porosidade de estruturas fibrosas. Os *scaffolds* fibrosos aqui estudados são membranas muito finas, sendo uma análise de superfície suficiente.

Um dos cuidados que se deve tomar no método de imagens é que modificando alguns parâmetros no momento da aquisição da imagem, no próprio *software* do equipamento, já pode haver perda de informação, ainda mais evidenciada com os *thresholds* (Figura 2).

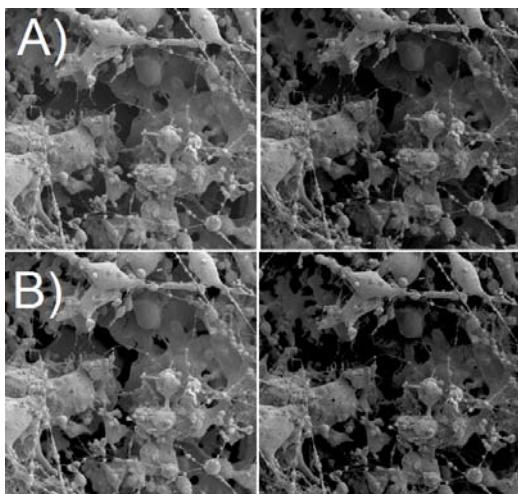


Figura 2. Variação de imagem de MEV: A) imagens originais e B) processadas, com *threshold* de 15%.

Verificando as Tabelas 3, 4 e 5, confirma-se que o maior desvio é o do PHBV, muito provavelmente por causa das partículas que ele produz (Fig. 1A). Enquanto as fibras são mais uniformes, o tamanho das partículas é muito variável. Também é possível observar um valor muito menor de porosidade para o PCL e a blenda do que o encontrado pelo método de picnometria, o que confirma o que foi dito sobre a penetração do líquido entre as fibras. A imersão destes *scaffolds* em um líquido realmente aumenta de forma significativa seus valores de porosidade.

Conclusão

Ambos os métodos aqui descritos são adequados para determinação de porosidade *scaffolds*. O método de picnometria é mais barato e adequado para a determinação de porosidade de estruturas porosas. No caso das estruturas fibrosas, no entanto, é preciso verificar as condições às quais elas estarão submetidas no corpo para saber que método aplicar. Isso porque o líquido utilizado na picnometria penetra pelas fibras e aumenta o volume de vazio da estrutura, por elas serem flexíveis (no caso do PCL e da blenda). No caso delas serem utilizadas em ambientes mais secos, onde não há fluxo intenso, o método de imagens pode ser considerado mais apropriado.

Uma das desvantagens do método de imagens, no entanto, é que se depende muito da percepção visual do operador para garantir que não haja perda de informações no processamento das imagens. Alterações no contraste da imagem no próprio *software* do MEV já podem alterar o valor de porosidade da estrutura.

Agradecimentos

Os autores agradecem o PIBIC/CNPq pela bolsa de Iniciação Científica e à UFABC pela bolsa de Mestrado.

Referências

- [1] Johnson T, Bahrapourian R, Patel A, Mequanint K. Fabrication of highly porous tissue-engineering scaffolds using selective spherical porogens. *Biomed Mater Eng.* 2010, 20(2),107-18.
- [2] American Society for Testing and Materials. Workshop Report “ASTM Scaffolds Workshop - Standards & Measurements for Tissue Engineering Scaffolds: What Do We Have & What Do We Need?” [internet], 2013 May 21, Indianapolis, IN; [cited 2014 July 9]. Available from: <http://www.astm.org/COMMIT/Workshop%20Report.pdf>
- [3] American Society for Testing and Materials. ASTM F2450-10 Assessing Microstructure of Polymeric Scaffolds for Use in Tissue-Engineered Medical Products. West Conshohocken, 2010, 10p.
- [4] Tutak W, Sarkar S, Lin-Gibson S, Farooque TM, Jyotsnendy G, Wang D, Kohn J, Bolikal D, Simon Kr CG. The support of bone marrow stromal cell differentiation by airbrushed nanofiber scaffolds. *Biomaterials.* 2013, 34 (10), 2389-2398.
- [5] LeBlon CE, Pai R, Fodor CR, Golding AS, Coulter JP, Jedlicka SS. In vitro comparative biodegradation analysis of salt-leached porous polymer scaffolds. *Journal of Applied Polymer Science.* 2012, 128(5), 2701-2712.
- [6] Aly AF, Agameia A, Eldesouky AS, Sharaf MA. Scaffold Development and Characterization Using CAD System. *Am. J. Biomed. Sci.* 2011. 3(4), 268-277.