

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS PLA/nHA PRODUZIDOS POR IMPRESSÃO 3D

Arthur João Reis Lima Rodvalho¹; Willams Teles Barbosa²; Caio Athayde de Oliva²; Leonardo Santana Ramos Oliveira²; Lucca Ribeiro Alves²; Jaqueline Leite Vieira³; Ana Paula Bispo Gonçalves³; Milena Botelho Pereira Soares³; Josiane Dantas Viana Barbosa²

¹ Graduando em Engenharia Mecânica; Iniciação científica – FAPESB; rodovalhoarthur13@gmail.com

² Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; josianedantas@fieb.org.br

³ Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Salvador-BA

RESUMO

Scaffolds obtidos a partir de biocompósitos têm sido largamente utilizados na área de engenharia de tecidos, como alternativa de reparo de lesões e/ou tratamento de algumas doenças crônicas. O uso da técnica de impressão 3D para a produção de *scaffolds* tem se apresentado como uma alternativa que permite a combinação de estruturas que atuam como matrizes extracelulares e auxiliam na proliferação, diferenciação e biossíntese da matriz natural de células na sua superfície. Estudos demonstram que a incorporação de biocerâmicas, como a nanohidroxiapatita (nHA) (fosfato de cálcio hidratado, razão Ca/P = 1,67) em matrizes biopoliméricas, como PLA (Poliácido láctico) promovem osteocondutividade, bioatividade e osteoindutividade, acelerando o processo de regeneração tecidual. Além de estabilizar a interface *scaffold*/tecido, melhorando a resistência a cargas mecânicas. Portanto, esse estudo tem como objetivo analisar se diferentes tamanhos de partículas e a cristalinidade de nHA irá impactar nas propriedades morfológicas (MEV), mecânica (compressão), termogravimétrica (TGA) e biológicas do *scaffold*.

PALAVRAS-CHAVE: *Scaffold*; biocompósito; impressão 3D; PLA/nHA.

1. INTRODUÇÃO

A regeneração e reparo de grandes lesões no tecido ósseo ainda é um grande desafio para a engenharia de tecidos. Com isso, a impressão 3D é uma técnica de produção alternativa na engenharia de tecidos para sanar essas lesões por ter alta precisão e maior grau de liberdade para customizar geometrias de matrizes extracelulares, *scaffolds*.¹ Portanto, há muitos estudos de materiais para aplicação como implante ósseo, como por exemplo, metais, cerâmicas e polímeros, porém eles têm baixa atividade osteogênica, baixa histocompatibilidade e baixa taxa de degradação, não obtendo resultados satisfatórios.² Com isso, a combinação de materiais biocompatíveis (biocompósitos) é necessário para mimetizar o tecido ósseo.³ Para esse estudo, foi utilizado o biopolímero poliácido láctico (PLA) e a biocerâmica nanohidroxiapatita (nHA) para produzir *scaffolds* biocompósitos de PLA/nHA. A nHA possui propriedades e características semelhantes à fase mineral do tecido ósseo, tais como osteocondutividade, osteoindutividade e bioatividade.¹⁻² Este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar *scaffolds* biocompósitos de PLA/nHA produzidos por impressão 3D. Foi utilizado nHA com diferentes tamanhos de partículas e cristalinidades. Os *scaffolds* impressos foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA), ensaio mecânico de compressão e estudo de citotoxicidade por meio do ensaio de *Alamar Blue* (Invitrogen, Carlsbad, USA).

2. METODOLOGIA

Para a preparação do compósito, foi utilizado a razão de 3 % (em peso) de nHA e 15 % p/v de clorofórmio como solvente.³ A Tabela 1 apresenta as nomenclaturas das amostras produzidas e suas respectivas cristalinidades e tamanhos de partículas.

Tabela 1: Nomenclatura dos *scaffolds* impressos e suas respectivas cristalinidade e tamanho de partícula.

Amostras	Cristalinidade	Tamanho de partículas (nm)
A1	3%	9,86
A2	65%	34
A3	60%	34

Inicialmente foram preparados filmes de biocompósito pelo método *casting*. Utilizou-se um ultrassom para dispersar as nanopartículas de nHA no clorofórmio por 20 minutos. Em seguida, o PLA foi adicionado na solução de nHA/clorofórmio sob agitação magnética até total dissolução do PLA. A solução foi colocada em placas de Petri e deixadas em circulação de ar durante 24 horas para evaporação do solvente, formando

filmes biocompósitos, todo o processo foi executado em uma capela. Para a impressão 3D dos *scaffolds* foi necessário cortar os filmes de PLA/nHA em quadrados de aproximadamente 5 x 5 mm.

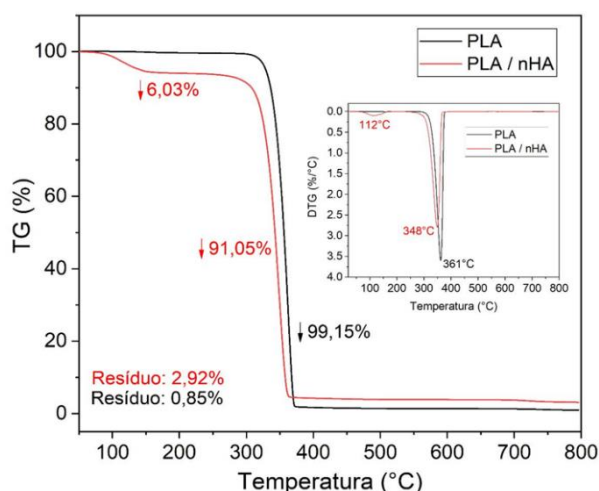
A bioimpressora utilizada é do modelo Octopus da empresa 3D BIOTECHNOLOGY SOLUTIONS que consiste em 3 cabeçotes de impressão e o *software* para o fatiamento do código foi o Simplify 3D. Os parâmetros de impressão utilizados para imprimir os *scaffolds* biocompósitos com dimensões de 12x12x4 mm foram, temperatura de impressão de 180 °C, pré-aquecimento de 20 minutos, preenchimento interno de 60 % (retilinear $\pm 45^\circ$), altura das camadas de 0,8 mm, diâmetro do bico 1 mm e velocidade de impressão de 50 mm/min.

A análise de TGA do filme biocompósito obtido foi feita em um analisador TA Instruments DSC, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de nitrogênio em uma faixa de temperatura de 25 a 800 °C. A análise morfológica dos *scaffolds* foi realizada por MEV (modelo JSM - 6510LV). O ensaio mecânico de compressão foi executado no equipamento EMIC (modelo DL2000/700), utilizando uma célula de carga de 9KN e velocidade de 1 mm/min. A análise de citotoxicidade foi por meio do ensaio de Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, USA) com células Fibroblastos Murinos L929, plaqueadas em placas de cultura de 48 poços, com $1,5 \times 10^5$ células por poço, permanecendo em incubadora a 37 °C, 5 % CO₂ por 48h. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

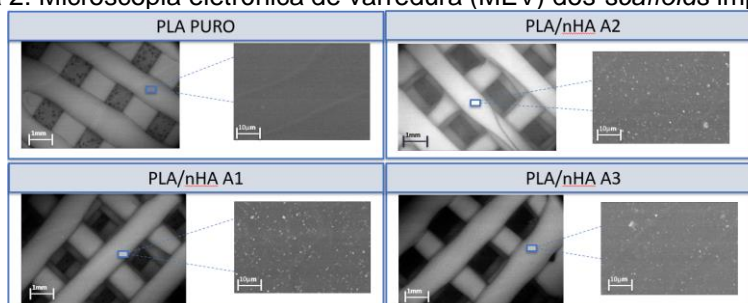
A Figura 1 apresenta as curvas termogravimétricas do PLA puro e do biocompósito PLA/nHA. É possível observar que para ambas as amostras (PLA e PLA/nHA) houve um evento acentuado de perda de massa em aproximadamente 350 °C, referente a decomposição do polímero PLA. Para o PLA puro ocorreu quase que sua decomposição total, restando 0,85 % de resíduo, além disso é possível observar na curva DTG que houve um evento térmico em torno 112 °C referente umidade ou compostos mais voláteis presentes no material. Já para o biocompósito PLA/nHA o resíduo foi de 2,92 %, que é equivalente a quantidade de nHA adicionada ao biocompósito.

Figura 1: Curvas TG e DTG dos *scaffolds* de PLA e PLA/nHA.



Na análise por MEV dos *scaffolds* impressos (Figura 2) pode-se notar que os filamentos e os poros apresentaram uma certa uniformidade. Analisando detalhadamente os filamentos dos *scaffolds* biocompósitos foi possível observar a presença de partículas de nHA distribuídas ao longo da superfície.

Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos *scaffolds* impressos.



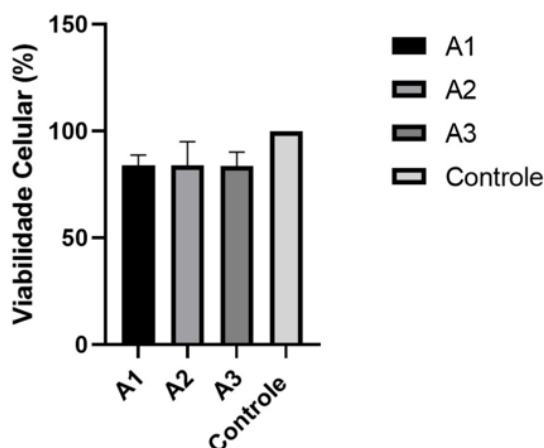
Os resultados do ensaio de compressão, com os valores de tensão máxima e módulo de elasticidade dos scaffolds podem ser vistos na Tabela 2. Para esses valores foi realizado o teste de Tukey a 95 % para avaliar se ocorreu diferença estatística entre os resultados. Observou-se que tanto o módulo elástico quanto a tensão na força máxima das amostras não diferem entre si estatisticamente.

Tabela 2: Tensões e módulo de elasticidade dos scaffolds impressos.

Teste de Tukey		
Amostra	Tensão máxima (MPa)	Módulo elástico (MPa)
PLA	17,83 ± 7,31 ^a	127,2 ± 54,20 ^a
A1	11,91 ± 3,71 ^{ab}	85,93 ± 23,81 ^a
A2	7,12 ± 3,53 ^b	66,81 ± 50,2 ^a
A3	9,51 ± 3,79 ^{ab}	68,81 ± 93,71 ^a

Na Figura 3 é apresentado os resultados do ensaio de citotoxicidade, podendo afirmar que o material não é citotóxico, visto que as porcentagens da viabilidade celular estão próximas do controle, sem diferença significativa.

Figura 3: Viabilidade celular dos scaffolds impressos.



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que os diferentes tamanhos de partículas e cristalinidade da nHA não interferem significativamente nas propriedades mecânicas, morfológicas e biológicas dos scaffolds. A concentração de nHA presente no compósito foi aproximadamente igual a concentração estabelecida na fabricação do PLA/nHA, não havendo perda significativa de material. Os scaffolds biocompósitos possuem boa uniformidade de filamentos e porosidade, mostrando que a adição de nHA não impactou na resolução de impressão. Além disso, houve boa dispersão das partículas de nHA ao logo da matriz de PLA. Os scaffolds apresentaram viabilidade celular satisfatória para aplicação na engenharia de tecidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao SENAI CIMATEC por disponibilizar a estrutura para desenvolver a pesquisa. A FAPESB, CAPES e FIOCRUZ por financiarem o da pesquisa. A Prof^a. Dra. Sabrina Arcaro da UNESC por disponibilizar a Hidroxiapatita.

5. REFERÊNCIAS

- HEN, Xibao. 3D printed porous PLA/nHA composite scaffolds with enhanced osteogenesis and osteoconductivity in vivo for bone regeneration. *Biomedical Materials*. Republica da China: IOP, 2019.
- WANG, Wenzhao. 3D printing of PLA / n-HA composite scaffolds with customized mechanical properties and biological functions for bone tissue engineering. Sichuan: ELSEVIER, 2021.
- CESTARI, Francesca. 3D printing of PCL/nano-hydroxyapatite scaffolds derived from biogenic sources for bone tissue engineering. Trento: ELSEVIER, 2021.