



## BIOIMPRESSÃO 3D DE MATRIZES DE ALGINATO/HIDROXIAPATITA PARA APLICAÇÃO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA

**Bruno C. Alves<sup>1\*</sup>, Renato de S. Miranda<sup>2</sup>, Marcia R. de Moura<sup>2</sup>, Fauze A. Aouada<sup>2</sup>,  
Ruís C. Tokimatsu<sup>1</sup>**

*1 – Departamento de Engenharia Mecânica, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS),  
Universidade Estadual Paulista (UNESP). Avenida Brasil, 56, Ilha Solteira, CEP 15385-000, SP.*

*2 – Grupo de Compósitos e Nanocompósitos Híbridos (GCNH), Programa de Pós-Graduação em  
Ciência dos Materiais, FEIS, UNESP, Ilha Solteira, SP, Brasil.*

*[bcrepaldialves@gmail.com](mailto:bcrepaldialves@gmail.com)*

### RESUMO

*A busca por longevidade aliada à qualidade de vida tem gerado cada vez mais a necessidade de alternativas para reparação de tecidos vivos, vítimas de traumas ou patogenias. Os biomateriais voltados para regeneração óssea sempre aparecem como destaque devido à alta demanda. Com crescente interesse surgem os hidrogéis, sendo estes definidos como polímeros altamente hidrofílicos que, quando obtidos por fontes naturais, possuem características necessárias para essa área, principalmente quando combinados com reforços de materiais poliméricos ou de outras classes. Isto resulta na produção de compósitos que são promissores para o uso na engenharia de tecidos. Este trabalho buscou a fabricação de scaffolds a partir de um hidrogel composto por uma matriz de alginato de sódio com reforços de hidroxiapatita, visando aplicação em regeneração de tecidos ósseos. Para a fabricação dos scaffolds foi utilizada bioimpressão 3D, um método promissor para fabricação de matrizes de tecidos. Inicialmente, foram otimizados todos os parâmetros de impressão, assim como a concentração de alginato de sódio. A solução de alginato foi preparada dissolvendo alginato de sódio a uma concentração de 10% (w/v) em água destilada a temperatura ambiente. A esta solução foi então adicionada hidroxiapatita nas concentrações de 2,5 e 5,0% (w/v). Após a homogeneização, os scaffolds foram fabricados utilizando uma bioimpressora 3D. Os modelos foram desenhados em formato cilíndrico, com diâmetro de 25mm e espessura de 1,5mm, preenchimento interno de 20% e com padrão de preenchimento “hexagonal”. Após as impressões, as amostras foram inseridas, por 24 horas a temperatura ambiente, em um recipiente contendo solução de 1,0% (w/v) de cloreto de cálcio. Os scaffolds foram analisados qualitativamente em relação a concentração de hidroxiapatita e características morfológicas, alteração nos parâmetros de projeto e propriedades hidrofílicas. Estas matrizes apresentam boa reprodutibilidade em suas características morfológicas, integridade mecânica suficiente para manuseio em aplicações cirúrgicas e propriedades hidrofílicas compatíveis com a alta concentração de alginato.*

**Palavras-chave:** *Alginato, hidroxiapatita, bioimpressão 3D, engenharia de tecidos.*

## INTRODUÇÃO

A moldura de ossos e cartilagens que protege nossos órgãos e permite que nos movimentemos é denominada sistema esquelético. Cada osso no sistema esquelético é um órgão individual. Este sistema tem como funções a sustentação, proteção, movimento, armazenamento e homeostase mineral, local de produção das células do sangue e armazenamento de energia <sup>(1)</sup>. A saúde dos ossos influencia diretamente a qualidade de vida, onde diversos fatores vêm aumentando a demanda da reparação osteocondral, que é um defeito na cartilagem de uma articulação e no osso subjacente. Dentre os fatores destacam-se os danos relacionados ao crescente número de lesões esportivas, traumas de acidentes, patologias congênitas e não congênitas <sup>(2)</sup>.

O tecido ósseo pode se recuperar naturalmente em condições fisiológicas para danos de pequena extensão, isto é, fraturas milimétricas. Entretanto, para extensões maiores o reparo natural não recupera a forma ou funcionalidade natural do osso, sendo os enxertos autógenos, em geral, a primeira opção médica. Entretanto, este tratamento possui limitações: disponibilidade de enxerto, defeito gerado na extração do enxerto e pós-operatório de duas áreas lesionadas <sup>(3,4)</sup>.

Neste contexto, a engenharia de tecidos ósseos surge como promissora alternativa em casos em que há perda óssea, superando problemas de rejeição e escassez de doadores. Combinando estruturas tridimensionais (3D) – “*scaffolds*”, células e materiais com alta propriedade hidrofílica, que mimetizam o ambiente aquoso vivo, a engenharia de tecidos busca soluções duradouras e funcionais para regeneração óssea. Hidrogéis vêm sendo amplamente estudados como matrizes 3D por apresentarem sistemas promissores para cura e regeneração de tecidos danificados, justamente por serem altamente permeáveis e facilitar o transporte de nutrientes e metabólitos. Possuem capacidade de mimetizar tecidos do corpo e responder a estímulos, possuem maciez e flexibilidade apropriadas, além da biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades reológicas adequadas, tornando-os importantes objetos de pesquisa em biomateriais, tanto na engenharia de tecidos, quanto para liberação controlada de fármacos. Diferentes materiais com propriedades biodegradáveis foram utilizados em estudos de matrizes porosas 3D (*scaffolds*) para regeneração óssea. Dentre eles, os polímeros naturais são opções que mais atraem pesquisadores, principalmente pelas semelhanças com a versatilidade química da matriz extracelular do tecido, com desempenho biológico e interações celulares <sup>(5)</sup>.

Neste aspecto, o alginato de sódio é um polissacarídeo natural, sensível ao pH, biocompatível, extraído de algas marinhas, injetável e biodegradável, conhecido por formar géis na presença de cátions bivalentes, como íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Dadas essas características, esse polímero tem sido amplamente utilizado para depósito de fármacos e fatores de crescimento, encapsulamento celular e como *scaffolds* em aplicações na engenharia de tecidos. No entanto, o alginato apresenta limitações para tecido ósseo, como ausência de locais para ligação celular ou interações com o tecido receptor, limitando sua funcionalidade a longo prazo. Portanto, o uso de hidroxiapatita (HAp) como componente de reforço com capacidades osteocondutivas podem contribuir para superar algumas dessas limitações. HAp é comumente utilizada na regeneração de tecido ósseo devido à sua similaridade química com o componente inorgânico da matriz óssea e com suas características, como biocompatibilidade, osteoindução, osteocondução e osteoingração. A quantidade de HAp dentro da composição de hidrogéis a base de polímeros é crucial para projetar um tecido eficiente para regeneração óssea. Uma vez que a HA é degradada gradualmente, libera íons  $\text{Ca}^{2+}$  e íons fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ), que podem modificar o comportamento celular dentro do microambiente da aplicação, influenciando a mineralização óssea e a ligação aos tecidos circundantes. Alguns autores relataram que o nível de solubilidade, formação de camada de apatita semelhante ao osso, fixação celular,

proliferação e diferenciação e, finalmente, a taxa de crescimento ósseo, pode depender da concentração de HAp incorporado em compósitos a base de polímeros <sup>(6)</sup>.

Os enxertos ósseos têm sido, tradicionalmente, realizados por meio de transplantes de tecido ósseo. No entanto, há vários problemas na utilização tanto de aloenxertos (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, de uma mesma espécie) quanto autoenxertos, incluindo infecções e respostas imune patogênicas para o primeiro caso e a morbidade do sítio doador e a quantidade limitada de tecido ósseo utilizável para o segundo caso <sup>(7)</sup>. Os obstáculos mencionados levaram a necessidade de um método mais seguro e confiável que contorna os problemas com as estratégias terapêuticas atuais para defeitos ósseos. O uso da impressão tridimensional é promissor, sendo uma metodologia que auxilia na regeneração óssea mimetizando as propriedades do osso mineral, fornecendo construção óssea e proporcionando orientações de crescimento tecidual. Comparado com as técnicas tradicionais de biofabricação (mistura por fusão, lixiviação e moldagem), a bioimpressão 3D é um método promissor para fabricação de matrizes de tecidos, fornecendo um alto controle sobre os parâmetros de projeto, como o tamanho dos poros, interconectividade, diâmetro dos filamentos, taxa de degradação e propriedades mecânicas <sup>(8)</sup>.

Diante das informações citadas acima, é de conhecimento que o alginato aliado à hidroxiapatita possa se tornar um material com grande potencial para aplicação em engenharia de tecidos, bem como a bioimpressão 3D. Desta forma este trabalho buscou desenvolver *scaffolds* de alginato com diferentes proporções de hidroxiapatita através da bioimpressão 3D. Após o processo, as amostras foram analisadas qualitativamente em relação a concentração de hidroxiapatita em termos de características morfológicas e propriedades hidrofílicas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Preparo de soluções e obtenção dos hidrogéis compósitos

A solução de alginato foi preparada dissolvendo alginato de sódio a uma concentração de 10% (w/v) em água destilada a 25°C. A esta solução foi adicionada hidroxiapatita (tamanho médio de partícula de 5µm) nas concentrações de 2,5 e 5,0% (w/v) a 25°C.

A modelagem dos *scaffolds* foi realizada utilizando o software PrusaSlicer, que permite o controle dos parâmetros do processo, como velocidade, força de extrusão, preenchimento interno e padrão de preenchimento. Os modelos possuem diâmetro de 25mm, espessura de 1,5mm, preenchimento interno de 20% e padrões de preenchimento “hexagonal”. Após a modelagem, os *scaffolds* foram fabricados utilizando uma Bioender (Bioedtech) e inseridos, por 24 horas a 25°C, em um recipiente contendo solução de 1,0% (w/v) de cloreto de cálcio. Os modelos e o processo de bioimpressão estão exemplificados na figura abaixo:

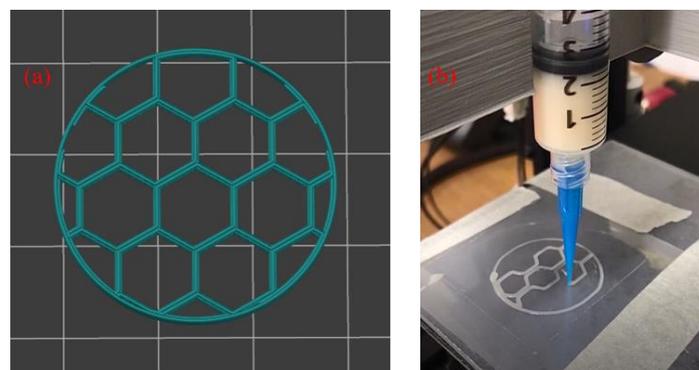


Figura 1: (a) modelo do *scaffold* e (b) processo de bioimpressão 3D.

## Análises morfológica e hidrofílica

A análise morfológica foi realizada com os *scaffolds* intumescidos e secos, visando a comparação entre as proporções de hidroxiapatita e a investigação dos parâmetros do processo de bioimpressão.

A propriedade hidrofílica foi determinada pela determinação do grau de intumescimento (Q) em função do tempo, tendo o meio de intumescimento a água destilada. Para determinação dos valores de Q, os hidrogéis secos foram pesados ( $M_s$ ) em uma balança analítica e posteriormente imersos em 20 mL de água destilada. Após tempos pré-determinados, os hidrogéis foram retirados do meio de intumescimento e pesados novamente ( $M_t$ ). Os valores de Q foram determinados em g/g (grama de água por grama de hidrogel), conforme a Equação (A):

$$Q = \frac{M_t}{M_s} \quad (A)$$

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 2 está ilustrada a cinética de intumescimento dos *scaffolds*. Podemos notar que as amostras apresentam comportamentos similares, tanto para o alginato puro, quanto para as diferentes proporções de hidroxiapatita.

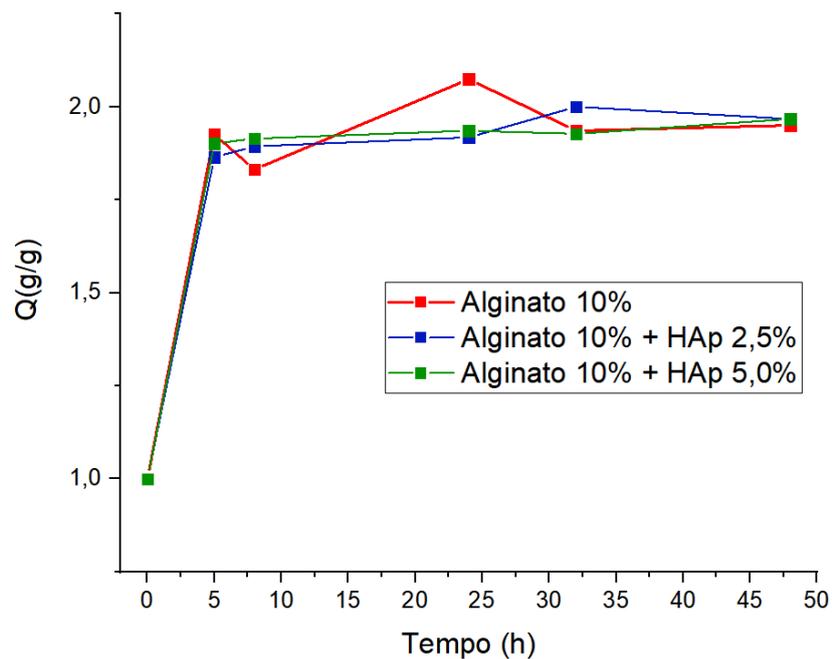


Figura 2: Cinética de intumescimento dos hidrogéis contendo diferentes concentrações de hidroxiapatita.

A figura 3 apresenta imagens digitais dos *scaffolds* secos e intumescidos, onde podemos notar que, após o processo de reticulação, a forma do modelo não foi alterada, mesmo após intumescimento. Com relação às medidas originais do projeto e dos bioimpressos, temos que o diâmetro do *scaffold* intumescido sofreu redução média de 60% em relação ao diâmetro do modelo. Enquanto o diâmetro seco apresentou redução média de 75%, independente da proporção de hidroxiapatita.

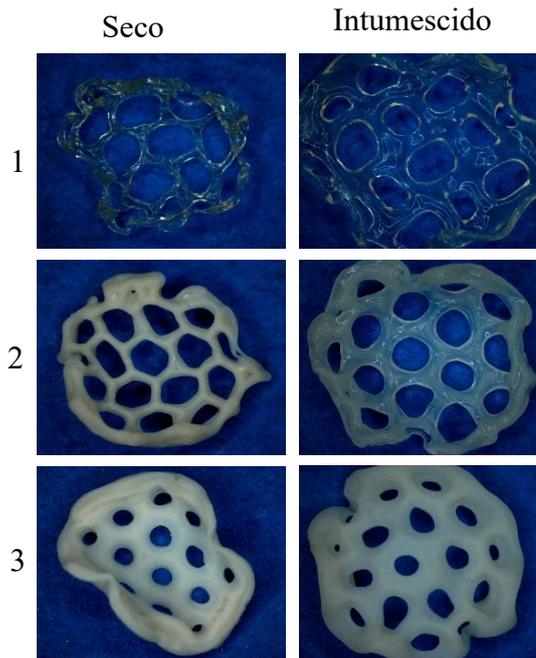


Figura 3: Imagens digitais dos *scaffolds* bioimpressos compostos por: 1) alginato 10% (m/v), 2) alginato 10% + hidroxiapatita 2,5% (m/v) e 3) alginato 10% + hidroxiapatita 5,0% (m/v).

## CONCLUSÕES

Levando em consideração os resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que foi possível desenvolver *scaffolds* bioimpressos de alginato com reforços de hidroxiapatita com boa reprodutibilidade através da modelagem em um software de fatiamento. Pode-se observar que a cinética de intumescimento e os principais aspectos morfológicos se mantiveram independentes das proporções de hidroxiapatita, possibilitando o uso do alginato como matriz e adicionando propriedades como osteoindução, osteocondução e osteointegração através da hidroxiapatita, sem a perda de importantes propriedades do alginato.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a UNESP, FAPESP (2018/18697-1; 2013/03643-0; 2013/07296-2), CNPq (MRM 312530/2018-8; FAA 312414/2018-8; 316174/2021-1). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

1. TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. *Corpo humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia*. Porto Alegre: Artmed, 2012.
2. SEO, S.; MAHAPATRA, C.; SINGH, R.K.; KNOWLES, J.C.; KIM, H. Strategies for osteochondral repair: focus on scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*, v. 5, p. 1-14, 2014.
3. HUPP, J.R. *Reparação das Feridas*. In: PETERSON, Larry J. et al. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 4. p. 55-62.
4. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Tecido Ósseo*. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 8. p. 135-152.

5. RIBEIRO, M. et al. Development of silk fibroin/nanohydroxyapatite composite hydrogels for bone tissue engineering. *European Polymer Journal: Macromolecular Nanotechnology*, v. 67, p. 66-77, 2015.
6. BARROS, J. et al. Alginate-nanohydroxyapatite hydrogel system: Optimizing the formulation for enhanced bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, v. 105, p. 1-14, 2019.
7. VURAL, A.C. et al. Cranial bone regeneration via BMP-2 encoding mesenchymal stem cells. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. V. 45, p. 544–550, 2017.
8. MONCAL, K.K. et al. 3D printing of poly(e-caprolactone)/poly(D, L-lactide-coglycolide)/hydroxyapatite composite constructs for bone tissue engineering. *Journal of Materials Research*, v. 33, p. 1972-1986, 2018.

### **3D BIOPRINTING SCAFFOLD USING ALGINATE/HYDROXYAPATITE FOR APPLICATION IN BONE REGENERATION**

#### **ABSTRACT**

*The search for longevity combined with the quality of life has increasingly generated the need for alternatives to repair living tissues, victims of trauma, or pathogens. Biomaterials for bone regeneration always appear in the spotlight due to high demand. With increasing interest arise hydrogels, defined as highly hydrophilic polymers with necessary characteristics in this area, especially when combined with other materials. This results in the production of composites that are promising for use in tissue engineering. This work aimed to manufacture scaffolds from a hydrogel composed of a sodium alginate matrix with hydroxyapatite reinforcements, aiming at the application in bone tissue regeneration. 3D bioprinting was used to fabricate the scaffolds, a promising method for fabricating tissue matrices. Initially, all printing parameters and the concentration of sodium alginate were optimized. The alginate solution was prepared by dissolving sodium alginate at a concentration of 10% (w/v) in distilled water at room temperature. To this solution, it was then added hydroxyapatite at concentrations of 2.5 and 5.0% (w/v). After homogenization, the scaffolds were fabricated using a 3D bioprinter. The models were designed in a cylindrical shape, with a diameter of 25mm and a thickness of 1.5mm, an internal filling of 20%, and a “hexagonal” filling pattern. After the impressions, the samples were placed, for 24 hours at room temperature, in a container containing a 1.0% (w/v) solution of calcium chloride. The scaffolds were qualitatively analyzed for hydroxyapatite concentration and morphological characteristics, changes in design parameters, and hydrophilic properties. These scaffolds present good reproducibility in their morphological characteristics, sufficient mechanical integrity for handling in surgical applications and hydrophilic properties compatible with the high concentration of alginate.*

**Keywords:** *Alginate, hydroxyapatite, 3D bioprinting, tissue engineering.*