

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA METALÚRGICA
E DE MATERIAIS

NATHALIA SENCIALES SOBREIRA MACHADO

**Avaliação de arcabouços para a regeneração da cartilagem
articular à base de policaprolactona**

São Paulo

Dezembro 2022

NATHALIA SENCIALES SOBREIRA MACHADO

**Avaliação de arcabouços para a regeneração da cartilagem
articular à base de policaprolactona**

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia
Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
bacharel em Engenharia de Materiais.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Grillo Fernandes

São Paulo

Dezembro de 2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação-na-publicação

Machado, Nathalia Senciales Sobreira

Avaliação de arcabouços para a regeneração da cartilagem articular a base de policaprolactona / N. S. S. Machado – 2022.

46p.

Trabalho de Formatura - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

1. Arcabouço. 2. Cartilagem. 3. Policaprolactona. 4. Hidrogel I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais II.t.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer minha família, em especial meus pais, Silvia e Alfredo, por me serem grandes exemplos de como a educação pode mudar vidas, por me apoiarem nas minhas escolhas e por sempre torná-las possíveis. Agradeço também à minha irmã Beatriz, por me incentivar a seguir e acreditar nos meus sonhos, me ajudando a alcançar cada um deles. A todos os demais membros da família agradeço pela torcida e apoio em todos os meus passos, e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço também aos meus amigos, àqueles que conheci ao longo destes 5 anos, e ao meu namorado Guilherme, que foram tão importantes para que eu chegasse no momento de hoje. Agradeço a todos os momentos de descontração, de comemoração e de estudos que tivemos juntos. Com certeza este período não teria sido o mesmo sem vocês.

A todos os meus professores ofereço meu agradecimento pelos ensinamentos ao longo destes anos, em especial à Prof.^a Dr.^a Elizabeth Grillo Fernandes, que me orientou neste último ano, e que foi um apoio essencial para que eu pudesse me tornar Engenheira de Materiais, apresentando um grande Trabalho de Conclusão de Curso.

RESUMO

Na literatura, o tema relacionado à regeneração da cartilagem articular combinando arcabouços a base de materiais poliméricos e células é ainda um desafio. Isto se deve a diversos fatores, como a natureza do material(ais) polimérico(s) utilizados no desenvolvimento do arcabouço; o quanto a sua arquitetura imita, ou se aproxima, da morfologia da cartilagem em questão; além de suas características mecânicas e a fonte da célula a ser utilizada para obter um tecido cartilaginoso. O poliéster biodegradável, não tóxico, e biocompatível, policaprolactona (PCL) tem sido investigado na engenharia de tecido cartilaginoso. As propriedades que despertam interesse são a degradação por hidrólise em meios fisiológicos, propriedades mecânicas que podem ser moduladas conforme a sua massa molecular, e flexibilidade nas formas de processamento, por exemplo. Entretanto, ele é hidrofóbico, o que tem levado à modificações como o do desenvolvimento de materiais híbridos em que o PCL funciona como suporte mecânico para hidrogéis a base de gelatina reticulada, por exemplo. Em base as considerações apresentadas, buscou-se neste trabalho avaliar os caminhos para modificação do PCL visando um material híbrido que possa ser utilizado em arcabouços para o desenvolvimento de cartilagem articular.

Palavras-chave: Arcabouço. Cartilagem. Policaprolactona. Hidrogel.

ABSTRACT

In the literature, the issue related to articular cartilage regeneration combining scaffolds based on polymeric materials and cells is still a challenge. This is due to several factors such as the nature of the polymeric material(s) used in the development of the framework; the extent to which its architecture imitates, or approaches, the morphology of the cartilage in question; in addition to its mechanical characteristics, and the cell source to be used to obtain cartilage tissue. The biodegradable, non-toxic, and biocompatible polyester, polycaprolactone (PCL) has been investigated in cartilage tissue engineering. The properties that arouse interest are the degradation by hydrolysis in physiological media, mechanical properties that can be modulated according to their molecular weight, and flexibility in the ways of processing, for example. However, it is hydrophobic, which has led to modifications such as the development of hybrid materials in which PCL works as a mechanical support for hydrogels based on cross-linked gelatin, for example. Based on the considerations presented, this work sought to evaluate the ways to modify the PCL aiming at a hybrid material that can be used in scaffolds for the development of articular cartilage.

Keywords: Scaffold. Cartilage. Polycaprolactone. Hydrogel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Organização das zonas do tecido de cartilagem articular.	2
Figura 2.	Publicações sobre bioimpressão por 40 anos a partir de 1980.	7
Figura 3.	Esquema da técnica de eletrofiação	7
Figura 4.	Esquemas de plataformas baseadas em extrusão comumente aplicadas em bioimpressão. Extrusão pneumática à esquerda e assistida por mecanismo de pistão à direita	9
Figura 5.	Esquemas de estratégias para manter a forma de estruturas impressas com hidrogéis facilmente deformáveis	12
Figura 6.	Esquemas para as diferentes plataformas utilizadas na bioimpressão.	15
Figura 7.	Esquema das diferentes técnicas de irradiação que podem ser usadas na fotopolimerização em cuba, polimerização de 2 fótons e bioimpressão assistida por laser.	18
Figura 8.	Ilustração esquemática da fabricação do arcabouço de PCL/MLT-ALG	25
Figura 9.	Amostra de PCL/MLT	26
Figura 10.	Imagens MEV das membranas eletrofiadas de PCL/MLT (a) 5000x, (b) 10.000x; e hidrogel de ALG (c) 100x, (d) 200x.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades mecânicas do tecido de cartilagem articular (independente da zona)	3
Tabela 2. Comparação de técnicas de bioimpressão com base na resolução do produto obtido, nos requisitos reológicos do material utilizado e nas principais vantagens e desvantagens.....	19

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS.....	V
1 INTRODUÇÃO.....	0
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 A cartilagem articular e os seus tratamentos.....	2
2.1.1 Tipos de tratamentos usando ou não a bioengenharia.....	3
2.1.2 Anti-inflamatórios.....	4
2.1.3 Células Tronco	4
2.1.4 Terapia Genética	5
2.2 Arcabouços de Biomateriais.....	5
2.3 Processos de Produção de arcabouços	6
2.3.1 Eletrofiação	7
2.3.2 Tipos de Impressão 3D	8
2.4 Sistemas baseados em extrusão de Materiais	9
2.4.1 Requisitos dos Materiais	10
2.4.2 Reticulação durante a Extrusão	10
2.4.3 Reforço de Coextrusão.....	11
2.4.4 Extrusão suspensa	12
2.5 Sistemas Baseados em Impressão a Jato	13
2.5.1 Requisitos dos Materiais	13

2.5.2 Jateamento Piezoelétrico	14
2.5.3 Jateamento Térmico.....	14
2.5.4 Jateamento Baseado em Micro válvulas	14
2.5.5 Jateamento Acústico	15
2.6 Fotopolimerização em Cuba.....	16
2.6.1 Requisitos dos Materiais	16
2.6.2 Polimerização de Dois Fóttons.....	17
2.7 Bioimpressão Assistida por Laser	17
2.8 Polímeros como Biotintas na Bioimpressão	21
2.8.1 Polímeros Base	21
2.9 Arcabouços a base de PCL.....	23
2.9.1 PCL+Colágeno e PCL+Gelatina.....	23
2.9.2 PCL+Alginato carregado com melatonina	24
2.9.3 PCL+Hidrogel GelMA-HAMA.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Parâmetro de Solubilidade do PCL	29
4.2 Parâmetro de Solubilidade do Alginato	30
4.3 Parâmetro de Solubilidade do Colágeno	31
5 CONCLUSÃO.....	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Problemas ortopédicos são muito recorrentes em equinos, principalmente naqueles que se dedicam a atividades atléticas. Uma das lesões mais comuns são as osteoartrites (OA), que afetam a cartilagem articular e o osso adjacente, muitas vezes fazendo com que o animal tenha que ser retirado precocemente do esporte. A cartilagem articular é uma das estruturas que compõem a articulação, e é responsável pela absorção de impacto. Com exercícios intensos e repetitivos, altas cargas são impostas neste tecido, gerando tensões de compressão, tração, cisalhamento e atrito. Estas cargas são responsáveis pelo desenvolvimento de um processo inflamatório, que acaba por desgastar a cartilagem excessivamente. Sem a integridade deste tecido, a absorção do impacto dos movimentos diminui e em parte é transmitida para o osso, causando danos ainda maiores.

A fim de contribuir com o tratamento de osteoartrites, algumas técnicas foram desenvolvidas, sendo as principais delas a estimulação cirúrgica de medula e o implante de células [1]. A primeira incita uma resposta natural do organismo, porém gera fibrocartilagem, que não apresenta a elasticidade da cartilagem natural e tende a se degradar com relativa rapidez [2]. A segunda possui melhores resultados, e conta com a injeção de células-tronco e células de tecido articular cartilaginoso no local lesionado. Estas células podem ser ou não incorporadas em suportes estruturais, como arcabouços e hidrogéis feitos de biomateriais. Os biomateriais utilizados para a produção tanto do arcabouço quanto do hidrogel devem possuir propriedades específicas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de adequada toxicidade, porosidade e propriedades mecânicas similares às do tecido do local onde será implantado.

Hoje, os principais materiais utilizados na produção de arcabouços são polímeros biocompatíveis de procedência natural, como o poli(hidróxido butirato), a quitosana, o ácido hialurônico, o colágeno e o poli(ácido lático). Também apresenta grande relevância neste contexto o poliéster sintético policaprolactona (PCL). O PCL é um polímero semi-cristalino, biocompatível e biodegradável e tem sido cada vez mais utilizado na engenharia de tecidos. Ele possui uma taxa de degradação demorada, compatível com a formação de um novo tecido, e possui características

mecânicas que permitem a produção de uma matriz adequada para a adesão, proliferação e futura diferenciação de células.

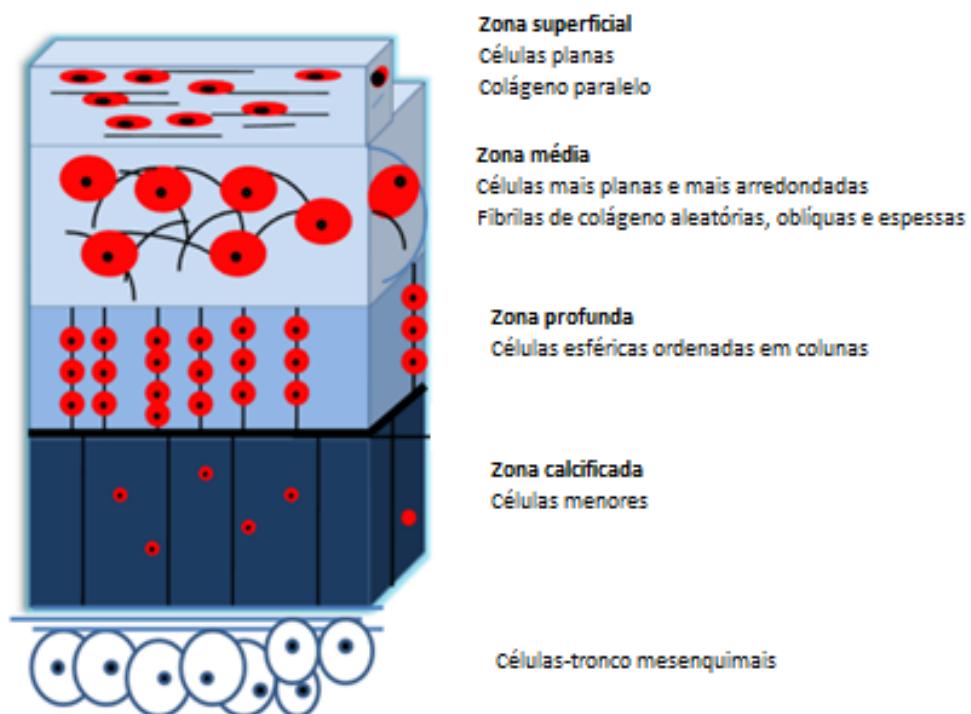
Além da escolha correta do material a ser utilizado para a fabricação de arcabouços para a regeneração de tecidos, é preciso considerar as características micro e macroscópicas do arcabouço em questão, que influenciam no mecanismo de degradabilidade. Assim, faz-se necessário conhecer a estrutura do polímero utilizado (composição química, massa molecular, cristalinidade, morfologia etc.), bem como o tamanho, formato e porosidade do arcabouço produzido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CARTILAGEM ARTICULAR E OS SEUS TRATAMENTOS

A cartilagem articular é uma espécie de membrana que reveste articulações e ossos. Assim, as principais funções deste tecido é facilitar a articulação e distribuir uniformemente as cargas para o osso subjacente, de forma a permitir que a articulação possa se movimentar garantindo uma certa resistência ao desgaste e absorção de choque com baixo atrito. Este tecido tem aproximadamente de 3 a 4 mm de espessura e é dividido em 4 zonas (Figura 1), de acordo com a estrutura e composição da matriz extracelular (MEC), bem como do formato e arranjo das células presentes. Possui coloração esbranquiçada, porque é um tecido não vascularizado.

Figura 1. Organização das zonas do tecido de cartilagem articular.



Fonte: referência [3]

Na camada mais superficial encontram-se células planas e fibrilas de colágeno paralelas. A zona média, abaixo da superficial, é composta por células planas, porém

mais arredondadas, e fibrilas de colágeno grossas e aleatoriamente oblíquas. A zona seguinte, chamada zona profunda, é composta por células esféricas ordenadas em colunas e a última zona (zona calcificada) possui células menores.

Os tecidos de cartilagem articular apresentam um comportamento anisotrópico em alguns testes mecânicos, como o da tração (Tabela 1). Sob grandes tensões de deformação, a elasticidade linear do tecido torna-se inválida, e o comportamento da fase sólida passa a ser mais bem representado por um modelo de material viscoso e hiper elástico.

Tabela 1. Propriedades mecânicas do tecido de cartilagem articular (independente da zona)

Propriedades mecânicas	Cartilagem articular
Módulo de tração (a 10% ϵ)	5-27 MPa
Módulo de relaxamento de equilíbrio	6,5-45 MPa
Alongamento para quebrar	80%
Tensão de tração final	15-35 MPa
Módulo do agregado de compressão de equilíbrio	0,1-2,0 MPa
Permeabilidade hidráulica	$0,5-5 \cdot 10^{-15} \text{ m}^4/\text{N.s}$
Módulo de Young intrínseco na compressão	0,4-0,8 MPa
Força compressiva	14-59 MPa
Módulo de cisalhamento de equilíbrio	0,05-0,25 MPa

Fonte: referência [3]

2.1.1 TIPOS DE TRATAMENTOS USANDO OU NÃO A BIOENGENHARIA

Apesar de não existir cura ou recuperação total da normalidade da articulação no caso de OA em equinos, os profissionais têm meios para amenizar os sinais clínicos e trazer conforto para o animal. Entre os tratamentos estão as infiltrações, uso de medicação anti-inflamatória, mesoterapia e manejo nutricional, por exemplo. Além da terapia clássica, são também abordadas novas terapias, tais como as ondas de choque, a terapia por meio de células mesenquimatosas e a terapia genética, com o objetivo de encontrar formas de tratamento com uma prolongada atividade biológica.

e, portanto, mais eficazes que as terapias clássicas. Alguns tipos de tratamentos são descritos a seguir [4].

2.1.2 ANTI-INFLAMATÓRIOS

Os corticóides são os agentes anti-inflamatórios mais potentes usados no tratamento da OA. Normalmente são injetados diretamente na articulação afetada, diminuindo processos inflamatórios *in locu*. Apesar dos efeitos benéficos, é preciso também avaliar seus efeitos secundários na cartilagem do local. A administração de altas concentrações destes medicamentos repetidamente promove um efeito negativo na estrutura do colágeno da cartilagem articular, e por isso eles devem ser prescritos em baixas quantidades e por pouco tempo [5].

2.1.3 CÉLULAS TRONCO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células-tronco adultas, pertencentes ao mesênquima, um tecido embrionário. Elas se diferenciam em muitos tipos diferentes de células e são importantes na regeneração do tecido. Estas células podem ser inseridas no local desejado através do uso de arcabouços. Assim, elas entram em contato com o tecido local, contribuem para sua regeneração e ainda apresentam a vantagem de não promover a formação de tecido de cicatrização, que normalmente está associado ao processo de recuperação.

Acredita-se que as CTMs exerçam seus efeitos terapêuticos por vários mecanismos. Na OA, mais do que a habilidade de se diferenciarem em outros tipos de células, é de interesse sua capacidade de se abrigar nos locais inflamados após lesão e de liberar múltiplas moléculas bioativas capazes de estimular a recuperação de células lesionadas, eliminar a inflamação e exercer funções imunomoduladoras [6].

Alguns dos estudos realizados *in vivo* com articulações de equinos com osteoartrite apresentam resultados promissores, enquanto outros não observaram

melhora significativa nos parâmetros avaliados [6]. A heterogeneidade de resultados nestes estudos não é incomum, tendo em vista que a variabilidade de fatores relacionados ao tecido lesionado, características do tratamento com CTMs e métodos de avaliação funcionam como grandes variáveis do processo. Outro fator limitante dos estudos *in vivo* com CTMs em articulações de equinos é o alcance de um número adequado de animais com características homogêneas de causalidade e estado lesional, para obtenção de poder de teste com a distribuição nos grupos controles.

2.1.4 TERAPIA GENÉTICA

A terapia genética consiste na produção de uma proteína antagonista de determinados receptores biológicos, que impede algumas interações específicas e diminui a dor e a inflamação articular. Dessa forma, cria-se condições para uma recuperação da funcionalidade articular de maneira mais rápida e eficaz. O potencial valor da terapia genética no tratamento da doença articular é, em parte, baseado nas limitações da terapia tradicional, a qual tem sido parcialmente ineficaz no que se refere em fazer os agentes terapêuticos penetrarem diretamente na articulação, quando estes não são administrados por via intra-venosa (IV).

Na terapia tradicional, o tempo de semi-vida da maioria dos agentes administrados por via intra-articular (IA) é curta, sendo necessárias frequentes administrações para sustentar a atividade biológica do fármaco por longos períodos de tratamento. Todas estas condicionantes da terapia tradicional podem vir a ser contornadas com o uso da terapia genética. Ela fornece uma excelente alternativa em relação à terapia tradicional, uma vez que uma única administração de uma proteína antagonista na articulação afetada pode resultar na produção de uma proteína terapêutica específica, por um longo período [5].

2.2 AR CABOUÇOS DE BIOMATERIAIS

Arcabouços são estruturas de suporte usadas na engenharia de tecidos para fornecer um crescimento tridimensional de células, de maneira organizada. São críticos, tanto nos processos *in vitro* quanto *in vivo*, pois possuem diversos propósitos: permitem a adesão de células, bem como sua proliferação e diferenciação; retêm

células e fatores de crescimento, possibilitando a difusão de nutrientes e oxigênio nas células; e cria um ambiente mecanicamente e biologicamente apropriado para a regeneração organizada de tecidos.

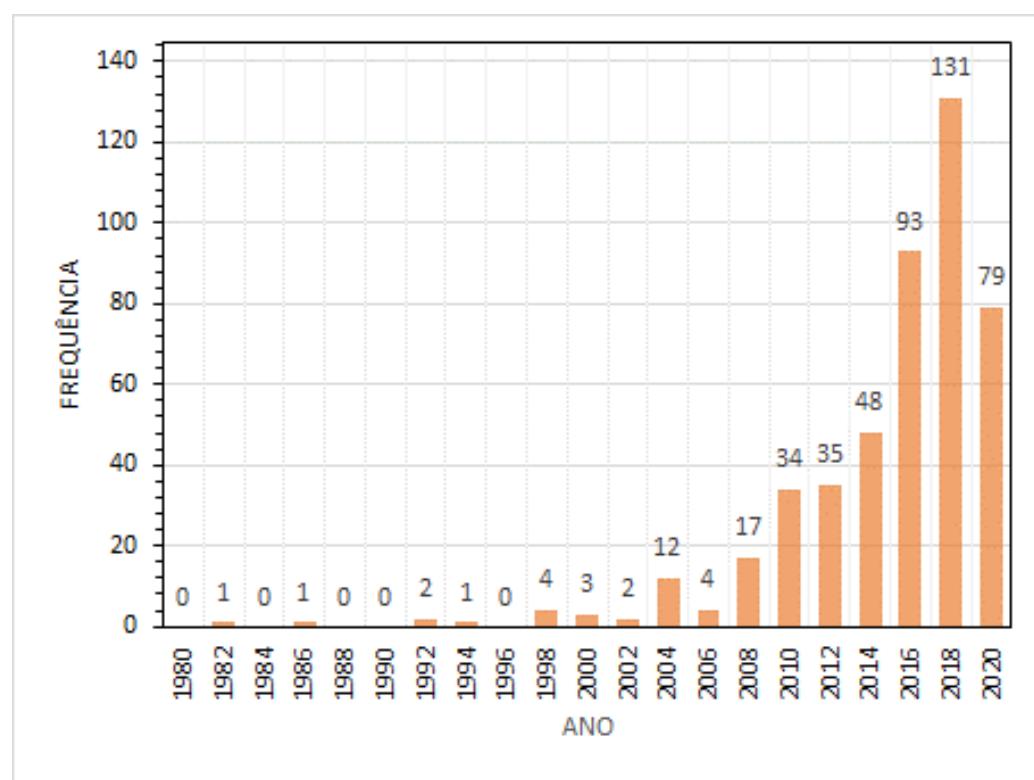
O arcabouço ideal deve ser biocompatível – isto é, não deve criar respostas adversas pelo tecido hospedeiro -; biodegradável em produtos atóxicos, com uma taxa de degradação controlada; e deve possuir uma estrutura micro/macroestrutural otimizada, capaz de garantir, ao mesmo tempo, uma vascularização adequada e força mecânica suficiente para lidar com as tensões aplicadas no tecido original. Também deve ser obtida uma superfície com topografia apropriada, para promover interações célula-célula e célula-matriz. A superfície do arcabouço deve conter irregularidades na dimensão de nanômetros, para viabilizar estas interações. A dimensão de micrômetros já é grande demais e impede a otimização das interações entre células e matriz. O estudo de [7] fabricou arcabouços de PCL com irregularidades na dimensão de nanômetros e, através de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), confirmou que houve adesão de células, tanto na superfície externa do arcabouço quanto na interna.

Sob a perspectiva da biomecânica, os arcabouços projetados para cultivar especificamente tecido de cartilagem articular devem se comportar como um compósito permeável e apresentar propriedades não homogêneas, anisotrópicas, não lineares e viscoelásticas, a fim de se aproximar das reais propriedades do tecido. Os arcabouços utilizados para cultivo de tecido articular cartilaginoso também devem ser porosos e interconectados, para que as células possam migrar e penetrar os interstícios.

2.3 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE AR CABOUÇOS

O tema de bioimpressão, necessária para a produção de arcabouços, foi pouco explorado até o final da primeira década deste século. Porém, por volta de 2015 as contribuições neste ramo de pesquisa começaram a ser bastante expressivas. O gráfico apresentado na Figura 2 mostra o número de referências neste tema ao longo dos anos. Percebe-se que é um tema atual com ainda pontos a serem explorados.

Figura 2. Publicações sobre bioimpressão por 40 anos a partir de 1980.

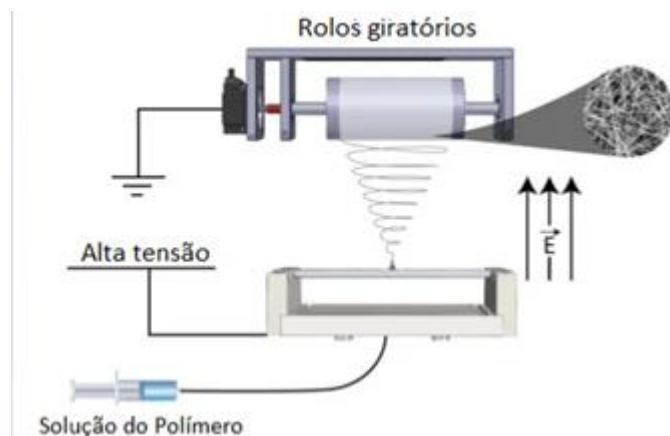


Fonte: autoria própria

2.3.1 ELETROFIAÇÃO

Eletrofiação, do inglês, *electrospinning* (EPS) é o método mais utilizado para produzir nanofibras poliméricas, que podem ser utilizadas na fabricação dos arcabouços em estudo. Este método é composto por três partes: a fonte de alimentação de alta tensão, o receptor e a solução fornecida ao sistema.

Figura 3. Esquema da técnica de eletrofiação



Fonte: referência [8]

A técnica EPS (Figura 3) consiste em colocar uma solução de polímero em uma seringa que é pressionada para a ponta através de uma bomba de difusão. O aumento gradual da alta tensão vinda da fonte faz aumentar também o campo elétrico no local, e este fará com que a gota na ponta da seringa se estique gradualmente nos chamados *spinners* (rolos giratórios aterrados com carga oposta). Quando o solvente evapora, as nanofibras do polímero utilizado na seringa são depositadas ao redor do *spinner*. O uso deste método para fabricação de arcabouços de poli(hidroxi alcanoato) (PHA) na seringa mostrou melhorar as propriedades mecânicas, a taxa de biodegradação e a interação entre o PHA e as células [9]. Mostrou-se também em [9] que nanofibras feitas através do método EPS com tamanho de 10 a 10.000 nm melhoraram as propriedades mecânicas e diminuíram a cristalinidade do PHA, enquanto simularam a estrutura e função da matriz extracelular humana (MEC), o que contribui para sua biocompatibilidade. Este método, portanto, mostra-se muito eficiente para a produção de arcabouços para aplicação na regeneração de tecidos.

2.3.2 TIPOS DE IMPRESSÃO 3D

Outro método de produção dos arcabouços em questão é a impressão 3D. Esta tecnologia é capaz de criar construções para tecidos complexos através da colocação precisa de hidrogéis carregados de células em uma estrutura feita camada por camada. De acordo com [10], os sistemas de bioimpressão mais usados são baseados em jato, extrusão e transferência direta induzida por laser (LIFT).

O método de jato produz gotas em escala de picolitros, imprimindo com resolução de 20 a 100 µm. Métodos de extrusão utilizam um sistema de seringa e pistão para dispensar o material através de bicos de microescala, podendo produzir estruturas mais estáveis que as feitas pelo método do jato, já que na extrusão é possível utilizar altas concentrações de hidrogéis, como alginato e fibrina. No entanto, é difícil construir grandes estruturas de tecido de forma livre devido à integridade estrutural inadequada, estabilidade mecânica e capacidade de impressão. Já o método LIFT pode imprimir células com precisão em construções relativamente pequenas, mas requer gelificação de hidrogéis para obter alta resolução dos padrões

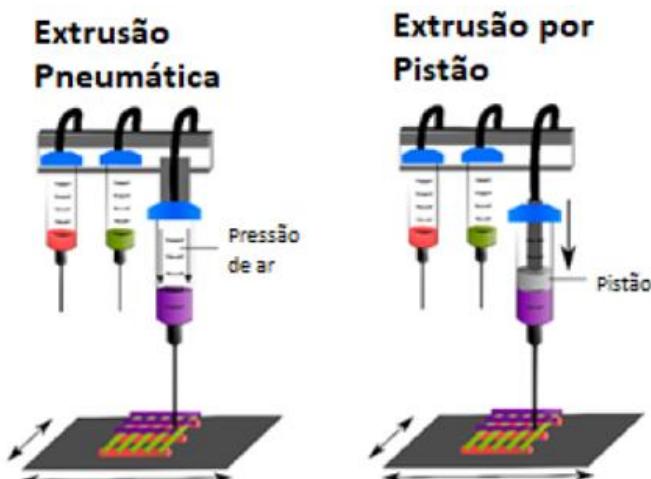
impressos, o que resulta em baixas taxas de fluxo. No geral, o alto custo, as longas jornadas de trabalho e a falta de condições para a produção em massa são as principais desvantagem para a aplicação da tecnologia de impressão 3D na produção de arcabouços.

2.4 SISTEMAS BASEADOS EM EXTRUSÃO DE MATERIAIS

As bioimpressoras de extrusão funcionam com base na distribuição de um filamento contínuo de biotinta para gerar estruturas 3D feitas camada por camada. Este tipo de impressora pode ser classificada em pneumática ou mecânica, a depender do mecanismo de acionamento utilizado para dispensar a tinta. As bioimpressoras pneumáticas utilizam pressão de ar para promover a extrusão de biotintas, e por isso permitem melhor controle de pressão e pulso de frequência, o que é vital para impressões de alta precisão.

Bioimpressoras mecânicas podem ainda ser divididas entre aquelas que utilizam um sistema de acionamento por pistão e as que são acionadas por parafusos (Figura 4). Ambas utilizam o deslocamento – do pistão ou do parafuso – para acionar a extrusão. Tanto as impressoras pneumáticas quanto as mecânicas com mecanismo de pistão são muitas vezes preferidas para a extrusão de biotintas carregadas de células. Esta última, porém, apresenta maior grau de controle sobre a taxa de fluxo de biotintas em comparação com configurações pneumáticas.

Figura 4. Esquemas de plataformas baseadas em extrusão: pneumática à esquerda e assistida por mecanismo de pistão à direita



Fonte: referência [11]

2.4.1 REQUISITOS DOS MATERIAIS

Os materiais utilizados para extrusão muitas vezes requerem propriedades mecânicas específicas, para facilitar o controle sobre sua deposição. Por isso, a viscosidade e os mecanismos de gelificação são de grande importância. Tintas de hidrogéis carregadas com células devem ser viscosas o suficiente para permitir o armazenamento e carregamento em um cartucho de impressão, sem vazamento e evitando a sedimentação celular. Segundo [11], os valores de viscosidade de uma biotinta variam, mas devem estar entre o intervalo de 30 mPa·s (limite inferior) e 25×10^3 mPa·s (limite superior) para ser considerado adequada para impressão.

A aplicação de pressão, e consequentemente de uma força no cartucho de biotinta, faz com que a viscosidade do material diminua, dispensando-o na plataforma de construção. Depois de extrudado, o material volta a apresentar uma viscosidade maior, à medida em que a força é retirada, permitindo o controle sobre o fluxo do material e maximizando a resolução do produto.

2.4.2 RETICULAÇÃO DURANTE A EXTRUSÃO

A gelificação controlada durante a extrusão é uma estratégia que tem sido aplicada com sucesso para melhorar a complexidade e a fidelidade da forma de construções bioimpressas. Para fazer este controle, é possível manipular as propriedades reológicas das biotintas de baixa viscosidade, melhorando sua capacidade de impressão ao promover baixos graus de reticulação covalente.

Outra abordagem comum é modificar quimicamente as biotintas em polímeros fotopolimerizáveis antes da extrusão. Isso pode ser feito com a adição de grupos funcionais fotoativos, como os metacrilatos, por exemplo. Assim, é possível permitir a cura do material com luz ultravioleta (UV) durante a impressão. Para viabilizar este método, é possível projetar o sistema de impressão para adicionar uma fonte de luz que pode irradiar a biotinta através de um bocal transparente utilizando luz UV ou visível. Este método também é conhecido como reticulação *in situ* e é capaz de melhorar o fluxo de material, a estabilidade do filamento e permite o uso de uma ampla gama de materiais.

Alternativamente, a biotinta pode ser extrudada diretamente em um banho de reticulante para promover a reticulação física ou química após a deposição. Outra forma é fazer a impressão simultânea da biotinta com o reticulante em um sistema coaxial. Estes mecanismos podem melhorar drasticamente a resolução de impressão, mas também podem limitar a integração entre as camadas impressas, principalmente em se tratando de materiais que sofrem gelificação rápida. Neste caso, uma camada pode passar por uma gelificação completa antes que a próxima seja depositada. Com isto, as estruturas resultantes são muitas vezes mais fracas, questionando a viabilidade de serem usadas para modelagem de tecidos.

2.4.3 REFORÇO DE COEXTRUSÃO

Outra técnica que tem sido explorada para melhorar a resolução de impressão e facilitar a criação de estruturas em camadas é a coextrusão, ou reforço termoplástico. Recentemente esta técnica tem sido estudada como ferramenta para gerar construções híbridas contendo hidrogéis de baixa viscosidade. Ela é baseada na deposição simultânea ou alternada de materiais estruturais ou carregados de células.

Uma das abordagens deste método é a combinação de uma biotinta de hidrogel carregada de célula com um material termoplástico mais rígido e sem a presença de células, como a policaprolactona (PCL). De modo geral, a camada de termoplástico é extrudada via pistão ou parafuso e é deixada para resfriar antes da deposição da camada subsequente de hidrogel, que é feita via extrusão pneumática ou de pistão. Isto permite a criação de uma camada híbrida, sendo o termoplástico o agente controlador do fluxo de hidrogel. Como resultado, obtém-se uma construção com melhor performance mecânica e estrutural.

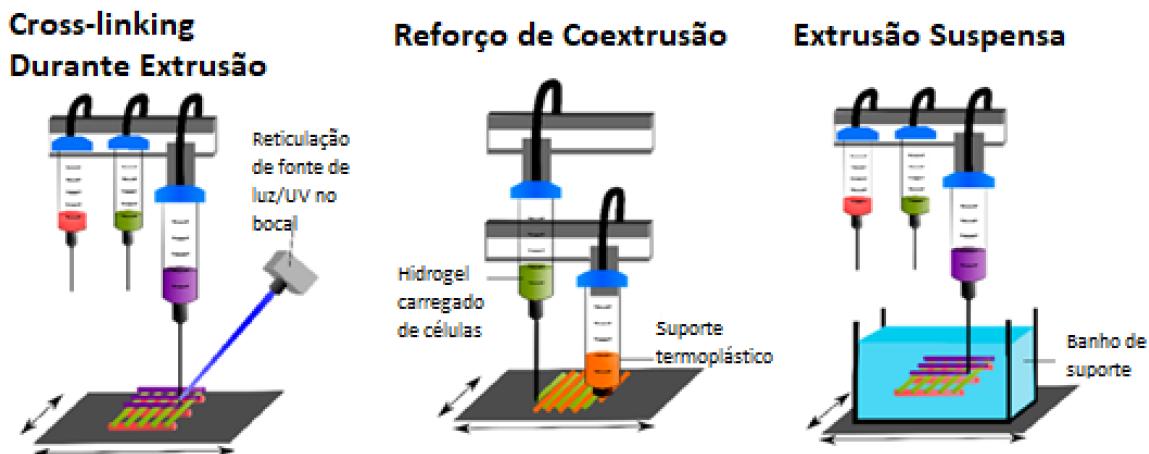
Segundo [11], o uso do PCL permite a impressão de modelos estruturais bem definidos, com um processamento a baixas temperaturas (aproximadamente 60 °C) e rápidas taxas de solidificação, o que é benéfico para a viabilidade das células encapsuladas nas tintas. No entanto, as dimensões dos filamentos impressos – que geralmente são de centenas de micrômetros – limitam a criação de interfaces eficazes entre o termoplástico e o hidrogel. Portanto, outra abordagem interessante envolve o

uso de mecanismos pneumáticos ou acionados por pistão para depositar alternadamente duas biotintas com diferentes propriedades mecânicas. Este método permite mitigar alguns dos problemas em torno da interface entre os dois materiais, ao mesmo tempo em que melhora a difusão de oxigênio e nutrientes para as células encapsuladas nas tintas, tanto em implantes de tecido mole quanto nos de tecido duro.

2.4.4 EXTRUSÃO SUSPENSA

Diversos grupos de pesquisa começaram a explorar a extrusão de biotintas em um banho de suspensão de hidrogel, que fornece suporte e restrição de fluxo ao longo da gelificação. Este método tem-se demonstrado eficiente para melhorar a resolução e a precisão das estruturas impressas. O hidrogel restringe o fluxo sem interagir e tampouco se misturar com a solução depositada, permitindo a impressão de camadas de materiais com diferentes densidades, formando uma construção de alta resolução. Reticulantes podem então ser introduzidos para promover a gelificação de uma estrutura suspensa, permitindo a geração de estruturas heterogêneas capazes de mimetizar interfaces biológicas (Figura 5).

Figura 5. Esquemas de estratégias para manter a forma de estruturas impressas com hidrogéis facilmente deformáveis



Fonte: referência [11]

2.5 SISTEMAS BASEADOS EM IMPRESSÃO A JATO

A impressão a jato de tinta envolve a deposição, gota a gota, de pequenos volumes de tinta para produzir arquiteturas 3D. A depender do modo de ejeção, as tecnologias de jato de material podem ser classificadas como fluxo contínuo, *drop-on-demand* (DOD), acústico ou impressão de micro válvula. Em sistemas de fluxo contínuo, (*continuous streaming*) (CS), a biotinta é ejetada através de um bocal, produzindo um jato contínuo que se rompe em um fluxo de gotículas como resultado da instabilidade hidrodinâmica. Este processo é espontâneo, o que dificulta o controle sobre o fluxo de biotinta. A fim de aprimorar este ponto, foi desenvolvido o sistema de impressão DOD, para promover um melhor controle sobre a deposição de biotinta.

Sistemas DOD, ou seja, bioimpressão por jato de tinta ou depósito sob demanda, funcionam com os mesmos princípios do CS, mas as gotículas de biotinta são formadas apenas quando necessário. A tinta é mantida armazenada até um atuador piezoelétrico ou térmico gerar pressão suficiente para superar a tensão superficial presente no orifício do bocal e forçar a ejeção de pequenas gotas de biotinta. Este método permite a formação de estruturas com boa resolução, o que não seria possível via CS, embora o tempo de impressão seja maior neste caso.

2.5.1 REQUISITOS DOS MATERIAIS

Nas impressões a jato, os bicos das impressoras são geralmente pequenos, para dispensar gotas da ordem de 10 µm. Consequentemente, as biotintas devem apresentar baixas viscosidades, normalmente na faixa de 10 a 100 vezes a viscosidade da água, o que ajuda a evitar o entupimento do bocal, mas restringe o uso de altas densidades celulares. Embora os limites de viscosidade possam variar, segundo [11] geralmente é aceito que uma baixa viscosidade de 30 mPa·s representa o limite superior do que é imprimível em um sistema de jato sem causar danos às células utilizadas na impressão.

2.5.2 JATEAMENTO PIEZOELÉTRICO

Sistemas piezoelétricos ejetam gotículas de biotinta usando um atuador de cerâmica policristalina colocado dentro da câmara de fluido da cabeça de impressão (Figura 6). Um pulso de tensão desencadeia uma mudança na forma do atuador, resultando na deformação da câmara de fluido com uma variação subsequente no volume da câmara. Esta mudança repentina envia uma onda de pressão que permite que as gotículas de biotinta dentro da cabeça de impressão superem a tensão superficial no orifício do bocal, sendo, portanto, ejetadas.

Este método, porém, foi reportado como responsável pelo comprometimento da viabilidade das células, já que se demonstrou que os pulsos de tensão danificam a integridade das membranas celulares, desencadeando a morte celular. Por isso, o jateamento térmico é preferível sobre o com sistema piezoelétrico.

2.5.3 JATEAMENTO TÉRMICO

No jato térmico, uma bolha de vapor é gerada dentro da câmara de fluido devido ao aquecimento fornecido por um atuador térmico (Figura 6). A bolha se expande, reduzindo rapidamente o volume dentro da câmara. Quando a bolha colapsa, o pulso de pressão resultante aciona a ejeção de gotículas de biotinta através do bico de impressão, enquanto aplica, simultaneamente, calor às gotas. Este método é popular para bioimpressão baseada em células, particularmente em aplicações que requerem altos níveis de controle sobre a orientação espacial das células.

2.5.4 JATEAMENTO BASEADO EM MICRO VÁLVULAS

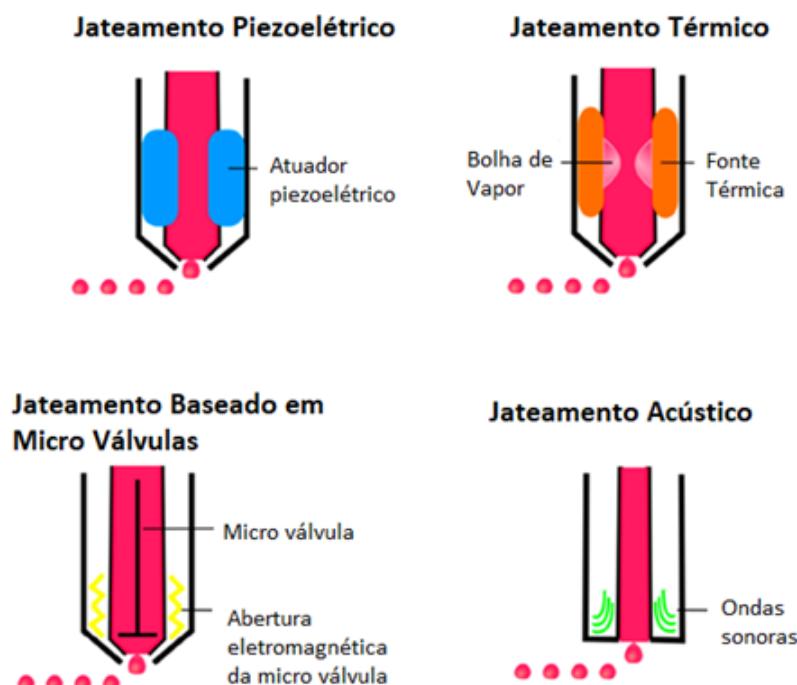
Os sistemas de jateamento baseados em micro válvulas são geralmente compostos por uma ou mais cabeças de impressão acopladas a um mecanismo robótico que pode se mover nos eixos x, y e z. Uma micro válvula eletromecânica compreendendo uma válvula solenoide e um êmbolo está presente dentro de cada cabeça de impressão, entre o cartucho de biotinta pressurizado e o bocal (Figura 6). Após a aplicação de um pulso de tensão, o solenoide gera um campo magnético que empurra o êmbolo para cima e abre o bico, permitindo a ejeção do material. A

possibilidade de controlar com precisão a frequência e o tamanho das gotículas extrudadas faz com que este método resulte em uma deposição de biotinta altamente controlada, permitindo a extrusão de camadas de material tão finas quanto 1 a 2 μm .

2.5.5 JATEAMENTO ACÚSTICO

Sistemas de jatos acústicos diferem-se dos métodos relatados anteriormente devido à ausência de um bocal de impressão que define o tamanho da gota de biotinta a ser extrudada. Isto porque os bicos são propensos a entupimento, particularmente com fluidos de alta viscosidade. Assim, a ausência de um bico pode ampliar a gama de materiais processáveis neste tipo de impressora. Neste método, as gotas de biotinta são ejetadas de uma interface ar-líquido através de uma força acústica aplicada por um campo de ultrassom. A ejeção ocorre quando a pressão acústica excede a energia de superfície do líquido, e assim materiais com alta viscosidade, de até 150 mPa·s, podem ser dispensados. O jateamento acústico, porém, possui aplicações de bioimpressão limitadas, já que esta tecnologia é recente e está no início de seu desenvolvimento (Figura 6).

Figura 6. Esquemas para as diferentes plataformas utilizadas na bioimpressão.



Fonte: referência [11]

2.6 FOTOPOLIMERIZAÇÃO EM CUBA

Outra técnica comumente aplicada à bioimpressão de hidrogéis carregados de células é a fotopolimerização em cuba, sendo o tipo mais comum a estereolitografia (SLA). Esta tecnologia é geralmente composta por uma plataforma de construção, uma cuba de resina fotopolimérica e uma fonte de luz que irradia a resina, endurecendo-a camada por camada (Figura 7). Galvanômetros são usados para escanear a superfície da resina com luz ultravioleta (UV), infravermelho ou feixe de laser de luz visível de alta resolução. Nas regiões escaneadas, o laser inicia uma reação de fotopolimerização, espacialmente controlada pela plataforma de construção. Por fim, há a solidificação do líquido da resina. Uma vez que a primeira camada é construída, a plataforma de construção desce para dentro da cuba, sendo recoberta homogeneamente com resina e outra camada é construída em cima da anterior.

2.6.1 REQUISITOS DOS MATERIAIS

A utilização do SLA para processos de bioimpressão não impõe requisitos reológicos nos materiais utilizados, como ocorre no caso da extrusão e da impressão a jato. Com o método SLA, uma gama muito maior de viscosidades de materiais pode ser usada, sendo o valor de 5 Pa·s considerado o limite superior [11]. Em relação ao limite inferior, não há um valor definido, porém é amplamente aceito que o material deve ser suficientemente viscoso para evitar a sedimentação das células durante o processo de cura.

O processo de SLA geralmente envolve a modificação de hidrogéis para conter grupos químicos que podem facilitar a reticulação fotoinduzida do material. Essa reação de reticulação é iniciada pela clivagem da molécula fotoiniciadora após ser exposta à luz. Os comprimentos de onda da luz usada na fonte têm que coincidir com os do fotoiniciador empregado. O resultado é a rápida formação de uma rede polimérica organizada, que permite a obtenção de estruturas de hidrogel de maior resolução do que aqueles normalmente obtidos a partir de impressão por extrusão. No entanto, este processo pode comprometer a viabilidade das células utilizadas.

Diversos estudos relataram os efeitos citotóxicos dos radicais livres e alterações de pH. Além disso, a exposição à luz UV pode causar danos consideráveis no DNA dentro das células biompressas. Como uma alternativa, para não impactar a viabilidade das células encapsuladas no material a ser polimerizado, é possível utilizar fontes de luz no espectro visível para fotopolimerizar as biotintas, desde que seja utilizado um fotoiniciador que absorva a parte visível do espectro (Figura 7).

2.6.2 POLIMERIZAÇÃO DE Dois FÓTONS

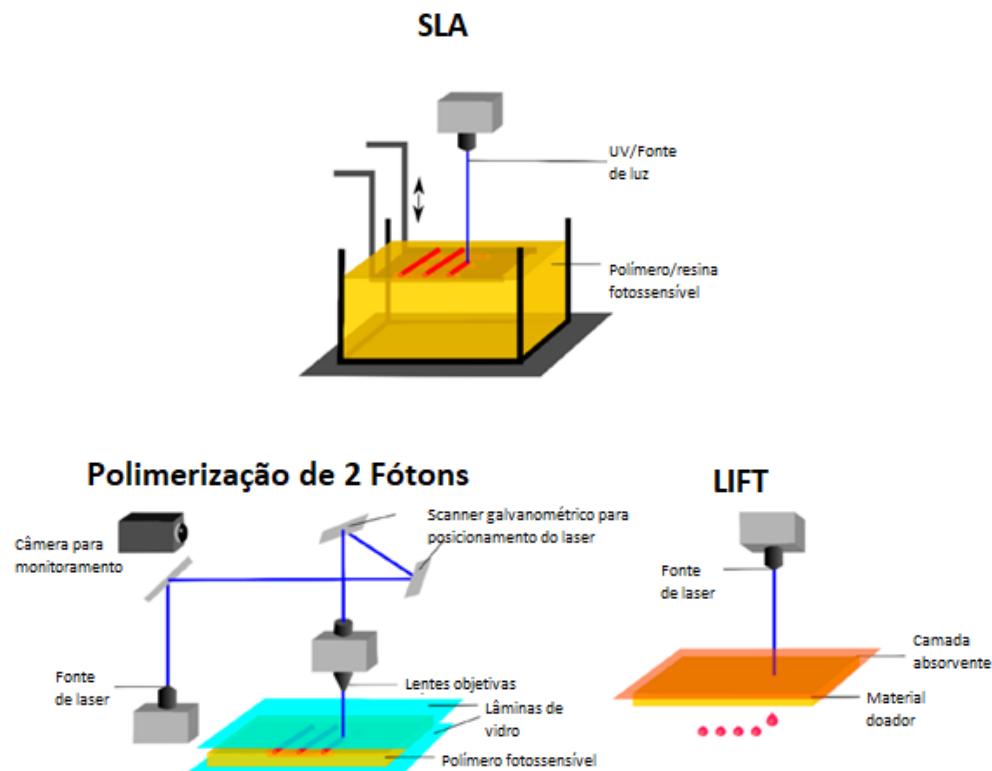
A polimerização de dois fótons, do inglês *2 Photon Photopolymerization* (2PP), baseia-se no processo de SLA, porém adicionando a capacidade de controlar com precisão o espaço e tempo do processo de polimerização das resinas. Com isto, é possível criar construções de alta resolução. Assim como ocorre no método de SLA, o 2PP envolve a aplicação de feixes de luz focados para desencadear a fotopolimerização em uma cuba de resina (Figura 7). No entanto, ele emprega um laser pulsado ultrarrápido para gerar um fluxo de fótons que promove a absorção simultânea de dois fótons por uma única molécula, produzindo assim um estado de maior energia na fotopolimerização da resina. Este sistema permite a geração de construções com característica em um nível submicrométrico, resolução não alcançável via técnicas de SLA padrão.

2.7 BIOIMPRESSÃO ASSISTIDA POR LASER

Esta técnica também é conhecida como transferência direta induzida por laser ou LIFT, *laser-induced forward transfer*. As impressoras LIFT têm três componentes principais: uma fonte de laser pulsado, uma fita da qual um material biológico é impresso e um substrato que coleta o material impresso (Figura 7). Semelhantemente ao jateamento acústico e ao SLA, as bioimpressoras LIFT são compostas de uma plataforma de impressão sem bicos. As células são misturadas em um hidrogel e depositadas na superfície de um filme metálico. O pulso de laser induz a vaporização do filme metálico, resultando na produção de um jato líquido, que é depositado no substrato.

Os materiais impressos podem variar de sólidos a líquidos com hidogéis sólidos muitas vezes sendo preferidos para bioimpressão. No entanto, imprimir estruturas carregadas de células utilizando esta técnica é muitas vezes questionado, por conta da viabilidade celular. Durante o processo de impressão, os hidogéis carregados de células são expostos a altos níveis de energia térmica, o suficiente para estudos reportarem 85% de morte celular [11]. Modificações na intensidade e tempo de exposição ao laser são frequentemente empregadas a fim de melhorar a viabilidade celular, mas a técnica LIFT ainda é uma das menos utilizadas para a bioimpressão de modelos de tecido *in vitro*. A Tabela 2 sumariza as informações acerca das técnicas mencionadas neste trabalho, com vantagens, desvantagens e limitações de cada uma.

Figura 7. Esquema das diferentes técnicas de irradiação que podem ser usadas na fotopolimerização em cuba, polimerização de 2 fótons e bioimpressão assistida por laser.



Fonte: referência [11]

Tabela 2. Comparação de técnicas de bioimpressão com base na resolução do produto obtido, nos requisitos reológicos do material utilizado e nas principais vantagens e desvantagens

Plataforma de impressão	Resolução máxima	Viscosidade da biotinta	Principal(is) vantagem(ns)	Principal(is) desvantagem(ns)
Extrusão pneumática/por pistão	~200 µm	$30\text{--}600 \times 10^6$ mPa·s	imprime materiais de alta viscosidade carregados de células de alta densidade imprime polímeros de baixa viscosidade com grande fidelidade permite a produção de estruturas com heterogeneidade mecânica e biológica	grande força de cisalhamento necessária para imprimir pode comprometer a viabilidade celular separação das camadas da estrutura gerada devido à rápida reticulação exige múltiplas cabeças de impressão capazes de extrudar materiais sob diferentes condições
Cross-linking durante a extrusão	~100 µm	$30\text{--}600 \times 10^6$ mPa·s	imprime polímeros de baixa viscosidade com grande fidelidade	separação das camadas da estrutura gerada devido à rápida reticulação
Reforço de coextrusão	~20 µm	$12\text{--}600 \times 10^6$ mPa·s	permite a produção de estruturas com heterogeneidade mecânica e biológica imprime polímeros de baixa viscosidade com alta resolução e controle sobre o fluxo de pós-impressão	exige múltiplas cabeças de impressão capazes de extrudar materiais sob diferentes condições
Extrusão suspensa	~20 µm	5–800 mPa·s	alta resolução e alta velocidade de impressão permitem uma padronização celular rápida	o mecanismo preciso por trás da prevenção do fluxo ainda é mal compreendido
Jateamento piezoelétrico	~45 µm	3,5–30 mPa·s	mais favorável para viabilidade celular que o jateamento piezoelétrico	pulsos piezoelétricos demonstraram-se maléficos para a viabilidade celular
Jateamento térmico	~45 µm	3,5–30 mPa·s	aumenta a faixa de viscosidade para biotintas	pequena faixa de viscosidades de biotintas podem ser utilizadas em comparação com sistemas baseados em extrusão
Jateamento baseado em micro válvulas	~220 µm	1–70 mPa·s	ampla gama de viscosidades de biotinta podem ser utilizadas pois o sistema não possui bocal	alta tensão de cisalhamento pode comprometer a viabilidade celular
Jateamento acústico	~60 µm	1–150 mPa·s	gera estruturas de alta resolução com grande velocidade	distúrbios podem facilmente afetar a ejeção de gotículas
SLA	~1 µm	<5 Pa·s		difícil combinar vários materiais

Plataforma de impressão	Resolução máxima	Viscosidade da biotinta	Principal(is) vantagem(ns)	Principal(is) desvantagem(ns)
Polimerização de 2 fótons	100 nm	<5 Pa·s	a maior resolução para bioimpressão comercialmente disponível	materiais opticamente transparentes são necessários
LIFT	~20 µm	1–300 mPa·s	gera estruturas de alta resolução a partir de biotintas sólidas ou líquidas	pulsos de laser podem impactar negativamente a viabilidade das células, com >15% de morte celular

Fonte: referência [11]

2.8 POLÍMEROS COMO BIOTINTAS NA BIOIMPRESSÃO

Na bioimpressão 3D são utilizadas as biotintas, as quais contêm células vivas, moléculas e/ou biomateriais cuja finalidade é a de mimetizar o ambiente da matriz extracelular (MEC). Esses materiais sejam como polímeros naturais ou sintéticos, apresentam em suas estruturas grupos funcionais que facilitam o processo de reticulação para formar hidrogeis, de forma rápida e fácil, usando luz ultravioleta, visível, ou com outra fonte. Comparativamente aos polímeros naturais, os sintéticos possuem maior controle de propriedades mecânicas e químicas, pois têm a possibilidade de serem sintetizados com propriedades personalizadas (por exemplo, massa molecular e estrutura química) para uma aplicação específica. Eles também podem ser modificados para incluir bioativos, por exemplo, promotores de adesão.

A depender do mecanismo de gelificação, os hidrogéis podem ser classificados em reticulados quimicamente ou fisicamente. Os primeiros são frequentemente preferidos por conta do controle fino que pode ser alcançado sobre a densidade de reticulação, que rege a porosidade e homogeneidade do material em microescala, e consequentemente suas propriedades mecânicas. No entanto, este tipo de hidrogel geralmente exibe um comportamento elástico, que se supõe impedir a migração e proliferação celular. Por outro lado, os hidrogéis reticulados fisicamente exibem um comportamento viscoelástico, permitindo uma melhor disseminação, proliferação e diferenciação celular. A complexidade necessária para a aplicação em biotintas requer, muitas vezes, que haja uma combinação de polímeros de base e de modificações, para alcançar tanto a processabilidade como a resposta biológica desejada.

2.8.1 POLÍMEROS BASE

Polímeros naturais utilizados nas biotintas e tintas de biomateriais podem ser divididos entre proteínas e polissacarídeos. Os polissacarídeos se degradam por hidrólise, que é um processo espontâneo, o qual normalmente leva semanas a meses para ocorrer. O alginato é o polissacarídeo mais utilizado para fins de bioimpressão. Trata-se de um polissacarídeo aniônico obtido das paredes celulares de algas, que é

composto por duas unidades de ácidos urônicos. Ele rapidamente gelifica em contato com soluções contendo cátions bivalentes, tais quais Ca^{2+} ou Sr^{2+} , através de reticulação iônica à temperatura ambiente. Essas condições favoráveis de gelificação são vantajosas para encapsular células. No entanto, este polissacarídeo é inadequado para fixação celular e muitas vezes tem que ser modificado com frações que promovem esta adesão celular.

Ácido hialurônico (HA) e quitosana são outros exemplos de polissacarídeos com ampla aplicação em bioimpressão. O HA é abundante na MEC dos tecidos conjuntivos, e é um componente do líquido sinovial, responsável por reduzir o atrito entre a cartilagem das articulações e a estrutura óssea durante o movimento. O HA estabelece fortes interações com a água, através de ligações de hidrogênio por meio de seus grupos hidroxila, carboxila e acetila. Juntamente com a sua alta massa molecular, isto torna suas soluções aquosas altamente viscosas. Ele também é conhecido por sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, essenciais para utilização como arcabouço. Apresenta, no entanto, baixa estabilidade *in vivo*, e por isso sua estrutura é geralmente modificada antes de ser utilizado na bioimpressão 3D.

A quitosana, por sua vez, é um polissacarídeo catiônico linear obtido a partir da desacetilação alcalina da quitina, polissacarídeo encontrado em artrópodes e fungos, bem como em alguns vertebrados como peixes, por exemplo. A quitosana é caracterizada pela presença de numerosos grupos hidroxila, ácido carboxílico e amina, tornando-a atraente para modificação química para aumentar sua bioatividade, e portanto, a sua participação em reações biológicas específicas.

Polímeros sintéticos são a outra classe de materiais com alta relevância para a bioimpressão. Os polímeros utilizados para este fim são solúveis em água, bioinertes e não biodegradáveis. Devido à esta natureza não biodegradável, eles são tipicamente sintetizados com uma massa molecular baixa o suficiente para permitir a depuração renal.

2.9 ARCABOUÇOS A BASE DE PCL

Arcabouços usando o PCL como polímero base vem sendo utilizados na forma pristina, isto é, sem alterações, ou após a sua modificação pela mistura com outro polímero, na adição de nanopartículas, ou no seu revestimento com hidrogel. O PCL é um polímero de poliéster frequentemente usado como material de suporte na engenharia de tecidos, já que seu tempo de degradação é longo, chegando até três anos. Ele é biocompatível e possui excelente resistência mecânica. No entanto, alguns relatos demonstraram que houve fraca adesão celular ao arcabouço de PCL pristina [12], e por isso, são estudadas tentativas de melhorias em sua composição.

2.9.1 *PCL+COLÁGENO E PCL+GELATINA*

A modificação da superfície do PCL com colágeno ou gelatina melhora a sua hidrofilicidade, portanto, a sua absorção de água; e a resistência mecânica de sua estrutura original. Na literatura [12] foi mostrado que os arcabouços de PCL modificados com colágeno foram melhores para a aplicação de engenharia de tecido cartilaginoso em termos de proliferação celular e de produção de MEC. Esta matriz consiste em uma rede complexa de cadeias de polissacarídeos secretados pelas células, incluindo principalmente colágeno, e garante a manutenção física celular.

A interação inicial entre as células e o polímero do arcabouço é extremamente importante, principalmente no início do tratamento de regeneração tecidual; assim, é fundamental que o material utilizado no arcabouço contribua com esta interação. Desta forma, a aplicação do PCL nestas estruturas pode exigir algumas melhorias, como a adição de colágeno ou gelatina em sua superfície.

O colágeno é a proteína mais abundante do corpo humano e tem sido amplamente utilizado para melhorar a interação célula-material de arcabouços usados na engenharia de tecidos. Ele fornece suporte mecânico aos tecidos e serve como fornecedor de substratos bioativos para moléculas de adesão, promovendo a ligação biológica das células.

A gelatina, por sua vez, é uma mistura de polipeptídios derivados da quebra da estrutura do colágeno. Assim como o seu antecessor, a gelatina é capaz de promover

adesão e proliferação celular. Adicionalmente, ela também apresenta ótima biocompatibilidade e baixo custo.

Chen *et al.* [12] avaliaram a proliferação de células e verificaram que o arcabouço de PCL revestido com colágeno mostrou um maior número de células quando comparado ao pristino e ao de PCL com gelatina. Depois de 7 dias de cultivo celular, os autores mostraram que os arcabouços com colágeno obtiveram um maior número de células (77,4%) quando comparado ao PCL pristino; os arcabouços modificados com gelatina, por sua vez, obtiveram 52,4% de aumento celular. Neste estudo, não foi observada uma diferença significativa entre os arcabouços de PCL modificados com colágeno e com gelatina em relação ao aumento celular após 7 dias de cultivo. Porém, após 14 dias, aqueles modificados com colágeno tiveram um maior número de células, mostrando-se melhor em relação a esta propriedade. Por outro lado, as observações por MEV apontaram que a cultura de células *in vitro* nos três tipos de arcabouços apresentou corpos semeados após 2 e 4 semanas. Isto ocorreu mesmo no arcabouço de PCL, que teve o pior desempenho em relação à adesão e proliferação de células. Após 4 semanas foi possível observar uma diferença significativa na deposição de MEC entre os grupos, com regiões escassas na estrutura de PCL puro, enquanto as demais estruturas apresentaram deposições maiores.

Em suma, o estudo em questão mostrou que a modificação da superfície de PCL para a produção de arcabouços pode equilibrar as propriedades menos ideais do próprio material PCL. O colágeno como material de modificação mostrou-se superior à gelatina em termos de fornecimento de suporte para crescimento de células e de estímulo para a secreção de proteínas da matriz extracelular.

2.9.2 PCL+ALGINATO CARREGADO COM MELATONINA

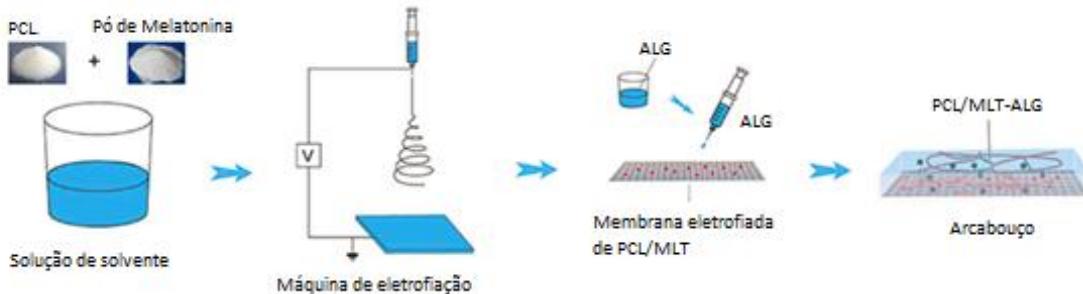
Hidrogéis a base de alginato de sódio podem também ser utilizados na composição de arcabouços de PCL a fim de melhorar seu uso em engenharia de tecido, como exemplificado pelo estudo de Yao *et al.* [13]. Os autores estudaram a aplicação de arcabouços de PCL com alginato na engenharia de tecidos de tendões, e concluíram que esta composição melhora as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade da estrutura. Além disso, o arcabouço desenvolvido foi carregado

com melatonina (MLT), antioxidante natural, e demonstrou-se capaz de reparar lesões em tendões *in vitro* e *in vivo*, através da liberação controlada da MLT.

O alginato (ALG) é um heteropolissacárido natural isolado de algas marinhas, e sua estrutura é semelhante ao glicosaminoglicano, um dos principais componentes da MEC. Na presença de íons bivalentes Ca^{2+} , o ALG evolui para a morfologia física de hidrogel, através de reticulação iônica. Atuando como um polissacárido linear rígido/semi-rígido, as propriedades do ALG determinam em grande parte a morfogênese e a função de vários níveis de materiais naturais ordenados, e por isso tornou-se um dos substratos de hidrogel de maior prestígio no reparo tecidual.

A limitação dos hidrogéis para a reparação de tendões se dá em sua incapacidade para fornecer a resistência biomecânica e a continuidade do tecido necessário em caso de ruptura completa. Assim, a combinação de um arcabouço fibroso com elasticidade mecânica e um sistema de hidrogel capaz de reter células consiste em uma estratégia de desenvolvimento promissora. Simultaneamente, o arcabouço composto de PCL e hidrogel via eletrofiação aprimorou a hidrofobicidade do PCL com contribuição no enriquecimento de diversos nutrientes. Além disso, a estrutura semelhante a um cordão, encontrada nas fibras eletrofiadas, aumenta a rugosidade da superfície do arcabouço, favorecendo a adesão celular e a atividade biológica. A Figura 8 ilustra o processo de fabricação dos arcabouços compostos de PCL/MLT-ALG por [13], e a Figura 9 apresenta uma amostra do arcabouço produzido.

Figura 8. Ilustração esquemática da fabricação do arcabouço de PCL/MLT-ALG



Fonte: referência [13]

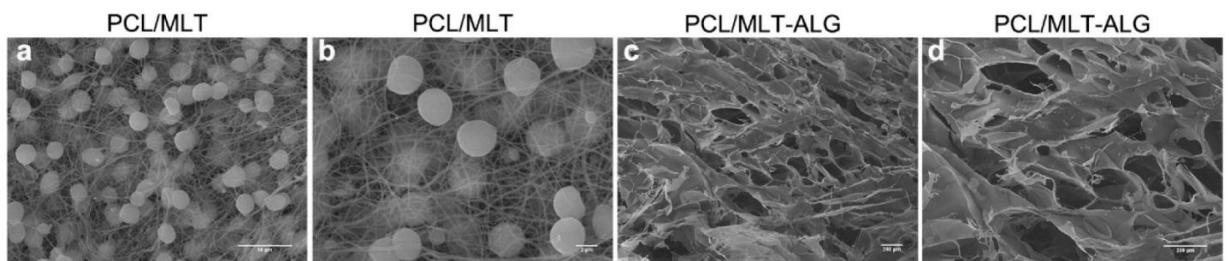
Figura 9. Amostra de PCL/MLT



Fonte: referência [13]

A superfície das membranas eletrofiadas de PCL/MLT apresentam uma estrutura linear e multi-camadas. Já o hidrogel ALG apresenta uma microestrutura de rede tridimensional, alinhada com a microestrutura de hidrogel que é considerada eficaz no campo da regeneração [13]. A Figura 10 mostra as fotomicrografias do MEV das membranas eletrofiadas de PCL/MLT em diferentes amplificações.

Figura 10. Imagens MEV das membranas eletrofiadas de PCL/MLT (a) 5000x, (b) 10.000x; e hidrogel de ALG (c) 100x, (d) 200x.



Fonte: referência [13]

Em relação às propriedades mecânicas dos materiais, o módulo de Young é considerado um medidor importante da rigidez de um material sólido. Segundo Yao *et al.* [13], o modulo de Young de um hidrogel normal é cerca de 2 kPa a 20kPa. A membrana fabricada com PCL/MLT apresentou módulo de Young de $1,5 \pm 0,17$ MPa e o arcabouço completo com PCL/MLT-ALG, $0,38 \pm 0,03$ MPa. O principal motivo desta diferença em relação ao módulo de Young da membrana eletrofiada e o

arcabouço completo pode se dar pelo fato da inclusão do hidrogel ALG alterar a propriedade de elasticidade à tração de alta resistência da membrana eletrofiada. Por causa desta membrana, o módulo de Young do arcabouço se torna maior que o valor relacionado ao hidrogel sozinho e esse resultado sugere que o arcabouço de PCL/MLT-ALG possa simular a dinâmica da mecânica de tendões, constatando-se que a melhoria do PCL com alginato foi benéfica para o uso na engenharia tecidual.

2.9.3 PCL+HIDROGEL GELMA-HAMA

Mukherjee *et al.* [14] avaliaram o comportamento de degradação e biocompatibilidade de arcabouços híbridos de PCL com hidrogel em comparação com aqueles preparados com o PCL pristino. Os estudos foram feitos *in vitro* e *in vivo* em ovelhas, com o objetivo de encontrar soluções que possam auxiliar o tratamento de microtia (má formação congênita do ouvido externo, o qual não se desenvolve por completo durante o primeiro trimestre da gravidez). A utilização de ovelhas se deu por conta de sua anatomia facial ser semelhante à dos humanos. Amostras de PCL e PCL com hidrogel foram submetidas a um ensaio de degradação enzimática acelerada para estudar o comportamento deste processo *in vitro*. Além disso, foi feita uma avaliação de seis meses utilizando ovelhas para comparar a reação biológica do hospedeiro nos dois tipos de arcabouços estudados.

O processo *in vitro* apresentou degradação homogênea entre os arcabouços, sendo o PCL o componente mais influente sobre o volume de degradação. O processo *in vivo* não demonstrou evidências de irritação ou infecção da pele por mais de seis meses com a utilização de ambos os arcabouços, embora aqueles de PCL com hidrogel tenham mostrado níveis mais altos de crescimento de tecido. Assim, concluiu-se que o PCL com hidrogel mais uma vez apresentou melhores condições de ser utilizado na engenharia de tecidos. Também se constatou que arcabouços com maior porosidade contribuem para a criação de um ambiente com menos irritação dos tecidos circundantes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação de propriedades pelo método da contribuição de grupo [15] de uma substância, como o da densidade de energia coesiva e parâmetro de solubilidade, fornece um indicativo da qualidade de interação entre polímero A-polímero B, solvente A-solvente B e polímero-solvente. Este método consiste em uma ferramenta semiempírica, que calcula uma dada propriedade a partir do princípio da atividade, isto é, a propriedade pode ser calculada pela soma individual das contribuições de cada grupo da molécula [15]. Desta forma. Propõe-se fazer uma estimativa do parâmetro de solubilidade de Hildebrand/Hansen (δ_t) (Eq. 1) para o PCL e duas macromoléculas naturais usadas geralmente em hidrogéis que podem participar de um material híbrido tendo um suporte de PCL. O parâmetro δ_t fornece uma estimativa numérica do grau de interação entre os materiais e pode ser uma boa indicação de solubilidade, particularmente para materiais apolares, como muitos polímeros; materiais com valores de δ_t da mesma ordem de grandeza podem apresentar miscibilidade ou compatibilidade.

Como um refinamento, podem ser distinguidos três componentes do parâmetro de solubilidade, representando interações de dispersão (δ_d); polares (δ_p); e de ligações de hidrogênio (δ_h), cujos cálculos são apresentados pelas Eqs. 2, 3, 4, respectivamente.

$$\delta_t = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V} \quad \text{Eq. 2}$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{V} \quad \text{Eq. 3}$$

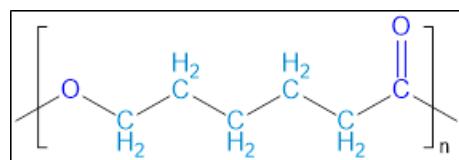
$$\delta_h = \sqrt{\frac{\sum E_{hi}}{V}} \quad \text{Eq. 4}$$

Sendo F_i a contribuição de um grupo presente na molécula; E_{hi} é a energia de ligação de hidrogênio por grupo estrutural, e V o volume molar.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir encontram-se os cálculos dos parâmetros de solubilidade para o PCL, alginato, e colágeno, na hipótese de considera-los para a formulação de um material híbrido para aplicação em cartilagem articular.

4.1 PARÂMETRO DE SOLUBILIDADE DO PCL



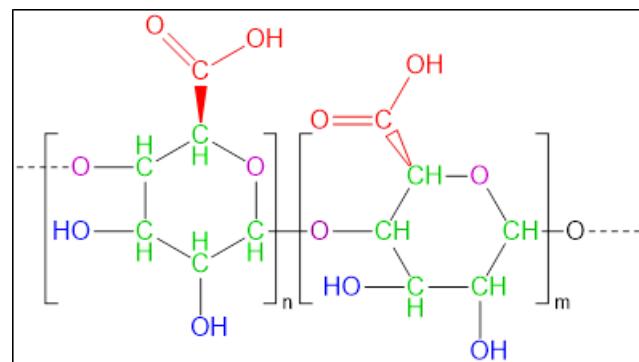
Número de Grupos

-CH ₂ -	5
-COO-	1

Parâmetros de Solubilidade Calculados
(MJ/m³)^{1/2}

δ_d	17,66
δ_p	4,97
δ_h	8,43
δ_t	20,20

4.2 PARÂMETRO DE SOLUBILIDADE DO ALGINATO

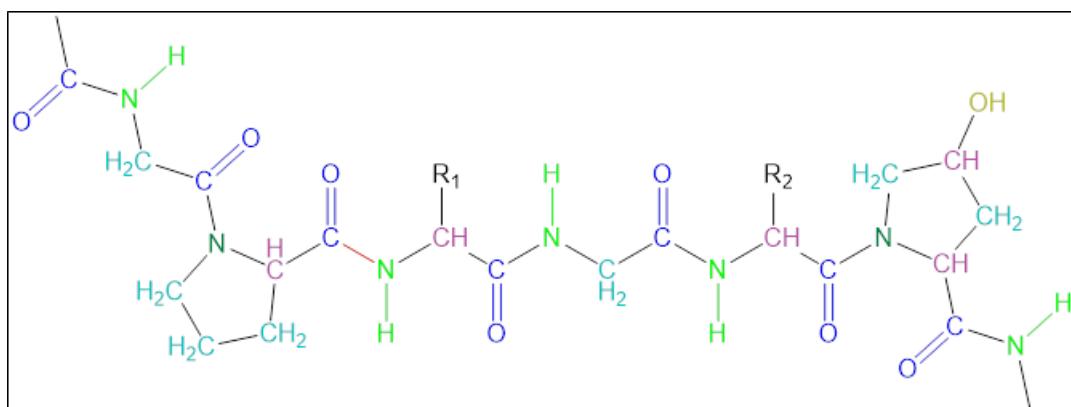


Número de Grupos	
-COOH	1
-CH-	5
-O-	2
-OH	2
anel	1

Parâmetros de Solubilidade Calculados $(\text{MJ}/\text{m}^3)^{1/2}$

δ_d	15,82
δ_p	12,25
δ_h	22,56
δ_t	30,16

4.3 PARÂMETRO DE SOLUBILIDADE DO COLÁGENO



Número de Grupos	
NH	5
CH ₂	7
CO	7
>N-	2
CH	5
OH	1
anel (5)	2

Parâmetros de Solubilidade Calculados (MJ/m ³) ^{1/2}	
δ_d	17,91
δ_p	17,89
δ_h	13,61
δ_t	28,74

Constata-se que o material com parâmetro de solubilidade mais próximo ao do PCL é o colágeno. Isto sugere que ele pode vir a ter melhorias em propriedades mecânicas na formação do material híbrido com o PCL.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível constatar algumas semelhanças em diferentes artigos cujos temas tratam da utilização de arcabouços para a regeneração de tecidos, principalmente no que diz respeito à produção dessas estruturas. Conclui-se que a produção de arcabouços com diferentes materiais que apresentam propriedades complementares é a melhor solução para se obter a estrutura ideal, na qual seja possível cultivar células que serão implantadas em um tecido vivo danificado, a fim de regenerá-lo.

O polímero policaprolactona apresenta propriedades adequadas para uso como arcabouço com fins de regeneração de tecidos, como o da cartilagem articular. Sua boa resistência mecânica e ótima biocompatibilidade o fazem ser o candidato ideal para compor a base de uma estrutura como esta. Elas podem ser feitas de diversas maneiras, baseando-se na eletrofiação ou em um dos métodos da impressão 3D (explicitados no trabalho), sendo a primeira preferida, já que os métodos de impressão 3D têm, no geral, alto custo e longas jornadas de trabalho.

No entanto, o PCL apresenta certas desvantagens em tal uso, como o fato de ser hidrofóbico, e por isso ele deve ser melhorado com a inclusão de outro material na composição do arcabouço. Ao adicionar componentes como colágeno, gelatina, alginato, que formam estruturas de hidrogel em sua composição, vários estudos identificaram o aumento da adesão e proliferação celular e da produção de matriz extracelular. Além disso, a adição de outro material que melhora as propriedades do PCL, o torna mais similar aos tecidos de animais vivos, o que, junto com as demais vantagens desta combinação, tornam tal estratégia a melhor para a fabricação de arcabouços para a regeneração de tecidos, como o de cartilagem articular.

Dentre os materiais analisados para melhorar a funcionalidade do PCL em arcabouços aplicados à regeneração tecidual, foi apresentada pelo método de contribuição de grupo na determinação dos parâmetros de solubilidade a possibilidade do colágeno favorecer o desenvolvimento de materiais híbridos com melhor desempenho, uma vez que seus parâmetros de solubilidade estão mais próximo do PCL. Isto é, existe uma maior interação do PCL com o que com os demais materiais avaliados.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MARINO, Bruno. **Avaliação de materiais biocompatíveis na medicina regenerativa para cartilagem articular.** 2020. 74 páginas. (Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.
- [2] Ecycle. **Estudo em laboratório mostra que células-tronco são capazes de alterar processos de regeneração de cartilagem, promovendo melhorias significativas.** Ecycle, 2020. Disponível em: <https://www.ecycle.com.br/tecnica-de-regeneracao-de-cartilagem-articular/>. Acesso em: 04/11/22
- [3] DOULABI, Azadehsadat; MEQUANINT, Kibret; MOHAMMADI, Hadi. Blends and Nanocomposite Biomaterials for Articular Cartilage Tissue Engineering. **MPDI Journal.** Julho, 2014. Disponível em: <http://www.mdpi.com/journal/materials>.
- [4] Portal Escola do Cavalo. **Osteoartrite em equinos: sinais, diagnóstico e tratamento.** Portal Escola do Cavalo, 2022. Disponível em: <https://www.escoladocavalo.com.br/osteoartrite-em-equinos/#:~:text=Entre%20os%20tratamentos%C2%20podemos%20citar,com%20a%20osteoartrite%20em%20equinos> . Acesso em: 04/11/22
- [5] ROCHA, Francisco. **Osteoartrites em equinos.** 2008. 76 páginas. (Faculdade de Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.
- [6] SOUZA, Lays. **Uso de células tronco mesenquimais como terapia regenerativa na osteoartrite em equinos: uma revisão sistemática qualitativa.** 2020. 81 páginas. (Núcleo de Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2020.
- [7] DOMINGOS, Marco; DINUCCI, Dinuccio; COMETA, Stefania; ALDERIGHI, Michele; BÁRTOLO, Paulo Jorge; CHIELLINI, Federica. Polycaprolactone Scaffolds Fabricated via Bioextrusion for Tissue Engineering Applications. **International Journal of Biomaterials.** Setembro, 2009. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijbm/2009/239643/>.

- [8] Azonano. **The difference Between ElectroSpinning and Electrospraying.** Azonano, 2022. Disponível em: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=5060>. Acesso em 16/11/22
- [9] ZHAO, Xiao-Hong; NIU, Yi-Nuo; MI, Chen-Hui; GONG, Hai-Lun; YANG, Xin-Yu; CHENG, Ji-Si-Yu; ZHOU, Zi-Qi; LIU, Jia-Xuan; PENG, Xue-Liang; WEI, Dai-Xu. Electrospraying nanofibers of microbial polyhydroxyalkanoates for applications in medical tissue engineering. **Journal of Polymer Science**, julho, 2021. Disponível em: Journal of Polymer Science - Wiley Online Library. Acesso em 16/07/22
- [10] KANG, Hyun-Wook; LEE, Sang; KO, Kap; KENGLA, Carlos; YOO, James; ATALA, Anthony. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. **Nature Biotechnology**, North Carolina, v.34, n.3, p. 312 a 319, fevereiro, 2016. Disponível em: Nature Biotechnology. Acesso em 16/07/22
- [11] FONSECA, Ana *et al.* Emulating Human Tissues and Organs: A Bioprinting Perspective Toward Personalized Medicine. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 19, p. 11093 a 11139, setembro, 2020. Disponível em: Emulating Human Tissues and Organs: A Bioprinting Perspective Toward Personalized Medicine | Chemical Reviews (acs.org)
- [12] CHEN, Chih-Hao *et al.* Surface modification of polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering for cartilage tissue engineering. **Materials Science and Engineering**, v.40, p. 389 a 297, julho, 2014. Disponível em: Surface modification of polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering for cartilage tissue engineering - ScienceDirect
- [13] YAO, Zhixiao *et al.* Biomimetic multilayer polycaprolactone/sodium alginate hydrogel scaffolds loaded with melatonin facilitate tendon regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, fevereiro, 2022. Disponível em: Biomimetic multilayer polycaprolactone/sodium alginate hydrogel scaffolds loaded with melatonin facilitate tendon regeneration - ScienceDirect
- [14] MUKHERJEE, Payal *et al.* Invitro and Invivo Study of PCL-Hydrogel Scaffold to Advance Bioprinting Translation in Microtia Reconstruction. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 32, n. 5, p. 1931 a 1936, Agosto, 2021. Disponível em: Invitro

and In vivo Study of PCL-Hydrogel Scaffold to Advance... : Journal of Craniofacial Surgery (lww.com)

[15] VAN KREVELEN, D.W; TE NIJENHUIS, K. Properties of Polymers: Their Correlation with Chemical Structure; their Numerical Estimation and Prediction from Additive Group Contributions. 2009. Eslovênia: Elsevier, 2009.