

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

CAMILA CRISTINA MORA REINA

AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE EM SCAFFOLDS DE POLI
ÁCIDO LÁCTICO TRATADOS COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO NA ADESÃO
CELULAR PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA TECIDUAL

Araraquara, SP

2021

CAMILA CRISTINA MORA REINA

**AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE EM SCAFFOLDS DE POLI
ÁCIDOLÁCTICO TRATADOS COM HIDROXIDO DE SÓDIO NA ADESÃO
CELULAR PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA TECIDUAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara - UNIARA - como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal

Orientadora: Prof.^a Dra. Mônica Rosas da Costa lemma

Araraquara, SP

2021

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por mais essa realização, na certeza de que sem seu amparo jamais teria forças e fé para seguir adiante de todo desafio e toda prova que nesta vida terei que passar.

A minha mãe Sandra pelo seu amor, sempre me motivando ser uma pessoa melhor.

Ao meu pai Sérgio por sua fé em mim.

A minha querida e amada avó pelos ensinamentos sobre determinação.

A minha eterna chefe de departamento, Elisane Tatsch por todo incentivo e carinho.

A minha Professora, Mestre e amiga querida, Teresa Muraoka, por toda atenção e cuidado comigo, toda fé que deposita em mim, todas as oportunidades que me concede. Obrigada pela sua amizade e carinho.

A minha Professora, Doutora e amiga do peito Dra Monica Rosas da Costa Lemma por todo empenho, dedicação, amparo e carinho e pela sua amizade sincera.

Ao meu querido Professor, Doutor, Hernane Barud por todo apoio e incentivo desde o início de minha jornada acadêmica

A todos os professores por terem me passado da melhor forma todo conteúdo curricular e além disso por todo ensinamento a respeito de moral.

Gratidão pelo que tenho, e ânimo para continuar a lutar.

Hamuth, 2019

RESUMO

A Engenharia de Tecidos (ET) visa o desenvolvimento de tecidos e órgãos artificiais, incluindo o desenvolvimento de dispositivos como os *scaffolds*, que servem como suporte para o crescimento e proliferação celular para restaurar e reparar funções de órgãos e tecidos comprometidos. O poli (ácido lático) tem sido comercializado na forma de filamentos com a finalidade de ser utilizado na manufatura aditiva, popularmente conhecida por impressão tridimensional (3D), produzindo o *scaffold* com a estrutura adequada para o cultivo celular e nas condições de tamanho e porosidade adequados para o tipo de tecido a ser substituído. O polímero de PLA apresenta-se como material promissor para utilização na Engenharia de Tecidos devido ao seu baixo custo e suas propriedades biodegradáveis e biocompatíveis, contudo, uma das desvantagens desse biopolímero é sua característica hidrofóbica o que o torna não acessível para adesão e proliferação celular. Como alternativa para resolver o problema da hidrofobicidade do PLA, estudos atuais buscam melhorar a hidrofobicidade do biopolímero com modificações na superfície. O presente estudo teve como objetivo avaliar a modificação de superfície nos *scaffolds* de PLA, quimicamente tratados com o Hidróxido de Sódio (NaOH) para avaliar a adesão e viabilidade celular em *scaffolds* sobre o tratamento alcalino com NaOH. Foram utilizadas as técnicas de FTIR-ATR (Infravermelho com Transformada de Fourier de Reflectância Total Atenuada) e AFM (Microscopia de Força Atômica) para caracterização físico-química do material. O ensaio de adesão e viabilidade, foi realizado pelo método fluorimétrico com o reagente resazurina para detecção da atividade mitocondrial de células viáveis. De acordo com os resultados da técnica FTIR-ATR pode-se concluir que o tratamento alcalino com Hidróxido de Sódio foi eficaz para alteração nos grupos funcionais do material, onde, constatou-se o surgimento da ligação OH, a qual é esperada em tratamentos alcalinos. Segundo a técnica AFM confirmou-se que o tratamento dos *scaffolds* foi eficaz para mudança superficial dos *scaffolds* tratado e alteração na rugosidade de sua superfície. Pela análise de adesão celular, concluiu-se que o tratamento não influenciou na adesão mas foi mais eficaz na manutenção da viabilidade celular.

Palavras-chave: engenharia tecidual, medicina regenerativa, tratamento superficial, biomateriais, osteoblastos

ABSTARCT

Tissue Engineering (ET) aims at the development of artificial tissues and organs, including scaffolds, which serve as support for cell growth and proliferation to restore and repair functions of compromised organs and tissues. Poly (lactic acid) has been marketed in the form of filaments for the purpose of being used in three-dimensional (3D) printing, producing the scaffold with the proper structure for cell culture and in the conditions of size and porosity suitable for the type of fabric to be replaced. The PLA polymer presents itself as a promising material for use in Tissue Engineering due to its low cost and its biodegradable and biocompatible properties, however, one of the disadvantages of this biopolymer is its hydrophobic characteristic which makes it not accessible for adhesion and cell proliferation. As an alternative to solve the PLA hydrophobicity problem, current studies seek to improve the hydrophilicity of the biopolymer with changes in the surface. The present study aimed to evaluate the surface modification in PLA scaffolds, chemically treated with Sodium Hydroxide (NaOH) to evaluate cell adhesion. The techniques of FTIR-ATR (Infrared with Fourier Transform of Attenuated Total Reflectance) were used.) and AFM (AFM Atomic Force Microscopy) for characterization of the material. The adhesion and feasibility test were performed using the fluorimetric method with the reagent resazurin to detect the mitochondrial activity of viable cells. According to the results of the FTIR-ATR technique, it can be concluded that the alkaline treatment with Sodium Hydroxide is effective to alter the desirable groups of the material, where the emergence of the OH bond was found, which is expected in alkaline treatment. According to the AFM technique, it was confirmed that the scaffolding treatment was effective for changing the surface of the treated scaffold and altering the roughness of its surface. Cell adhesion and viability assays shown that the chemical treatment did not influence adherence but was more effective in maintaining cell viability.

Keywords: tissue engineering, regenerative medicine, surface treatment, biomaterials, osteoblasts.

SUMÁRIO

1. Introdução e justificativa.....	9
2. Revisão Bibliográfica.....	12
2.1 O tecido ósseo.....	12
2.2 As células do tecido ósseo.....	15
2.3 Remodelação óssea.....	17
2.4 Engenharia de Tecidos.....	18
2.5 Scaffolds na engenharia tecidual.....	21
2.6 Biopolímeros como <i>scaffolds</i>	23
2.7 Impressão 3D - Manufatura aditiva.....	24
2.8 Poli (ácido láctico) PLA.....	27
2.9 Modificação Superficial dos scaffolds de PLA.....	29
2.9.1 <i>Scaffold</i> de PLA tratado com Hidróxido de Sódio (NaOH).....	30
3 Hipótese.....	31
4 Objetivos.....	32
4.1 Ojetivos Gerais.....	32
4.2 Objetivos Específicso.....	32
5 Materiais e Métodos.....	33
5.1 Obtenção dos Scaffolds de PLA.....	33
5.2 Tratamento dos scaffolds de PLA.....	34
5.3 Esterilização dos scaffolds de PLA.....	34
6 Caracterização dos scaffolds de PLA.....	35
6.1 Técnica de espectroscopia no infravermelho FTIR - ATR.....	35
6.2 Técnica da microscopia de força atômica (AFM).....	36
6.3 Ensaio de adesão e viabilidade celular.....	36
7 Resultados e Discussão.....	37
7.1 Técnica de espectroscopia no infravermelho FTIR -ATR.....	38
7.2 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	40
7.3 Viabilidade e adesão celular no scaffold.....	44
8. Conclusão.....	47
9. Referências.....	48

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo constituído por uma fase mineral, formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatite, que assenta numa organizada matriz colagênica.

A combinação da fase mineral e da fase orgânica confere ao tecido ósseo propriedades únicas, que o tornam muito resistente às solicitações mecânicas. Apesar do seu aspeto aparentemente inerte, os ossos são estruturas plásticas altamente dinâmicas que, durante toda a vida do organismo, estão em permanente remodelação, possibilitando assim que se mantenham suas propriedades mecânicas e capacidades metabólicas. Esse tecido quando lesionado tem a capacidade de regenerar-se, isto é, ocorre um processo de reparação óssea através da formação da neoformação de tecido ósseo. (JUDAS, et al. 2012)

Quando o osso é submetido a um estímulo perturbador que potencialmente pode comprometer a sua função, o sistema imunológico inato é ativado a fim de restabelecer o estado homeostático normal para efetuar o reparo local e a cicatrização óssea.

As deformidades ósseas podem ser congênitas ou resultantes de infecções, traumas, neoplasias ou falhas na artroplastia sendo seu reparo um desafio por tratar-se de um processo demorado com resultados frequentemente imprevisíveis e para *Loi et al* (2016) questões relacionadas ao reparo ósseo apresentam elevada importância econômica (AREALIS E NIKOLAOU, 2015)

Dessa forma, a Engenharia de tecido ósseo é o campo interdisciplinar da Medicina Regenerativa que incide sobre as opções de tratamentos alternativos para defeitos ósseos, aperfeiçoando seus estudos para serem aplicados na criação, regeneração e reparação de tecidos. (ROCHA ET AL.; QUINTELA ET AL., 2018).

A impressão tridimensional (3D) vem desempenhando um papel importante na prototipagem de dispositivos biomédicos. Desde seu uso inicial como modelos de visualização pré-cirúrgicos e moldes de ferramentas, a manufatura aditiva tem evoluído suas pesquisas com a finalidade de criar dispositivos únicos e implantes além de scaffolds para utilização na Engenharia Tecidual (LIAW; GUVENDIREN,

2017).

A tecnologia de impressão 3D surge em meio a Engenharia Tecidual contribuindo com novas possibilidades de pesquisas para alternativas de implantes. reparações teciduais, permitindo a impressão de um modelo tridimensional quemimetize uma estrutura biológica (QUINTELA ET. AL., 2018).

Para a impressão tridimensional de estruturas para Engenharia Tecidual, são pesquisados materiais capazes de realizar interações específicas com tecidos biológicos, buscando assim utilização de materiais biocompatíveis para compor o *scaffold*. (ROCHA ET. AL, 2018).

Os biomateriais apresentam-se como materiais apropriados com a finalidade de serem implantados no tecido danificado sem causar rejeição no organismo, e dessa forma, destacam-se como proposta promissora para servirem de suportes. Estudos atuais buscam aperfeiçoar esses biomateriais para estimular uma resposta celular específica, para que o *scaffold* então forneça a entrega de células específicas no local com o uso de fatores de crescimento e moléculas necessárias para a área que precisa de regeneração. (TRIPLETT e BUDINSKAYA, 2017).

O *scaffold* apropriado é um andaime com estrutura tridimensional porosa, que fornece suporte mecânico para as funções celulares. Esses *scaffolds* dão suporte para proliferação de células, para futura regeneração de tecidos (ALBUQUERQUE, 2015). Como destaque na Engenharia de tecidos tem-se os polímeros biodegradáveis impresso em estrutura tridimensional para servirem como scaffolds para cultura celular. (BARBANTI 2005).

O biopolímero de PLA (poli ácido láctico) apresenta-se de forma promissora para o uso como suportes temporários para substituição de tecidos por ser biodegradável e biocompatível sendo degradado por hidrólise simples e metabolizado pelo corpo humano (LOPES; JARDINI; FILHO, 2012)

O baixo custo do PLA é outra característica vantajosa para o uso desse biopolímero o qual apresenta ótimos resultados na impressão tridimensional (LASPRILLA et al., 2012).

No entanto, uma questão a ser estudada com a utilização desses biopolímeros de PLA é sua característica hidrofóbica, que é uma das principais desvantagens da utilização desse polímero, sendo assim, pesquisas atuais visam modificar a superfície desses dispositivos a fim de torná-los mais hidrofílicos.

De acordo com trabalhos anteriores (REINA.,2018) foi observado que o *scaffold* 3D de PLA sem modificação de superfície não permitiu uma boa adesão celular. No entanto os *scaffolds* tratados com NaOH em concentração 0,1M mostraram melhores resultados de adesão celular pelo ensaio da resazurina embora não houvesse a comprovação da modificação pela técnica do FTIR.

Outras técnicas são utilizadas para modificação de superfície de PLA, como por exemplo: Modificação por quitosana/ polifosfato de sódio, modificação por escrita direta a laser (DLW), por Plasma Atmosférico frio (CAP), por Hidróxido de Sódio (NaOH). (WANG, et al. 2016)

Considerando os problemas de hidrofobicidade do *scaffold* de PLA puro, o qual essa característica o torna não atraente para a migração celular e para posterior aplicação na Engenharia Tecidual, o presente trabalho tem como objetivo modificar a superfície de PLA com o tratamento com Hidróxido de Sódio em diferentes concentrações a fim de avaliar suas modificações superficiais e a eficácia de adesão celular nas diferentes concentrações do tratamento químico.

De acordo com (MAIA PINTO, ET AL. 2016 E M. M. S. MOHD SABEE, et al.2016) o tratamento dos *scaffolds* com NaOH tem como consequência torna-lo mais hidrofílico melhorando assim sua biocompatibilidade e também aumentando o número de sítios ativos para ligação celular ao biomaterial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O corpo humano é constituído por diversos tecidos, entre eles, o tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo que é formado por células e pela matriz óssea (material extracelular calcificada). (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

O tecido ósseo ilustrado na Figura 1 é o componente principal do esqueleto, servindo de suporte para os tecidos moles, protegendo os órgãos vitais e também a medula óssea, responsável pela formação de células sanguíneas. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, a fim de manter constante a concentração desses íons nos líquidos corporais. São capazes ainda de absorver toxinas e metais pesados, minimizando assim seus efeitos adversos em outros tecidos. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013).

As células do tecido ósseo são denominadas osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos são encontrados em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na sua periferia; e os osteoclastos são células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação do osso. Como não existe difusão de substâncias através da matriz calcificada do osso, a nutrição dos osteócitos depende de canalículos que existem na matriz. Esses canalículos possibilitam as trocas de moléculas e íons entre os capilares sanguíneos e os osteócitos. (SEEMAN, 2008; MONTANARI, 2016) .

Figura 1. Osteócito circundado pela matriz



Fonte: (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013)

O tecido ósseo é distinguido em duas substâncias ósseas, substância óssea compacta e substância óssea esponjosa, embora os elementos constituintes estejam presentes em ambos, eles se dispõem de forma diferente conforme o tipo considerado e seu aspecto macroscópico. (DANGELO e FATTINI, 2002).

O tecido ósseo compacto apresenta funções mecânicas e de proteção, enquanto que o esponjoso se ocupa das funções metabólicas e funções de suporte. Em termos histológicos o tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo) e secundário (maduro). O tecido primário se apresenta em disposição irregular e não organizada de fibras colágenas com menor quantidade de cristais de hidroxiapatita, o tecido secundário é composto por fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas, formando osso compacto ou esponjoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O tecido ósseo é distinguido em duas substâncias ósseas, substância óssea compacta e substância óssea esponjosa, embora os elementos constituintes estejam presentes em ambos, eles se dispõem de forma diferente conforme o tipo considerado e seu aspecto macroscópico. (DANGELO e FATTINI, 2002).

O tecido ósseo compacto apresenta funções mecânicas e de proteção, enquanto que o esponjoso se ocupa das funções metabólicas e funções de suporte. Em termos histológicos o tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo) e secundário (maduro). O tecido primário se apresenta em disposição irregular e não organizada de fibras colágenas com menor quantidade de cristais de hidroxiapatita, o tecido secundário é composto por fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas, formando osso compacto ou esponjoso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.2 AS CÉLULAS DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é formado apenas por duas linhas celulares, ilustradas na Figura 2, sendo que, populações de células assumem diversas formas com base na sua diferente morfologia, atividade e localização em relação à matriz calcificada. Essas células são agrupadas em duas séries diferentes: células da linha osteoblástica as quais são responsáveis pelo processo de formação da matriz óssea e células da linha osteoclástica as quais são relacionadas com a reabsorção e remodelagem do tecido ósseo. (JUDAS et al, 2012)

Os osteócitos são as células encontradas no interior da matriz óssea, ocupando as lacunas das quais partem canalículos, onde cada lacuna contém apenas um osteócito, dentro dos canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos por meio de junções comunicantes, por onde podem passar pequenas moléculas e íons de um osteócito para o outro. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

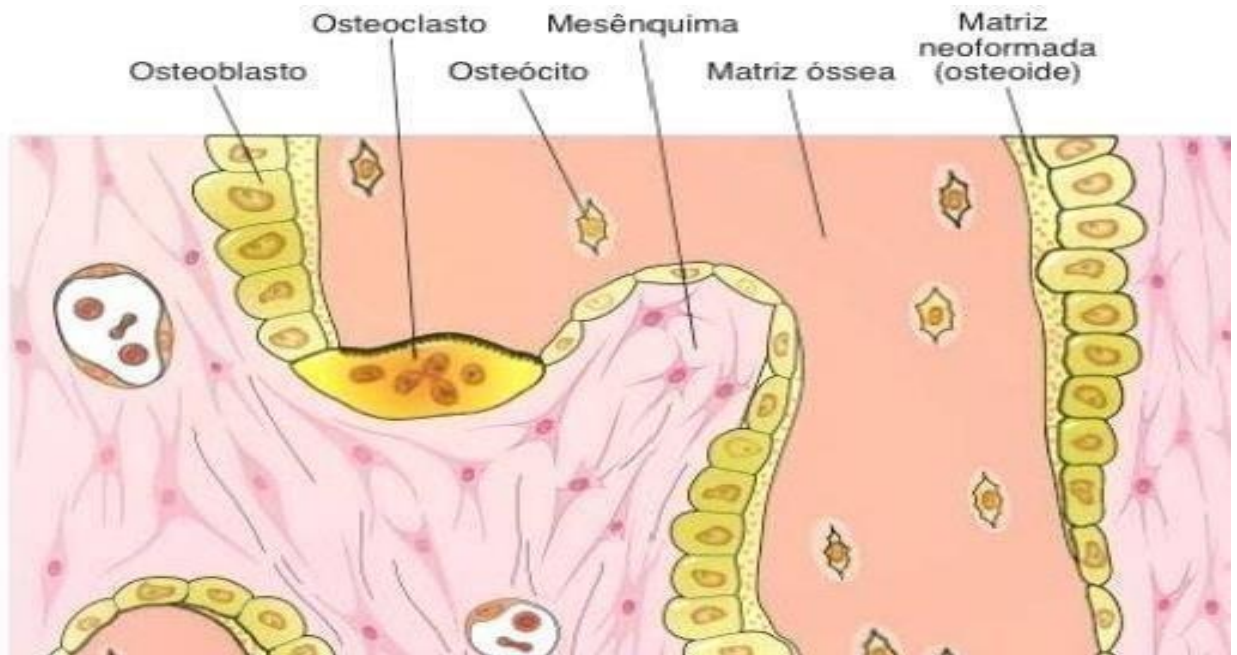
As células da linha osteoblástica tem formato achatado e têm origem nas células mesenquimatosas indiferenciadas e pluripotenciais, tendo sido tradicionalmente consideradas de localização preferencial no perióstio e no estroma da medula óssea. Os osteócitos são essenciais para manutenção da matriz ossea, sua morte é seguida por reabsorção da matriz. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os osteoblastos são células mononucleadas, de origem mesenquimal, aspecto cubóide ou ligeiramente alongadas que formam uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo formada. O osteoblasto ativo é caracterizado por possuir uma membrana citoplasmática rica em fosfatase alcalina, receptores para uma variedade de hormônios e fatores de crescimento, sendo responsável pela formação da matriz orgânica do osso e pela sua mineralização (AUBIN et al, 2003).

Os osteoblastos podem se transformar em osteócitos quando circundados pela matriz orgânica recém-depositada ou, de modo alternativo, podem tornar-se células de revestimento ósseo, achatadas e quiescentes, na superfície óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os osteoclastos desempenham uma função essencial na remodelação e na renovação do tecido ósseo. São células gigantes multinucleadas altamente especializadas nos processos de reabsorção da matriz óssea, desenvolvendo, para este fim, uma eficaz e complexa maquinaria (que lhes confere características e capacidades únicas). Podem ser observados nas superfícies ósseas, principalmente no endóstio e, ocasionalmente, na superfície do perióstio.

Figura 2. Formação do tecido ósseo e células envolvidas



Fonte: (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013)

2.3 REMODELAÇÃO ÓSSEA

Quando o osso é submetido a um estímulo perturbador que potencialmente pode comprometer a sua função, o sistema imunológico inato é ativado a fim de restabelecer o estado homeostático normal para efetuar o reparo local e a cicatrização óssea. (LOI et al., 2016).

O ciclo de remodelação óssea compreende uma série ordenada de eventos que vão converter uma superfície em repouso numa zona em remodelação, seguindo uma sequência imutável de ativação (A) → reabsorção (R) → formação (F). A remodelação óssea consiste, pois, num processo pelo qual é eliminado uma área de tecido ósseo que será substituída por outra, com pouca ou nenhuma alteração da massa óssea. Este fenómeno pode verificar-se, igualmente, (e seguindo a mesma ordenação) noutros tecidos duros.

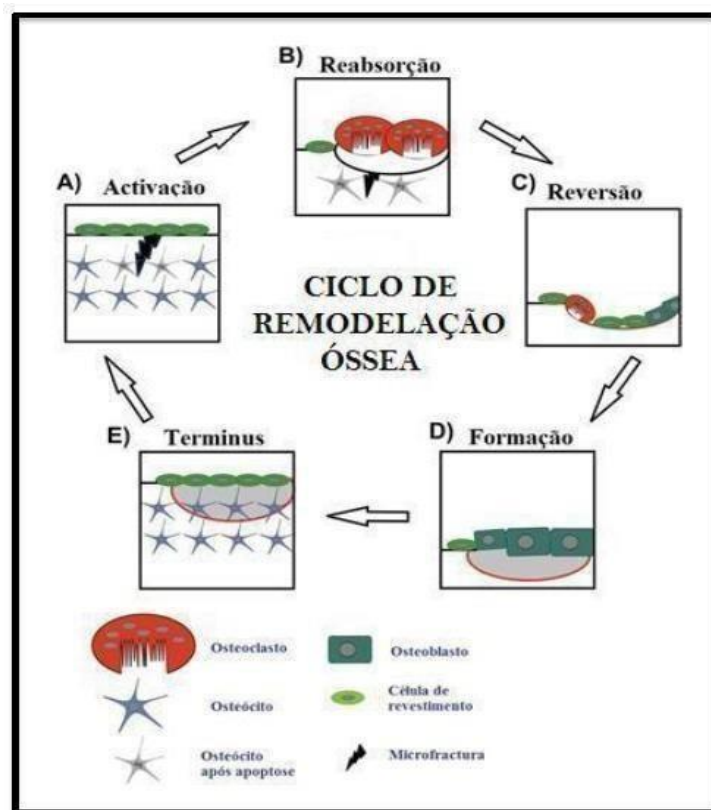
A fase de ativação (A) compreende, como já foi referido, o reconhecimento de uma área precisa da superfície óssea e a sua preparação para o processo de remodelação. A remodelação óssea inclui uma fase de reabsorção osteoclástica seguida por uma etapa de formação osteoblástica. Este processo intimamente associado no tempo e no espaço constitui entidades anatómicas temporárias que Frost (2001) denominou por “*basic metabolizing units*”, um termo que ele reformulou mais tarde para “*basic multicellular units*”, abreviado por sua vez para *BMUs*. (HENRIKSEN K. et al 2009)

As *BMUs* são estruturas tridimensionais formando no tecido cortical túneis/cones de reabsorção que serão lentamente preenchidos por novo osso conhecidos como *cuttings/filling cones*. Nas trabéculas do tecido ósseo esponjoso, os locais em reabsorção apresentam-se como escavações ou lacunas denominadas lacunas de Howship.

O conjunto de células responsáveis por estas atividades multidisciplinares é, também, coletivamente designado por *BMU* e reúne uma equipa de células osteoclásticas e uma de células osteoblásticas. Destas unidades fazem também parte outras populações celulares, consideradas por vezes como células não *BMU*, que incluem células mesenquimatosas e células do tecido conjuntivo, muitas delas pertencentes ao sistema imunitário, sistema hematopoiético, bem como um elemento vascular especializado para o efeito. (HENRIKSEN K. et al 2009.)

O processo de remodelação óssea começa com o reconhecimento de uma área alvo, como ilustrado na Figura 3, definindo uma região onde o osso necessita de ser substituído. Frost denominou esta etapa (que assinala e define o local de nascimento de uma nova *BMU*) como fase de ativação, sendo mais recentemente redefinida como a conversão de uma superfície óssea de um estado quiescente para um estado ativo. Este processo requer uma alteração de comportamento das células de revestimento ósseo (*lining cells*), bem como o recrutamento e migração de células da linha osteoclástica para o local, e o reforço dos mecanismos de osteoclastogénese. Este “acontecimento” envolve a digestão da fina membrana de endóstio por enzimas produzidas pelas células de revestimento, conduzindo a uma fácil exposição da matriz óssea mineralizada. A superfície de matriz óssea desnudada e exposta atrai os pré-osteoclastos presentes da circulação sanguínea contribuindo, também, para a sua maturação e ativação. (HENRIKSEN K. et al 2009)

Figura 3: Esquema representativo do ciclo de remodelação óssea. (Adaptado de Henriksen K. et al 2009)



Fonte: (HENRIKSEN K. ET AL 2009)

De acordo com Arealis e Nikolaou (2015) as deformidades ósseas podem ser congênitas ou resultantes de infecções, traumas, neoplasias ou falhas na artroplastia sendo seu reparo um desafio por tratar-se de um processo demorado com resultados frequentemente imprevisíveis e para Loi et al (2016) questões relacionadas ao reparo ósseo apresentam elevada importância econômica em função do alto custo para os tratamentos em caso de não-união e pelas fraturas de fragilidade secundária e osteoporose senil afetarem de maneira significativa parcela da população acima dos 50 anos. (REINA, 2018)

2.4 ENGENHARIA DE TECIDOS

Em alguns casos, a estrutura biológica de um tecido ou órgão, não tem a capacidade de se regenerar, como o tecido cartilaginoso, nesses casos uma alternativa para o restabelecimento desse órgão ou tecido é estimular a regeneração utilizando um biomaterial (SANTOS, 2003).

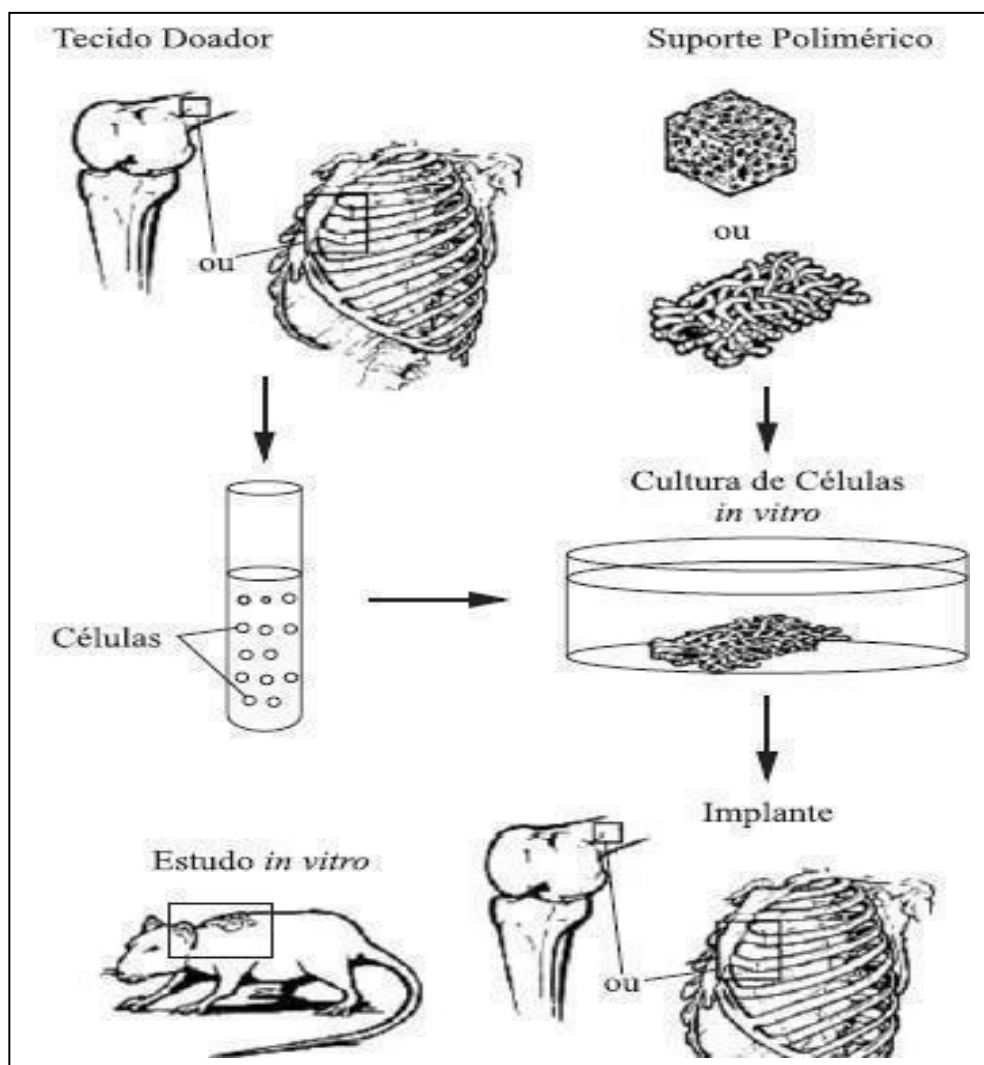
A técnica conhecida como Engenharia de Tecidos, consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc), para então serem reinseridos no paciente. Como uma ciência multidisciplinar, os trabalhos envolvem conhecimentos das áreas de biologia, ciências da saúde e de engenharia e ciência dos materiais. (FREED et al. 2006)

Santos (2003) define a Engenharia de Tecidos como a ciência que envolve o desenvolvimento de novos materiais ou dispositivos capazes de obter interações específicas com os tecidos biológicos, buscando a utilização de materiais biocompatíveis que devem servir como arcabouço para o crescimento de células *in vitro*, organizando e desenvolvendo o tecido que posteriormente será implantado no paciente.

Ainda, Zhou e Lee (2011) completam a afirmação de Santos,2003 apontando que independente do biomaterial ou método de fabricação escolhido para projetar o andaime, é necessário um mínimo de características em sua estruturação que possibilite sua aplicação *in vitro* e *in vivo*. Resumidamente, o andaime precisa ser biocompatível, biodegradável e consistente com os requisitos mecânicos do tecido a ser regenerado ou substituído.

Dessa forma, *scaffolds* projetados para utilização em reparo ou substituição tecidual devem ter sua estrutura tridimensional e porosa que forneça suporte mecânico para as funções celulares, proporcionando suporte para proliferação celular e regeneração de tecidos. (ALBUQUERQUE, 2015). A Figura 4, adaptada de Freed *et al.* ilustra o desenvolvimento idealizado da técnica da engenharia de tecido.

Figura 4 : Técnica da Engenharia de Tecido



Fonte: (adaptada de Freed *et al.* 2006)

2.5 SCAFFOLDS NA ENGENHARIA TECIDUAL

Embora os materiais (metais e cerâmica) utilizados como próteses removíveis ou implantadas para solucionar o problema do reparo proporcionassem boa estética e funcionalidade eles também possuíam suas limitações, pois são materiais que podem sofrer mudanças químicas e físicas após o implante, podendo provocar reações desfavoráveis no tecido implantado. (TRIPLETT e BUDINSKAYA, 2017).

Para construção de um andaime com a engenharia ideal para utilização na Engenharia Tecidual é preciso a junção de propriedades mecânicas, físicas e biológicas o mais próximo possível das características nativas do tecido lesionado. Considerando que in vivo as células são protegidas dentro de uma matriz extracelular (ECM), o design do arcabouço então é baseado nos biomateriais mais propícios com capacidade de imitar a matriz extracelular do tecido lesionado.

Pesquisas tem estudado as interações biológicas de materiais de implante com o tecido circundante, células e outros fatores (Tríade da Engenharia Tecidual) Figura 5. Dessa maneira, a Engenharia de tecido ósseo e a Medicina Regenerativa avaliam o desenvolvimento e o potencial de implementação dos biomateriais para servirem de suporte (*scaffolds*) para crescimento de novo tecido. (TRIPLETT e BUDINSKAYA, 2017).

Biomateriais são definidos como substâncias de origem natural ou sintética que são aceitas de forma temporária ou permanente pelos tecidos e órgãos que constituem os seres vivos. Esses biomateriais são utilizados como um todo ou como parte de um sistema, com a finalidade de tratar, restaurar ou ainda, substituir algum tecido, órgão ou função do organismo que esteja comprometido (MIRTCHI, A. et al, 1989), ou ainda, como um material eficaz utilizado em dispositivos médicos, com a finalidade de interagir com sistemas biológicos sem causar rejeições no organismo. (WILLIAMS, D.F. 1987)

Para que o *scaffold* apresente viabilidade e seja funcional é necessário que o *scaffold* e seu subproduto de degradação sejam biocompatíveis e não citotóxicos e além disso, que proporcione distribuição específica no local e seja biodegradável (AGRAWAL e SINHA., 2015).

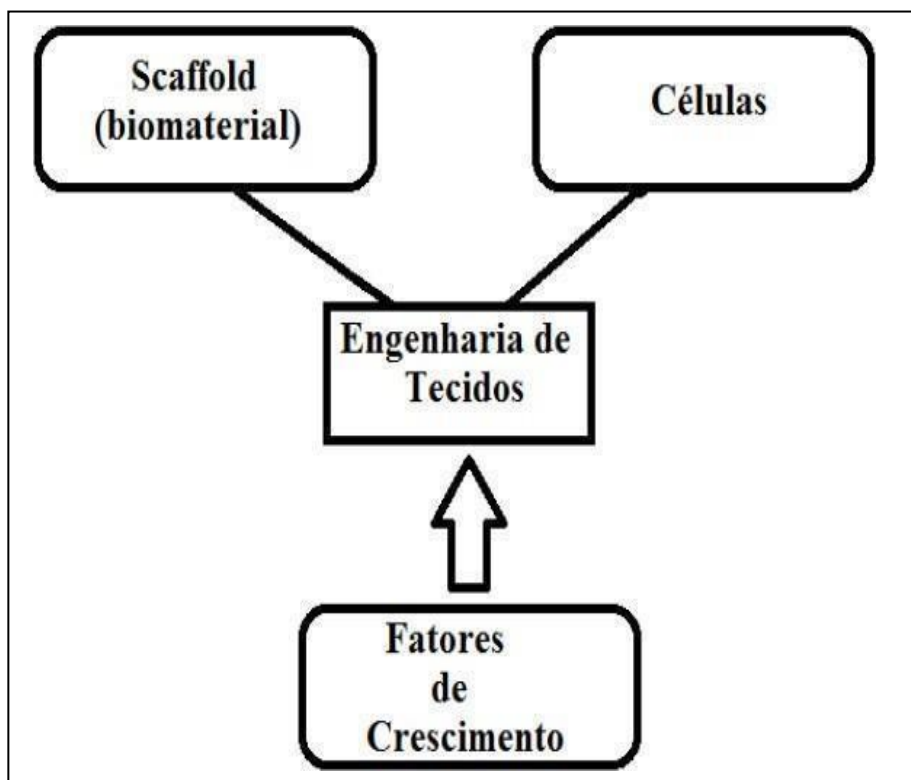
Os biomateriais são materiais apropriados para serem implantados no tecido vivo sem causar rejeição no organismo, e dessa forma, apresentam-se como uma

proposta promissora para servirem de suporte. Os estudos atuais com biomateriais buscam aperfeiçoar esses biomateriais para estimular uma resposta celular específica, para que o suporte então forneça a entrega de células específicas no local com o uso de fatores de crescimento e moléculas necessárias para a área que precisa de regeneração. Os *scaffolds* são usados para fornecer uma estrutura de apoio tridimensional para as células, resultando assim na construção de novo tecido (TRIPLETT e BUDINSKAYA, 2017).

Diversos materiais têm sido utilizados na fabricação desses suportes, incluindo metais, cerâmicas, polímeros biodegradáveis, orgânicos ou sintéticos e hidrogéis (AGRAWAL e SINHA, 2017; TRIPLETT e BUDINSKAYA, 2017).

A utilização de suportes porosos tridimensionais é essencial dentro da engenharia de tecidos. Nesses suportes são cultivados fatores de crescimentos e células para a formação de tecidos (MARTIN et al., 2004), na Figura 5, é representada a tríade da engenharia de tecidos.

Figura 5 : Tríade da Engenharia de Tecidos



Fonte: (Autoria própria)

2.6 BIOPOLÍMEROS COMO SCAFFOLDS

A primeira etapa a ser desenvolvida na engenharia tecidual consiste na seleção e processamento dos suportes. Polímeros biodegradáveis apresentam-se em destaque para aplicação como suportes para cultura celular e estão dentro dos mais empregados no âmbito médico. (BARBANTI, 2005; PIRES, et al 2015).

Vert *et al.* 2015, afirma que biodegradável é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que devido à degradação macromolecular sofrem dispersão *in vivo*, mas sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo.

Os polímeros são macromoléculas, de alto peso molecular que se originam a partir da união de diversos monômeros, os quais se ligam entre si por ligações covalentes. Esses polímeros podem ser classificados como naturais, representados pelos polissacarídeos e proteínas e sintéticos representados pelos ésteres, amidas, éteres e uretanos (PARK et al., 2016)

Segundo DHANDAYUTHAPANI et al., 2011 uma das grandes vantagens da aplicabilidade dos biopolímeros para reparos teciduais se deve ao fato de que esses biomateriais poliméricos apresentam propriedades físico-químicas compatíveis às dos tecidos biológicos e sua produção pode ser feita em grande escala. Ainda, LIU et al, 2013 afirma que os polímeros de poliésteres apresentam como vantagem a capacidade de suportarem o processo de crescimento e remodelação de tecidos pelo período antes de serem degradados e seus produtos, reabsorvidos pelo corpo.

Dentre os polímeros sintéticos biodegradáveis e bioreabsorvíveis encontram-se os poli(α - hidróxi ácidos), representantes de uma classe de poliésteres alifáticos sintéticos, os quais fazem parte o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido láctico-co-ácidoglicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), seus copolímeros e outros. (BARANTI, 2005).

Na classe de polímeros sintéticos que mais se destacam está o poli ácido láctico (PLA). (ROCHA et al., 2012)

Atualmente, tem-se usado os polímeros sintéticos biodegradáveis para confecção de barreiras mecânicas, oferecendo controle de estrutura e propriedades assim como estrutura física e química, condições hidrofílicas e hidrofóbicas, cristalinidade, padrão de degradação e propriedades mecânicas. É possível processar este material em várias formas e microestruturas, assim como a área superficial desejada, quantidade, tamanho e distribuição dos poros.

Os *scaffolds* carregados com fatores de crescimento tem se mostrado como alternativa eficaz para estimular formação óssea, com isso, a Medicina Regenerativa e a Engenharia de tecido ósseo apresentam-se como opção de tratamento para os reparos ósseos a utilização destes suportes para promover adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblasticas ou células progenitoras pluripotentes em células ósseas. (AREALIS e NIKOLAOU, 2015; AGRAWAL e SINHA, 2015)

2.7 IMPRESSÃO 3D - MANUFATURA ADITIVA

As tecnologias de impressão tridimensional têm contribuído de forma consistente para os avanços das abordagens da medicina regenerativa óssea, no transcorrer dos últimos anos. A vantagem é poder manufaturar objetos com formas customizadas às necessidades específicas de cada lesão, sejam eles metálicos para utilização como implantes ortopédicos (dispositivos de osteossíntese) ou os próprios suportes biológicos (*scaffolds*), dentro das estratégias de medicina regenerativa(CHIA; WU, 2015) (BANDYOPADHYAY et al., 2015).

Os substitutos ósseos biocompatíveis podem promover a regeneração óssea, podendo ser naturais ou sintéticos, que imitam a matriz extracelular dos ossos. Esses substitutos fazem a reparação e reconstrução óssea, desempenhando um excelente papel na engenharia de tecidos, proporcionando uma matriz tridimensional, onde as células vão se ligar e proliferar mais facilmente. Hoje em dia os suportes, como *scaffolds* são biodegradáveis, isto é, degradam no local onde foram implantados e, com o passar do tempo, o local retorna a seu perfeito estado (LOPES; JARDINI; FILHO, 2012).

Segundo Karageorgiou e Kaplan, para o crescimento de células ósseas nos *scaffolds*, o tamanho mínimo dos poros é de 100 – 200 μm (KARAGEORGIU, 2005). Essa porosidade da matriz tridimensional faz com que os substitutos ósseos tenham uma porosidade para facilitar o transporte de células, fatores de crescimentos, oxigênio e nutrientes, para que esse tecido tenha um crescimento ósseo que favoreça a regeneração. A estrutura porosa do *scaffold* é uma imitação do osso esponjoso, para servir como ambiente ideal das células (BRUNELLO et. al, 2016).

Visando a reparação de tecidos danificados, a impressão 3D vem sendo bastante utilizada no desenvolvimento de materiais para serem utilizados na Engenharia Tecidual. A Figura 6 mostra alguns objetos que foram impressos por uma impressora 3D, utilizou-se o filamento de PLA.

Figura 6: Impressão 3D pela técnica FDM



Fonte: Autoria própria

Figura 7. PLA impresso por impressão 3D em forma de *scaffolds*



Fonte: Autoria própria

Atualmente, existem várias técnicas de impressão 3D, como Modelagem por Fusão e Depósito (FDM), Sinterização Seletiva a Laser (SLS) e Estereolitografia (SLA). Algumas, como a FDM executam fatiamentos da Figura obtendo uma camada fina, onde a Figura será impressa, até concluir o modelo final desejado (TAKAGAKI, 2012)

A FDM é uma das técnicas que utiliza um software CAD, onde impressora 3D é conectada ao computador que manda todas as informações para impressora. O bicoextrusor vai depositando os fios do material, camada por camada, quando finalizada uma camada, a plataforma desce, iniciando a deposição de mais camadas de material, assim repetidamente, até a conclusão do modelo. Não é desperdiçado nenhum material durante a produção, e não ficam resíduos significativos de materiais na máquina, somente exige uma limpeza básica, tirando os resíduos com a espátula, após o uso da impressora (MELLO, 2010).

O processo FDM consiste na deposição do material/polímero que é aquecido, e se deposita em estado líquido pelo bico extrusor, com movimentação no plano XY (FOGGIATTO, 2009)

A técnica por FDM é uma das técnicas que caracterizam a tecnologia de prototipagem rápida. Representa um dos métodos de impressão tridimensional mais acessível devido ao custo, tendo elevado potencial para utilização na Engenharia Tecidual para reparos ósseos. (MELLO; SILVA; COSTA, 2006). Essa técnica se baseia na utilização de filamentos termoplásticos, constituídos de polímeros ou compósitos polímeros/cerâmica, que são depositados camada por camada, constituindo estrutura tridimensionais específicas (BANDYOPADHYAY; BOSE; DAS, 2015).

Entre as vantagens desse método está o baixo custo do processo e dos materiais poliméricos utilizados. (HOQUE; CHUAN; PASHBY, 2011).

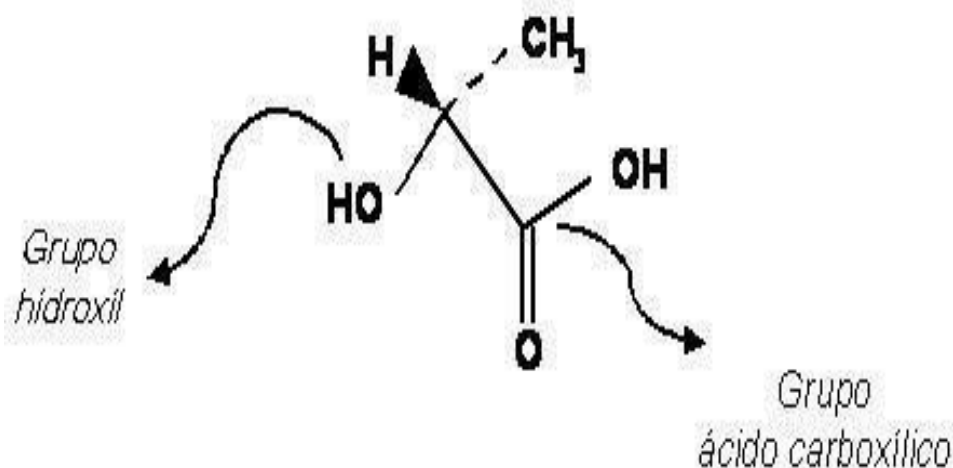
Existem vários tipos de biomateriais, como os polímeros, entre eles, o poli (ácido lático) (PLA) que também é apresentado na forma de filamentos.

2.8 POLI (ÁCIDO LÁCTICO) (PLA)

Scaffolds constituídos de polímeros naturais são considerados os primeiros biomateriais biodegradáveis utilizados clinicamente e ganharam popularidade devido às suas propriedades bioativas que proporcionam maior interação biológica com as células permitindo melhor desempenho em sistemas (TRIPLETT e BUDINSKAYA, 2017)

Dentre os polímeros sintéticos que mais se destacam está o poli ácido láctico. O ácido láctico é bifuncional (Figura 8) possuindo uma função álcool e uma função ácido carboxílico e pode ser convertido em polímero por muitos caminhos (Motta, 2002)

Figura 8: Bifuncionalidade do ácido láctico.



Fonte: Extraído de Motta, 2002

O PLA é um poliéster alifático, bioabsorvível, biocompatível e biodegradável que é degradado por hidrólise simples, polímero de alto peso molecular e que pode ser produzido por policondensação e / ou polimerização de abertura de anel de ácido láctico ($\text{HO} - \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH}$), um ácido orgânico de origem biológica, que pode ser produzido por fermentação de açúcares obtidos a partir de recursos renováveis como a cana-de-açúcar (XIAO et al., 2012 e ROCHA et al., 2012) (MOON, S. -I, 2001; AURAS, R. A, 2003; DRUMRIGHT, R.E. 2000)

O tempo para que o biopolímero de PLA seja degradado no organismo depende dos fatores micro estruturais, como a cristalinidade, composição química e porosidade do biomaterial. (LOPES; JARDINI; FILHO, 2012).

O biopolímero de poli ácido lactico é bastante utilizado na área médica, em substituições de implantes/próteses, sendo um dos polímeros mais promissores para essa área. (LOPES, 2012). Uma das importantes características vantajosas da aplicabilidade do biopolímero de PLA na área médica está em sua característica de boa resistência mecânica, plasticidade térmica e processabilidade podendo sofrer rompimento da cadeia no corpo humano, resultando em oligômeros e finalmente unidades monoméricas de ácido láctico, que são totalmente reabsorvíveis como um intermediário natural no organismo , em particular o L-isômero é um metabólico biológico do corpo humano (PROIKAKIS, C.S. 2002). Além de todos os pontos vantajosos do uso do PLA e sua biocompatibilidade, ele ainda apresenta como vantagem o baixo custo, proporcionando ótimos resultados de impressão 3D. (LASPRILLA et al., 2012).

2.9 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS SCAFFOLDS DE PLA

Materiais biodegradáveis com base em ácido polilático (PLA) são amplamente utilizados em biomedicina e engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade e degradação em ácido lático em meio biológico. (BRITO, G. F. et al., 2011)

Apesar de uma série de vantagens, o ácido polilático possui superfície inerte e hidrofóbica devido à falta de grupos funcionais específicos, bem como baixa energia superficial livre, o que impede a adesão e proliferação das células na superfície, entretanto, este problema pode ser resolvido pela modificação da superfície do PLA. (KURZINA et al. , 2020)

As técnicas de modificação de superfície permitem a alteração do aspecto físico e propriedades químicas de materiais poliméricos. (KURZINA et al. , 2020)

Na engenharia de tecidos, os efeitos dos biomateriais nas interações célula-célula têm chamado recentemente cada vez mais atenção para melhor definir os mecanismos pelos quais os biomateriais promovem a regeneração dos tecidos. Numerosos estudos e pesquisadores focaram sobre esses efeitos dos biomateriais nas interações célula-célula. (BURG et al., 2000)

As pesquisas têm se concentrado nos efeitos dos biomateriais e scaffolds no comportamento das células nos últimos vinte anos. Os pesquisadores concluíram com base nesses estudos que os andaimes de biomateriais ideais devem ter boa biocompatibilidade, propriedades químicas e microestruturais de superfície para adesão, crescimento e diferenciação celular, estrutura porosa 3D para facilitar o crescimento de células e tecido e degradabilidade adequada para corresponder ao crescimento do tecido formado. (HE e LI, 2020)

Dessa forma, pesquisas atuais estão focadas em utilizar métodos de modificações de superfície do biopolímero de PLA a fim de torná-lo mais aderente para as células melhorando sua aplicabilidade para reparação tecidual.

2.9.1 SCAFFOLD DE PLA TRATADO COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NaOH)

O Biopolímero Poli ácido láctico (PLA) contém as propriedades desejadas para servir de suporte para aplicação na Engenharia Tecidual devido ao fato de ser um material biocompatível, biodegradável e que apresenta boas propriedades mecânicas, porém sua característica hidrofóbica apresenta-se como um problema a ser estudado.

O PLA puro, sem nenhum tratamento, devido sua característica hidrofóbica pode causar resposta imunológica quando administrado in vivo. Devido a esta característica o PLA apresenta-se instável em condições úmidas, podendo sofrer ruptura da cadeia no corpo humano e produzindo ácido láctico que é um subproduto ácido. Além disso, esta hidrofobicidade pode resultar em baixa afinidade celular, que pode desencadear uma resposta inflamatória do hospedeiro vivo em contato direto com fluidos.

Assim, a modificação do PLA com NaOH tem como finalidade torná-lo mais hidrofílico de modo que a propriedade de biocompatibilidade seja então aumentada e portanto adequada para ser um scaffold para ser usado na aplicação na Engenharia Tecidual. (SABEE, et al.2016)

De acordo com Pinto (2016) a hidrólise das superfícies dos arcabouços impressos é realizada com o intuito de aumentar o número de sítios ativos para ligação celular aos biomateriais, além de servir para remover possíveis filamentos não projetados presentes no scaffold.

Entre todos os métodos estudados para melhoria da superfície de PLA, a técnica convencional de hidrólise alcalina usando hidróxido de sódio (NaOH) é escolhida para modificar PLA porque é simples, barata e promissora em melhorar a propriedade de hidrofiliabilidade dos scaffolds. Após a hidrólise da superfície, podem ser produzidos carboxila hidrofílica e hidroxila clivando a ligação éster. Espera-se que a melhoria da hidrofiliabilidade dos scaffolds também melhore a propriedade de biocompatibilidade. (SABEE, et al.2016).

A modificação química de *scaffolds* de PLA com NaOH é basicamente o método mais simples por meio de hidrólise de superfície com tratamento de aminólise. Os ácidos carboxílicos hidrofílicos ($-COOH$) e grupos hidroxila ($-OH$) ou amina reativa ($-NH_2$) serão introduzidos através da clivagem das ligações éster que podem ser usadas para ligar moléculas bioativas, como RGD, quitosana, PEG e colágeno para regular a adesão celular ou a absorção de proteínas. O PLA é relatado principalmente no uso de hidrólise alcalina para modificar sua superfície devido à convencionalidade para criar

um funcional reativo grupos de $-\text{COOH}$ e $-\text{OH}$. (SABEE, et al.2016)

Para confirmar a modificação na superfície do material é utilizado o FTIR para determinar a presença de grupos de hidroxila. Já para a análise de morfologia para analisar a estrutura da superfície dos scaffolds é utilizado o MEV, ainda é utilizado o ângulo de contato com água para determinar que o PLA tratado com NaOH aumenta a hidrofiliabilidade do material após a modificação. Por ultimo, o teste *in vitro* é feito para confirmar a propriedade de biocompatibilidade aprimorada do *scaffold* de PLA modificado. (SABEE, et al.2016).

3. HIPÓTESE

De acordo com o exposto a hipótese deste trabalho foi avaliar se a modificação química da superfície de *scaffolds* de PLA possui um efeito de incremento na adesão e viabilidade celular

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

O Objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade e adesão celular sobre *scaffold* de PLA impresso em estrutura 3D e com superfície modificada quimicamente por Hidróxido de Sódio (NaOH)

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imprimir os *scaffolds* de PLA para o cultivo celular em placas de cultivo.
- Modificar a superfície do biopolímero com o tratamento de NaOH
- Avaliar a adesão e viabilidade de células da linhagem osteo-1 nos *scaffolds* de PLA tratados ou não, pelo método fluorimétrico de redução da resazurina.
- Avaliar as modificações ocorridas nos *scaffolds* tratados com NaOH pelas técnicas FTIR e AFM

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO DOS SCAFFOLDS DE PLA

O filamento utilizado para a impressão dos scaffolds foi o filamento transparente, da marca 3Dfila e diâmetro do filamento 1,75mm.

O filamento de PLA foi utilizado para impressão dos scaffolds, que foram impressos na forma de discos, a partir da técnica FDM (Fused Deposition Modeling) com a utilização de uma impressora 3D da marca Creality, modelo Ender-3 (Figura 9) e software Cura Ultimaker, para ajustar as configurações de fatiamento, temperatura e velocidade de impressão dos protótipos. A temperatura utilizada na cabeça extrusora da impressora 3D foi de 170°C, a velocidade de impressão foi de 15 mm/s e preenchimento de 20%. O scaffold foi impresso no diâmetro 15, 2mm para ser utilizado na placa de cultivo de 24 poços. Os scaffolds foram impressos pelo Pesquisador Me. Igor Tadeu Batista.

Figura 9: Impressora 3D utilizada para impressão dos scaffolds

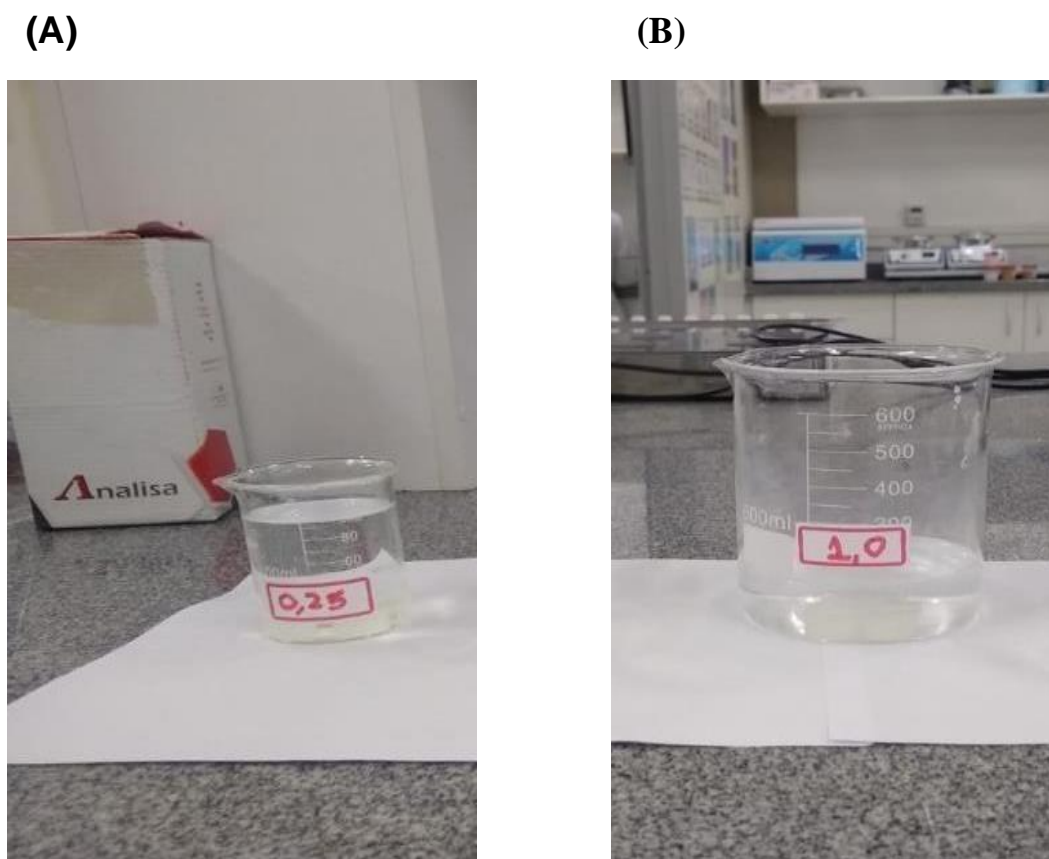


Fonte: Batista, 2021

5.2 TRATAMENTO DOS SCAFFOLDS COM NaOH

Os *scaffolds* de PLA impressos em 3D pela técnica FDM foram inicialmente colocados em um béquer com 200ml de água destilada e mantidos durante 24 horas no agitador magnético para lavagem, com a finalidade de retirar qualquer impureza dos *scaffold*. Após 24 horas os *scaffolds* foram tratados com 0.25M e 1M de NaOH em solução de 100ml de água destilada durante 1 hora a temperatura ambiente (Figura 10). Após uma hora do tratamento os *scaffolds* foram lavados com água destilada e secos em estufa a 40°C durante 2 horas, até que estivessem totalmente secos.

Figura 10 : Tratamento Alcalino dos scaffolds com diferentes concentrações de solução de NaOH. (A) 0,25M NaOH e (B) 1M NaOH



Fonte:(Autoria própria, 2020)

5.3 ESTERILIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS DE PLA

A esterilização dos suportes de PLA se deu pela imersão dos suportes em solução de álcool 70%. Após completa evaporação os mesmos suportes foram submetidos a exposição na luz UV em capela de fluxo laminar, permanecendo em exposição UV durante 1 hora para cada lado do disco.

6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS SCAFFOLDS DE PLA

6.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER MODO REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FTIR – ATR)

Espectroscopia no infravermelho é um método físico de caracterização para análise quantitativa de traços de elementos. Isso é possível porque os átomos que formam as moléculas possuem uma frequência de vibração específica, que varia de acordo com a estrutura, composição e modo de vibração de cada amostra. Dessa forma, para varrer essa gama de frequências utiliza-se o infravermelho.

A Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que fornece evidências de grupos funcionais presentes na estrutura de uma substância, podendo ser utilizada na identificação de compostos ou para estudo de sua composição química.

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (ATR) é a técnica da espectroscopia utilizada principalmente para análise de superfície em polímeros. O princípio da técnica está fundamentado no fato de que quando um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorre a reflexão. Dessa forma, compreende-se que a técnica de FTIR-ATR é uma técnica sensível as interações intermoleculares.

No presente estudo, a técnica foi utilizada para monitorar picos de absorção em regiões específicas para determinar as interações entre os grupos funcionais do *scaffold* de PLA e a mudança a eles causados pela modificação com a reação de hidrólise do NaOH. Para a análise foi utilizado o equipamento Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700. O espectro foi obtido entre as frequências de 4000 e 270 cm^{-1} .

As análises foram obtidas em colaboração com o Prof. Hernane Barud e o Prof. Wilton Rogério Lustri do grupo Quimera UNIARA.

6.2 TÉCNICA DA MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A microscopia de força atômica é uma técnica de análise que consiste na varredura da superfície de uma amostra com uma sonda a fim de obter sua imagem topográfica com resolução atômica.

O AFM opera medindo as forças entre a ponteira e a amostra que dependem de diversos fatores como, por exemplo, dos materiais que compõem a amostra e a ponteira, da distância entre elas, da geometria da ponteira e de qualquer tipo de contaminação que houver sobre a superfície da amostra. O detector mede a flexão que ocorre quando a ponta varre a superfície.

As análises foram obtidas em colaboração com a Prof.^a Dra. Sandra Andrea Cruz do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

6.3 ENSAIO DE VIABILIDADE E ADESÃO CELULAR

O cultivo celular da linhagem Osteo-1 foi realizado em meio DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Mediasuplementado), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa humidificada, a temperatura de 37°C com injeção de 5% de CO₂.

Para avaliar a influência da superfície quimicamente modificada dos scaffolds na adesão celular foi realizado o ensaio de adesão celular e viabilidade utilizando o método fluorimétrico com o reagente resazurina, que detecta a atividade mitocondrial de células saudáveis

Inicialmente, em uma placa de 24 poços, foram inseridos os *scaffolds* de PLA tratados e não tratados e foram semeadas 2×10^5 células por poço, incluindo poço sem PLA para o grupo controle de adesão.

A placa foi mantida em estufa humidificada, a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de 4 horas, foi verificada a adesão celular. Para isso o meio de cultivo foi removido e os poços lavados com PBS 1X estéril para a remoção das células não aderidas.

Em seguida foi adicionada solução de resazurina a 10% em meio de cultura (v/v) e a placa foi incubada por 4 horas na estufa. Depois da incubação com a resazurina, 100µl desta solução foram transferidos para uma placa de 96 poços para a leitura da fluorescência em leitor de placa Spectra Max (Molecular Devices) a 570nm excitação e 590nm emissão. Após a remoção total da solução de resazurina, foi adicionado meio DMEM aos poços e a placa contendo os *scaffolds* celularizados, foi mantida em cultura por mais 24 horas. Após 24 horas foi realizada a medida da fluorescência para a avaliação da viabilidade celular.

Ao final do procedimento experimental, o meio de cultura foi removido, os poços lavados com PBS1X e as células foram fixadas por 15min em paraformaldeído 4% em PBS (v/v) a temperatura ambiente. Depois de fixadas as células foram marcadas com o fluoróforo DAPI (marcador nuclear) e fotografadas em microscópio de fluorescência Zeiss, modelo Vert.A1 utilizando o software AxionVision Rel.4.8

Os Resultados da adesão e viabilidade celular foram apresentados como porcentagem comparado ao grupo controle 100% ,que foram os valores obtidos de fluorescência das células cultivadas sem a presença de PLA. nos tempos de 4 e 24 horas.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 FTIR - ATR

A Figura 11 representa os espectros obtidos para as amostras de PLA. No gráfico obtido (a) representa o grupo controle (PLA sem tratamento) (b) representa PLA tratado com 0,25M NaOH, e (c) representa PLA tratado com 1M NaOH

Segundo a análise do espectro obtido, temos, deformação angular (picos stretching) da ligação C-O em 1077 e 1180 cm^{-1} , característico dos ésteres e ácidos carboxílicos.

Em 1745 cm^{-1} temos deformação axial (picos de bending) da ligação C=, característico de ésteres, ainda, é possível notar a banda de *stretching* das ligações CH₃ em 2955 e 3000 cm^{-1} .

Outras bandas destacadas são as de deformação axial e *rock* (movimento de balanço) das ligações CH₃, em respectivamente, 867 cm^{-1} e 753 cm^{-1} .

As principais bandas entre 1300-1500 cm^{-1} são referentes à deformação angular simétrica da ligação C-H do metileno (CH₂) e da metila (CH₃). Os picos 1180, 1359 e 1270 cm^{-1} representam o alongamento (C-C) e o pico de 1454 cm^{-1} é a articulação (CH). (CHANAPPLE, ANANDJIWALA E RAY, 2013). Esses picos foram observados em todas as amostras de filamentos de PLA disponíveis comercialmente. Portanto, o ensaio confirmou que os picos são semelhantes em todas as amostras de PLA.

Para o tratamento de hidrólise alcalina do *scaffold* de PLA com NaOH, é esperado o surgimento de hidroxilas (OH) na região próxima de 3500 cm^{-1} por meio da clivagem da ligação éster no PLA.

A Figura 11 representa que as mudanças químicas-estruturais ocorreram no comprimento de onda de 3300 a 3610 cm^{-1} .

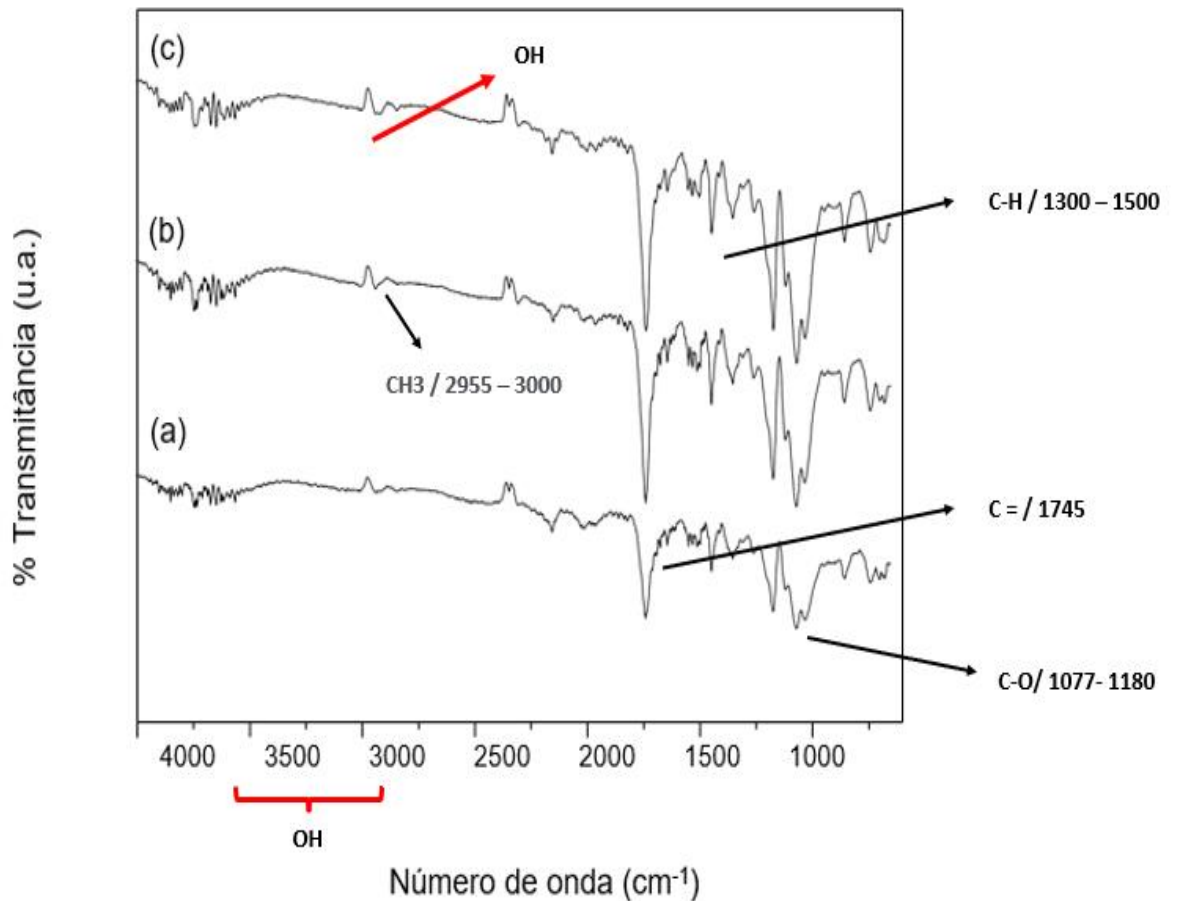
O aparecimento de grupos -OH- foi observado e conforme a concentração de NaOH utilizada aumenta, a intensidade do pico -OH aumentou. Isso confirmou que a clivagem da ligação éster sob o tratamento dos scaffolds com NaOH ocorreu com sucesso, assim como afirma em SABEE, et al, 2016.

O FTIR também indicou que os scaffolds tratados com NaOH 1M apresentaram maior intensidade, estando essa afirmação de acordo com as expectativas, pois, maiores concentrações de NaOH apresenta maior capacidade de clivar ligações éster,

portanto, na concentração mais alta de NaOH, a intensidade do pico da ligação -OH é maior.

De acordo com os resultados obtidos a partir da técnica FTIR-ATR pode-se concluir então que a hidrólise alcalina dos scaffolds com NaOH modificou com sucesso a superfície dos biopolímeros de PLA, alterando sua característica de superfície hidrofóbica para uma superfície mais hidrofílica.

Figura 11: Análise por FTIR para os *scaffolds* tratados com NaOH. a) PLA sem tratamento b) PLA tratado com 0.25M c) PLA tratado com 1M



Fonte: Elaboração própria

7.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A Figura 12 (Imagens A/B) representa a análise superficial topográfica do scaffold pela técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Figura 13 representa imagens do *scaffold* tratado quimicamente.

Com as figuras abaixo foi possível obter uma análise qualitativa com a comparação das mudanças visuais nas duas condições testadas (PLA puro e PLA tratado) na mesma região de Zoom.

Pelas imagens das amostras, é possível observar uma mudança aparente na rugosidade superficial do biopolímero tratado, validando assim a afirmação de que o *scaffold* quando submetido ao tratamento com NaOH, sofre mudanças em sua rugosidade superficial

Ainda, podemos observar nas imagens do PLA hidrolisado com NaOH obtidas em duas diferentes regiões de Zoom, aparente aumento na aspereza da superfície, causados pela erosão da superfície do polímero, ressaltando que as características do tratamento são responsáveis pela alteração na rugosidade superficial do biomaterial, dessa forma, afirmando a eficácia do procedimento aplicado, como observado na literatura citada na presente pesquisa.

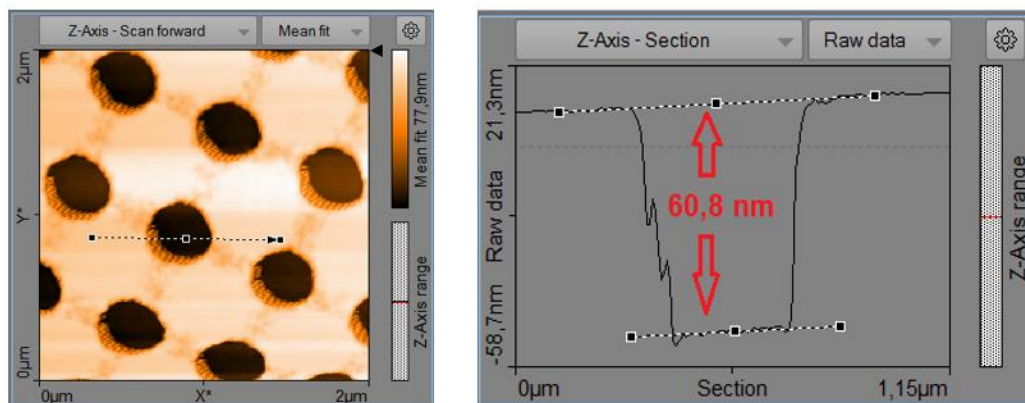
Visualmente nas figuras 13 e 14 observa-se pequenas nuances em questão à rugosidade. Onde na Figura 13 representando o PLA sem tratamento, apresenta uma rugosidade bruta e irregular e presença de desníveis no sentido da altura.

Na Figura 14 representando PLA tratado, pode-se observar novas características quando em comparação com a Figura 13. Em ambas imagens as rugosidades brutas são transformadas em microrugosidades, demonstrando também que a superfície tem aumento de irregularidades, pequenas e dispersas.

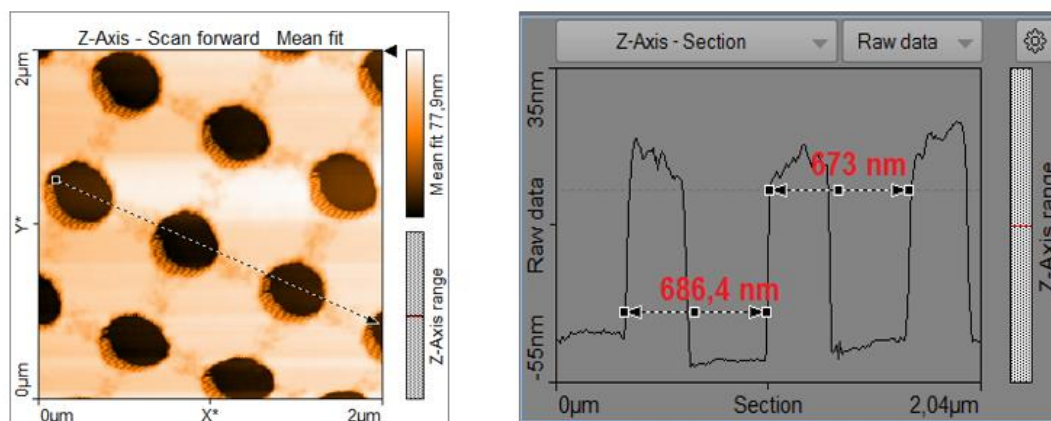
Figura 12 Imagens A e B referentes a calibração da topografia do scaffold.

Imagem C referente a topografia do scaffold

(A)



(B)



C

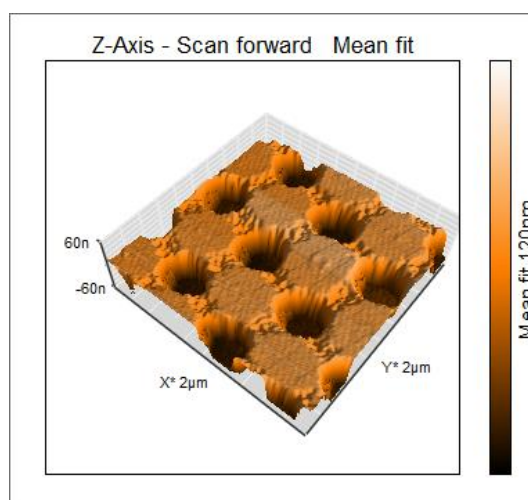


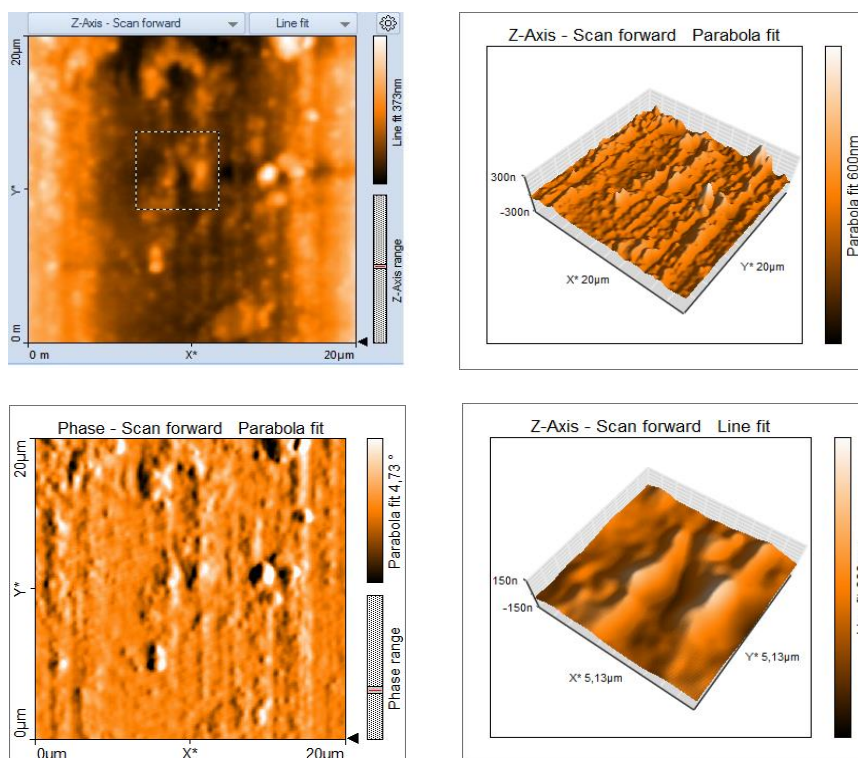
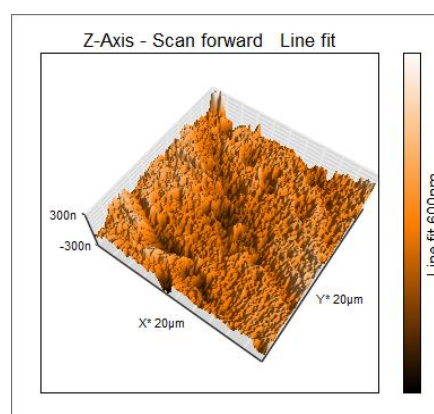
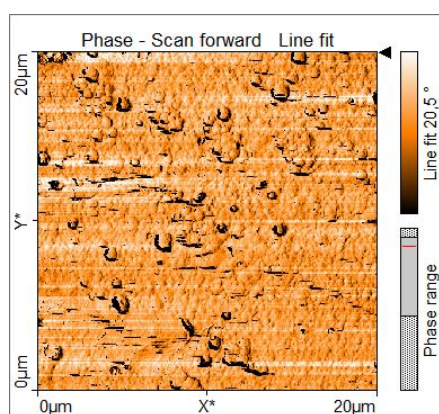
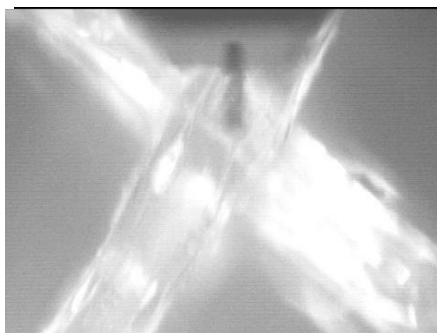
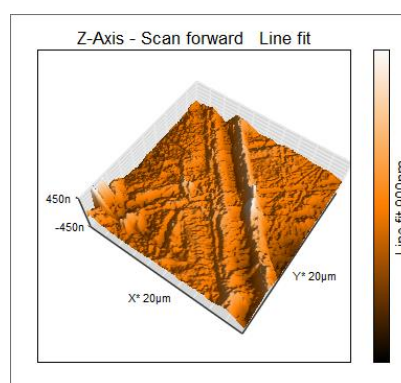
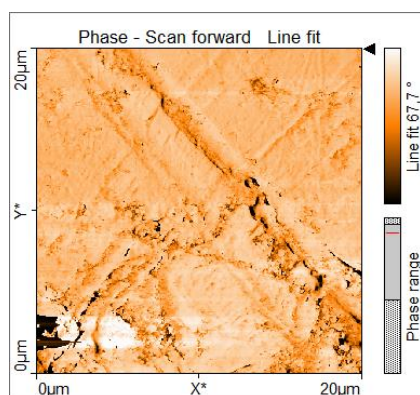
Figura 13 Imagens referentes a região zoom de 20 para 5 μ m no PLA puro (sem tratamento)**A****B**

Figura 14 A e B Imagens obtidas de diferentes regiões por AFM do PLA tratado com 0,25M de NaOH.

A



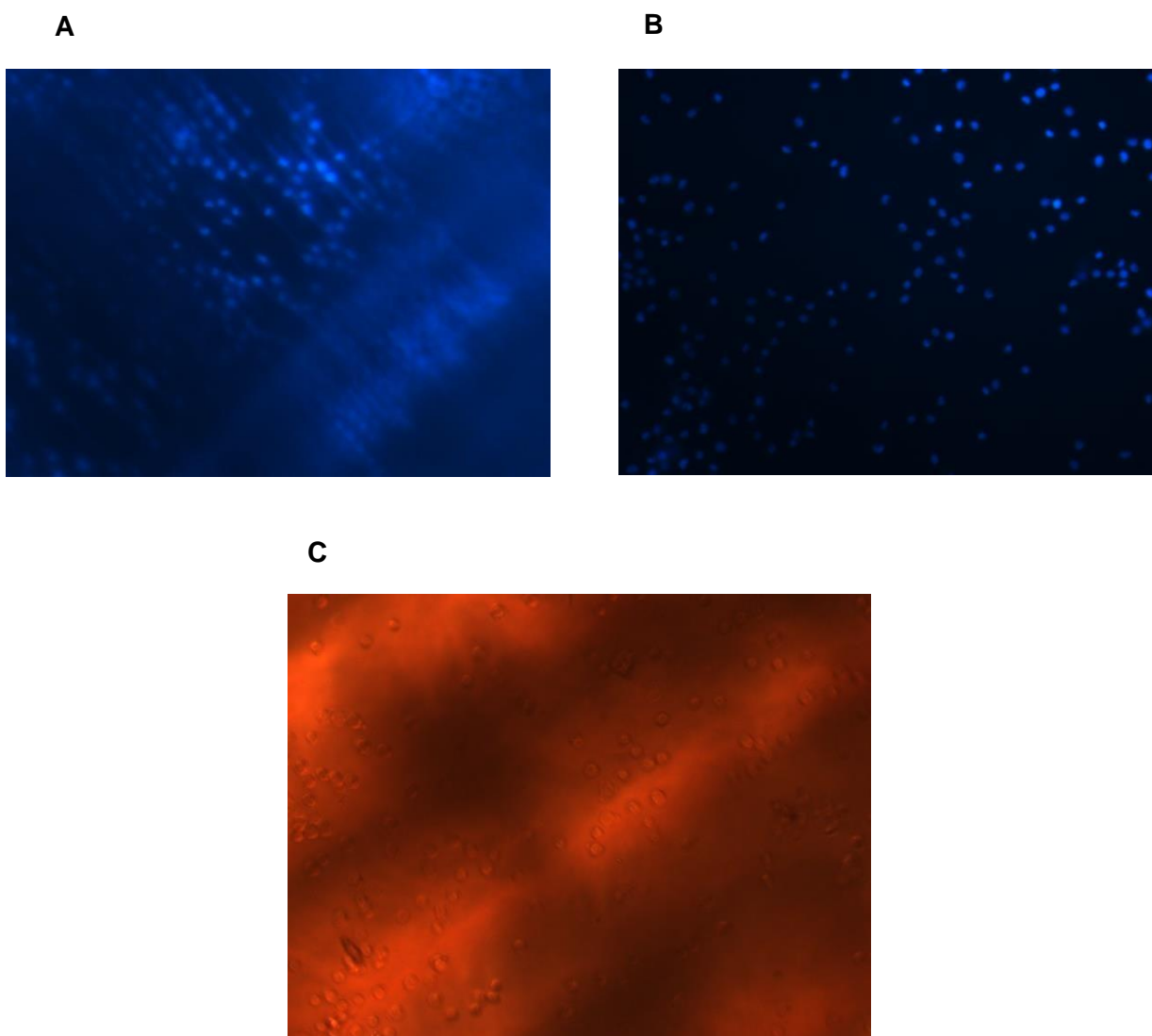
B



7.3 ENSAIO DE VIABILIDADE E ADESÃO CELULAR

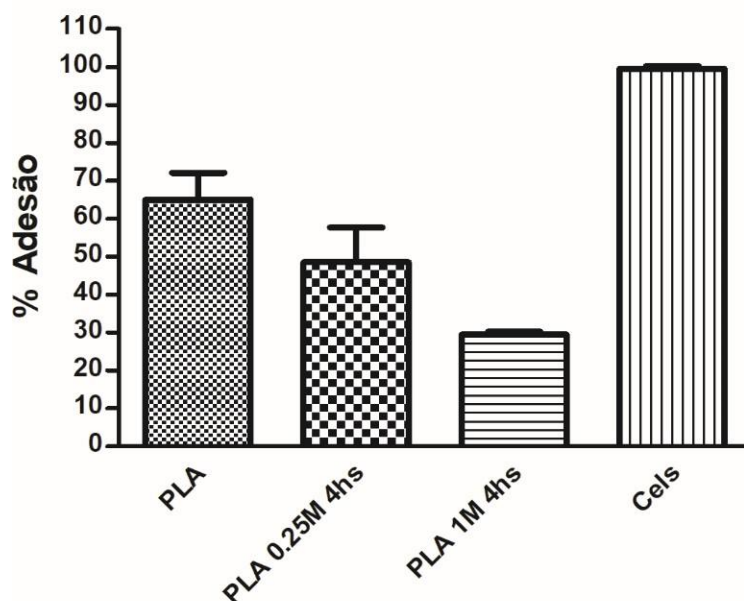
A Figura 15, representa de forma ilustrativa o resultado da adesão celular pelo marcador fluorescente DAPI nos *scaffolds* modificados quimicamente com NaOH e grupo controle. Por meio das imagens obtidas, pode-se observar que as células aderiram ao suporte, comprovando que o mesmo possui propriedade aderente e que a modificação química não afetou a propriedade atóxica do polímero.

Figura 15: A) Células aderidas no scaffold PLA tratado com NaOH coradas com DAPI aumento 4X. B) Mesmo campo das células aderidas fotografadas em campo claro; C) Células do grupo controle aderidas ao plástico coradas com DAPI



A Figura 16, mostra os resultados dos ensaios de adesão celular em função dos tratamentos do *scaffold*. Foi observado que na condição de tratamento com a solução 0,25M NaOH houve a maior porcentagem de adesão quando comparado com a condição de tratamento com 1M NaOH. Apesar desta diferença todas as condições testadas proporcionaram a adesão celular.

Figura 16: Ensaio de adesão celular de Osteo-1 cultivadas na presença de scaffolds de PLA tratados e não tratados pelo método de redução da resazurina



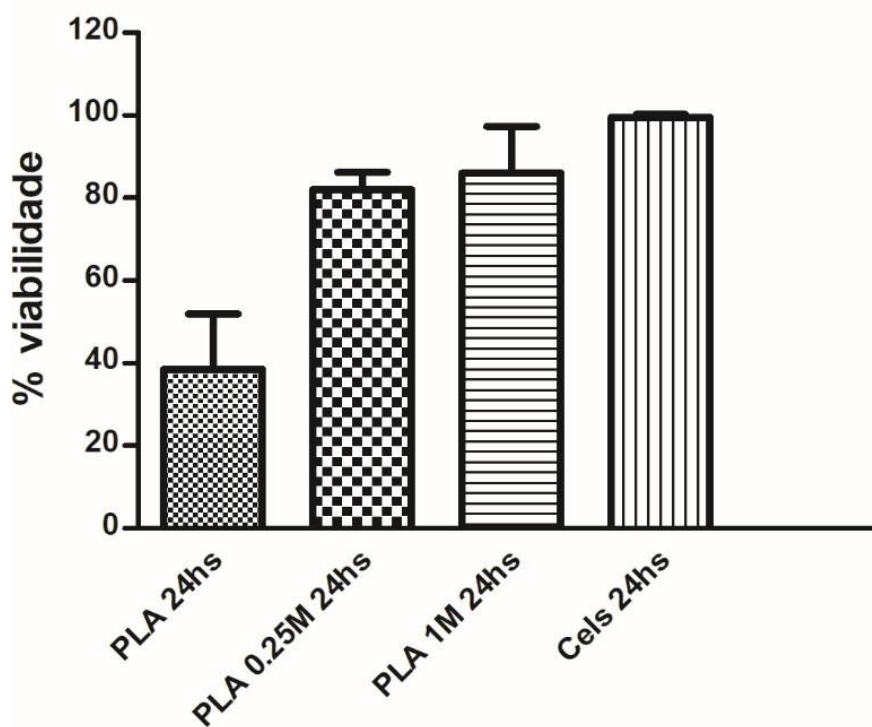
A figura 17 mostra os resultados de viabilidade celular nas condições testadas neste trabalho para a linhagem osteoblástica. Os resultados obtidos mostraram que a modificação química com NaOH nos *scaffolds* de PLA, não alterou a viabilidade celular em nenhuma condição de tratamento.

Ainda, de acordo com o gráfico, pode-se afirmar que os *scaffolds* tratados com 0,25M NaOH, apresentaram melhor viabilidade celular quando em comparação com a condição de tratamento de 1M NaOH, o que pode ser atribuído ao fato de que na menor concentração de NaOH a modificação química da superfície foi menos agressiva, enquanto que na condição de tratamento com 1M ocorre uma modificação mais agressiva, com introdução de novos grupos funcionais e perda de outros grupos

que poderiam ser atrativos para célula.

Conclui-se que a viabilidade celular em ambas condições de tratamento dos suportes obtiveram maior porcentagem de células viáveis quando em comparação com o biomaterial puro, sugerindo que o tratamento alcalino em *scaffolds* de PLA para a manutenção da viabilidade e proliferação celular é um tratamento eficaz. Esses dados corroboram com os apresentados por SABEE, *et al.*2016

Figura 17: Ensaio de Viabilidade celular de Osteo-1 cultivadas na presença de *scaffolds* de PLA tratados e não tratados pelo método de redução da resazurina



8. CONCLUSÕES

*A impressão tridimensional do *scaffold* de PLA pela técnica FDM permitiu que fossem estabelecidos os parâmetros para obtenção de um material em estrutura 3D para avaliação *in vitro* da adesão e viabilidade celular.

*As análises de AFM e FTIR confirmaram a modificação da superfície do material pelo tratamento alcalino

Os resultados dos ensaios biológicos, mostraram que as condições de tratamento alcalino testadas no presente trabalho não alteraram a capacidade de adesão celular, mas foi eficiente no incremento da viabilidade para as células osteoblásticas

9. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, V.; SINHA, M. **“A Review on Carrier Systems for Bone Morphogenetic Protein-2: Review on BMP-2 Carrier System”**. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 105, no 4 (maio de 2017): 904–25

ALBUQUERQUE, Maria Tereza Pedrosa. **Efeito de scaffolds de nanofibras incorporados com antibióticos sobre biofilmes formados por bactérias presentes nos canais radiculares**. Trabalho de conclusão de curso (Tese), Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2015

AREALIS, G. AND NIKOLAOU, V.S. (2015) **Bone Printing: New Frontiers in the Treatment of Bone Defects**. *Injury*, 46, S20-S22.

AUBIN, J. A.; TURKSEN, K.; HEERSCHKE, J. N. M. **Osteoblastic cell lineage**. In: EdtNoda, M., *Cellular and Molecular Biology of Bone*, Academic Press, San Diego, 2-45, 1993

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. **Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. Vol. 15, nº 1, p. 13-21, 2005.

BRITO, G. F. et al. **Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes**. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, Campina Grande, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.

BRUNELLO, G. et al. **Powder-based 3D printing for bone tissue engineering**. *Biotechnology advances*, Volume 34, Issue 5, September–October 2016, Pages 740–753, 2016.

BURG, Karen JL; PORTER, Scott; KELLAM, James F. **Biomaterial developments for bone tissue engineering**. *Biomaterials*, v. 21, n. 23, p. 2347-2359, 2000.

BORGES. **Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso**. 2013

CHIA, Helena N.; WU, Benjamin M. **Recent advances in 3D printing of biomaterials**. *Journal of biological engineering*, v. 9, n. 1, p. 1, 2015.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. **Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review**. *International Journal of Polymer Science*, v. 2011, n. ii, 2011

FATTINI, C.A.; DANGELO, J.G. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007.

FOGGIATTO, José Aguiomar et al. **Estudos de parâmetros da tecnologia de prototipagem rápida FDM para melhorias no planejamento de processo**, V CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE FABRICAÇÃO, Belo Horizonte, 2009.

HE e LI, **2020 Biomaterials affect cell-cell interactions in vitro in tissue engineering**.

Journal of Materials Science & Technology - 2020

HOQUE, M. Enamul; CHUAN, Y. Leng; PASHBY, Ian. **Extrusion based rapid prototyping technique: an advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication**. Biopolymers, v. 97, n. 2, p. 83-93, 2012.

JUDAS F. **Contribuição para o estudo de enxertos ósseos granulados alógenos e de biomateriais**. 2012; Tese de Doutorado, FMUC, Coimbra

JUNQUEIRA, L.C; CARNEIRO, J. **Tecido ósseo. Histologia básica**. Rio de Janeiro: Editora GuanabaraKoogan; p. 132-148; 2013

KURZINA, et al. **Surface property modification of biocompatible material based on polylactic acid by ion implantation**. Surface & Coatings Technology (fevereiro de 2020)

LASPRILLA, Astrid JR et al. **Poly-lactic acid synthesis for aNaPplication in biomedical devices—A review**. Biotechnology advances, v. 30, n. 1, p. 321-328, 2012.

LIAW, C. Y.; GUVENDIREN, M. **Current and emerging applications of 3D printing in medicine**. *Biofabrication*, v. 9, n. 2, 2017.

LIU, Y.; LIM, J.; TEOH, S. H. Review: **Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering**. Biotechnology Advances, v. 31, n. 5, p. 688–705, 2013.

LOI, F.; CÓRDOVA, L.A.; PAJARINEN, J.; LIN, T.; YAO, Z.; GOODMAN, S.B. **“Inflammation, Fracture and Bone Repair”**. *Bone* 86 (2016): 119–30.

LOPES, M. S.; JARDINI, A. L.; FILHO, R. M. **Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering ANaPlications**. Procedia Engineering. Volume 42. P. 1402-1413. 2012.

MAIA, M.; KLEIN, E. S.; MONJE, T. V.; PAGLIOSA, C.; *Rev. Bras. Cir. Plást.* **2010**, 25, 566.

MARTIN, I., WENDT, D., HEBERER, M. **The role of bioreactors in tissue engineering**. Trends in Biotechnology, v. 22, 80-66, 2004.

MELLO, Carlos Henrique Pereira et al. **Análise da qualidade superficial e dimensional em peças produzidas por modelagem por deposição de material fundido (FDM)**. Revista Produção Online, v.10, n. 3, p. 504-523, 2010

MELLO, CHP; SILVA, CES da; COSTA, SC da. **Comparação de três diferentes tecnologias de prototipagem rápida em relação a critérios de custo e tempo.** XXVI ENEGEP - Fortaleza, CE, 2006.

M. M. S. MOHD SABEE¹, N. A. KAMALALDIN², B. H. YAHAYA², Z. A. ABDUL HAMID¹. **Characterization and In Vitro Study of Surface Modified PLA Microspheres Treated with NaOH.** Journal of Polymer Materials (March 2016)

MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J. and TERAQ, N. **Biomaterials**, 1989. v. 10, p. 475- 480.

MOTTA, A.C. **Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico)-PLLA e Poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico)- PGLA e estudo da degradação in vitro.** Campinas,2002. 85p. Dissertação de Mestrado, FEM/IQ/ UNICAMP

PARK, H. et al. **Three-dimensional constitutive model for shape memory polymers using multiplicative decomposition of the deformation gradient and shape memory strains.** **Mechanics of Materials**, v. 93, p. 43–62, 2016.

PINTO, et al., 2019 “**Estudo da biocompatibilidade in vivo de arcabouço de poli(ácido láctico) (pla) fabricados por impressão 3d para aplicações em engenharia tecidual**”. :A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde 5 (pp.118-125).

PIRES, A. L. R.; MORAES, A. M.; *J. APPL. POLYM. SCI.* 2015, 132, 41686.

PROIKAKIS, C.S.; TARANTILI, P.A. and ANDREOPOULOS, A.G. **J. Of Elastomers and Plastics.** 2002. v.34, p.49-63.

ROCHA, A.M.; QUINTELLA, C.M.; TORRES, E.A. “**Prospecção de artigos e patentes sobre polímeros biocompatíveis aplicados à engenharia de tecidos e medicina regenerativa**”. Organizado por Cristina M. Quintella. *Cadernos de Prospecção* 5, no 2 (30 de junho de 2012): 72-85.

SANTOS, George Gonçalves dos; MARINHO, Sônia Maria Oliveira Cavalcanti; MIGUEL, Fúlvio Borges. **Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso.** 2013

SEEMAN, E. **Bone quality: The material and structural basis of bone strength.** Journal of Bone and Mineral Metabolism, v. 26, n. 1, p. 1-8, 2008

SCHNEIDER, M. et al. **Surface etching of 3D printed poly(lactic acid) with NaOH: A systematic approach.** Polymers, v. 12, n. 8, 2020.

SOBOTTA J. **Atlas de Anatomia Humana (Sobotta).** Rio de Janeiro, Ed. Guanabara-Koogan. 23ªed, 2013.

TRIPLETT, R.G.; BUDINSKAYA, O. “**New Frontiers in Biomaterials**”. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 29, no 1 (fevereiro de 2017): 105-15.

- WANG, M.; FAVI, P.; CHENG, X.; GOLSHAN, N.H.; ZIEMER, K.S.; KEIDAR, M.; WEBSTER, T.J. **“Cold Atmospheric Plasma (CAP) Surface Nanomodified 3D Printed Polylactic Acid (PLA) Scaffolds for Bone Regeneration”**. *Acta Biomaterialia* 46 (dezembro de 2016): 256-65.
- ZHOU, H., LEE, J., 2011. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. **Acta Biomater.** 7, 2769_278