



# PRODUÇÃO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS COMPÓSITAS DE ALGINATO E QUITOSANA INCORPORADAS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE

**Palavras-Chave:** BIOMATERIAIS, MANUFATURA ADITIVA, HIDROGÉIS

**Autores:**

Gustavo da Silva Granjeira, FCA – UNICAMP

Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Laís Pellizzer Gabriel (orientadora), FCA - UNICAMP

---

## INTRODUÇÃO:

A manufatura aditiva tem sido amplamente empregada na área médica em diversas aplicações, desde a criação de modelos precisos da estrutura anatômica humana até a produção personalizada de implantes, como os utilizados em cirurgias plásticas. Por meio do uso de matrizes, scaffolds, porosas, é possível utilizar diversos materiais biocompatíveis e com baixa citotoxicidade, que favorecem a proliferação celular e a difusão de nutrientes. [1].

Dentre as diversas possibilidades de materiais, os hidrogéis à base de alginato se destacam pela versatilidade, sendo amplamente utilizados em processos de extrusão para a fabricação de cartilagem artificial, curativos, sistemas de liberação controlada de fármacos, entre outros. No entanto, uma de suas limitações é a baixa estabilidade estrutural. Para contornar esse problema, a quitosana — um polissacarídeo derivado da quitina, com propriedades antimicrobianas e cicatrizantes — tem se mostrado eficaz quando combinada ao alginato, possibilitando a produção de scaffolds com propriedades mecânicas adequadas, porosidade controlada e capacidade de liberação de íons. Esses fatores contribuem para a criação de um microambiente favorável à adesão, proliferação e diferenciação celular. [2].

Outro desafio associado ao uso clínico de dispositivos médicos é a ocorrência de infecções decorrentes da colonização bacteriana em superfícies implantadas. A incorporação de nanopartículas metálicas com ação antimicrobiana, como o óxido de cobre (CuO), tem se mostrado uma estratégia promissora para mitigar esse problema [3]. Nesse contexto, este projeto propõe a fabricação de scaffolds 3D de alginato e quitosana incorporando nanopartículas de CuO, com o objetivo de obter estruturas com propriedades mecânicas adequadas, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana.

## METODOLOGIA:

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Polímeros (LPol), com foco na preparação de hidrogéis de alginato/quitosana e na posterior fabricação de scaffolds por manufatura aditiva (MA).

### 2.1 Materiais

Foram utilizados alginato na forma de pó, quitosana na forma de pó, ácido acético glacial e cloreto de cálcio, adquiridos da Merck; argila Montmorilonita e nanopartículas de óxido de cobre (CuO) adquiridas da Sigma Aldrich.

### 2.2 Preparo dos Hidrogéis

Foram preparadas soluções de alginato 4% (m/v) em água destilada e quitosana 2% (m/v) em 0,5% de ácido acético. Diversas proporções entre os polímeros foram testadas (de 1:1 a 1:8), visando encontrar uma formulação adequada à impressão 3D. Foram também testadas combinações de alginato (4% (m/v)) com Montmorilonita (1 a 4%) para melhorar a mistura e a reologia. A reticulação da solução foi feita com solução de cloreto de cálcio.

### 2.3 Impressão 3D

Para a modelagem e parametrização, foi elaborada uma planilha no Excel (figura 1) capaz de gerar códigos G (g-code) que replicam o formato dos scaffolds a serem impressos, otimizando o controle de parâmetros de impressão, como velocidade, número de camadas, altura de cada camada, número de linhas e colunas, entre outros; além de permitir a rápida alteração de tais parâmetros. As impressões foram realizadas na impressora Allevi 2, por extrusão, utilizando seringas plásticas.

B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	Y	Z	E	G-Code Vertical Camada 1	0	X	Y	Z	E	G-Code Horizontal Camada 1	G-Code Vertical Camada 2	G-Code Horizontal Camada 2		
2	0	0		G1 X0 Y0 Z0 F1800;	Up	72,15	0	0,055		G1 X72,15 Y0 Z0,055 F1800;	G1 X0 Y0 Z0,11 F1800;	G1 X72,15 Y0 Z0,165 F1800;	0,22	
3				G92 E0;	1,95					G92 E0;	G92 E0;	G92 E0;		
4	39		0,01	G1 X0 Y39 E0,01 F1800;	72,2	0	0	0,05		G1 X0 Y0 E0,05 F1800;	G1 X0 Y39 E0,26 F1800;	G1 X0 Y0 E0,64 F1800;	0,85	
5				G92 E0;						G92 E0;	G92 E0;	G92 E0;		
6	39			G1 X1,95 Y39 E F1800;		0	1,95			G1 X0 Y1,95 E F1800;	G1 X1,95 Y39 F1800;	G1 X0 Y1,95 F1800;		
7				G92 E0;						G92 E0;	G92 E0;	G92 E0;		
8	0		0,02	G1 X1,95 Y0 E0,02 F1800;		72,15	1,95	0,06		G1 X72,15 Y1,95 E0,06 F1800;	G1 X1,95 Y0 E0,27 F1800;	G1 X72,15 Y1,95 E0,65 F1800;	0,86	
9				G92 E0;						G92 E0;	G92 E0;	G92 E0;		
10	0			G1 X3,9 Y0 E F1800;		72,15	3,9			G1 X72,15 Y3,9 E F1800;	G1 X3,9 Y0 F1800;	G1 X72,15 Y3,9 F1800;		
11				G92 E0;						G92 E0;	G92 E0;	G92 E0;		
12	39		0,03	G1 X3,9 Y39 E0,03 F1800;		0	3,9	0,07		G1 X0 Y3,9 E0,07 F1800;				
13				G92 E0;						G92 E0;				
14	39			G1 X5,85 Y39 E F1800;		0	5,85			G1 X0 Y5,85 E F1800;				
15				G92 E0;						G92 E0;				
16	0		0,04	G1 X5,85 Y0 E0,04 F1800;		72,15	5,85	0,08		G1 X72,15 Y5,85 E0,08 F1800;				
17				G92 E0;						G92 E0;				
18	0			G1 X7,8 Y0 E F1800;		72,15	7,8			G1 X72,15 Y7,8 E F1800;				
19				G92 E0;						G92 E0;				
20	39		0,01	G1 X7,8 Y39 E0,01 F1800;		0	7,8	0,09		G1 X0 Y7,8 E0,09 F1800;				
21				G92 E0;						G92 E0;				
22	39			G1 X9,75 Y39 E F1800;		0	9,75			G1 X0 Y9,75 E F1800;				
23				G92 E0;						G92 E0;				
24	0		0,02	G1 X9,75 Y0 E0,02 F1800;		72,15	9,75	0,1		G1 X72,15 Y9,75 E0,1 F1800;				
25				G92 E0;						G92 E0;				
26	0			G1 X11,7 Y0 E F1800;		72,15	11,7			G1 X72,15 Y11,7 E F1800;				
27				G92 E0;						G92 E0;				
28	39		0,03	G1 X11,7 Y39 E0,03 F1800;		0	11,7	0,11		G1 X0 Y11,7 E0,11 F1800;				
29														

Parâmetros	
Tamanho da malha (mm)	10,08
Número de Poros	14
Largura do Filamento (mm)	0,27
Tamanho dos poros (mm)	0,450
Altura da Camada (mm)	0,200
Velocidade para primeira solução (mm/min)	210,00
Velocidade para segunda solução (mm/min)	210,00
Imprimir com 2 extrusoras	Sim
Imprimir Mesclando Horizontal e Vertical	Sim
Número de Camadas	50
Altura entre cada camada	0,008

Figura 1: Parâmetros alterados para a criação de cada modelo de g-code a ser utilizado pela bioimpressora e parte da planilha feita para criar os códigos de g-code.

## 2.4 Pós-processamento e Caracterizações

As amostras foram liofilizadas no liofilizador (JJ Scientific modelo LJJ02), presente no LPol. Até o presente momento da escrita deste resumo, as amostras ainda estão sendo preparadas com o óxido de cobre e serão caracterizadas morfológicamente por MEV, estruturalmente por FTIR e DRX, e termicamente por TGA. A viabilidade celular será avaliada pelo ensaio de MTT com células MC3T3-E1 e a atividade antimicrobiana por teste baseado na ISO 22196 com bactérias de referência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foi realizada a ambientação completa com os equipamentos do laboratório a serem utilizados na pesquisa, incluindo a bioimpressora Allevi 2, liofilizador, agitador magnético, ultrassom, centrífuga, turrax, vortex, pHmetro, autoclave e fluxo laminar. Além disso, foi realizado treinamento prático em cultivo celular, visando a futura aplicação dos scaffolds desenvolvidos.

Diversas tentativas foram conduzidas para realizar a mistura das soluções de alginato, quitosana e cloreto de cálcio. Em dezenas de testes com diferentes proporções, variando de 1:1 a 1:8 (alginato:quitosana), as formulações não apresentaram resultados satisfatórios para a impressão 3D, frequentemente originando suspensões que entupiam a ponteira da impressora durante o processo (Figura 2).

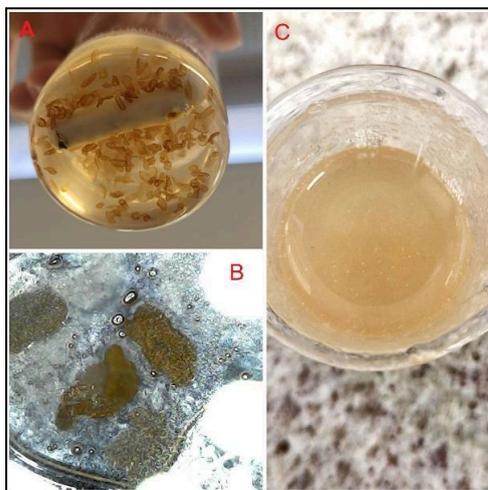


Figura 2 - (A) Teste de mistura mostrando aglomerados de quitosana suspensos na solução de alginato, com parte da quitosana solubilizada. (B) Detalhe de um grupo de aglomerados observado por microscópio digital. (C) Outro teste de solubilização, evidenciando pontos brancos de quitosana não solubilizada na matriz de alginato.

Foram preparadas soluções de alginato contendo argila montmorilonita, uma vez que esta é frequentemente utilizada para facilitar a mistura entre quitosana e alginato [4, 5]. Foram realizados testes com concentrações de argila de 1%, 2% e 4% (massa/volume), nos quais se observou que, quanto maior a concentração de argila, melhor o desempenho da solução para impressão. No entanto, após a liofilização, verificou-se que o aumento da concentração de argila também torna as amostras mais quebradiças e difíceis de manipular (Figura 3).

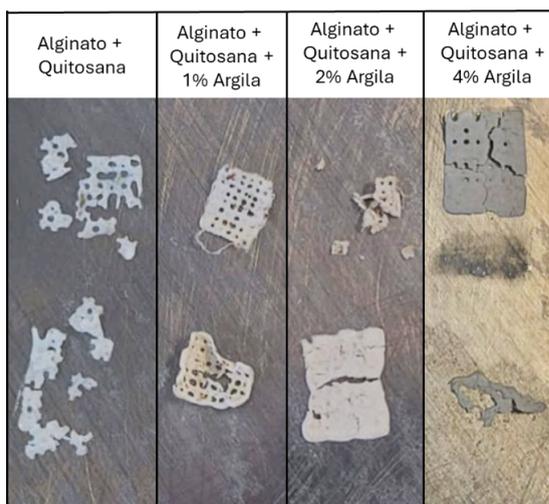


Figura 3 - Amostras liofilizadas contendo alginato, quitosana e diferentes concentrações de argila. As amostras com apenas alginato e quitosana se fragmentaram facilmente. O aumento gradual da quantidade de argila melhorou a integração entre os componentes, mas resultou em maior fragilidade após a liofilização.

Foram consultados artigos que utilizavam alginato e quitosana sem a necessidade de misturar as soluções, nos quais as amostras demonstraram manter a viabilidade celular e a capacidade de liberação de fármacos mesmo após todos os processos de fabricação [6, 7]. A partir disso, foram realizados testes para avaliar como as duas soluções interagem entre si antes e após a liofilização, utilizando concentrações de 6% para o alginato e 5% para a quitosana, solubilizada em ácido acético a 25%, com base nas concentrações relatadas nos artigos revisados [6, 7] (Figura 4).



Figura 4 - Na esquerda, amostra impressa com uma camada de alginato sobre uma camada de quitosana; Na direita, a amostra após ser liofilizada, não parece quebradiça como as amostras com argila e pode ser manipulada sem quebrar.

Dessa forma, optou-se por dar continuidade à pesquisa utilizando a impressão de camadas alternadas de quitosana e alginato, devido à maior facilidade de impressão, padronização dos resultados e melhor manipulação das amostras após a liofilização.

Com esse novo método de impressão, com camadas alternadas de alginato e quitosana, foram realizados testes e foram encontrados os parâmetros ideais para a impressão de ambas soluções.

A etapa de incorporação das nanopartículas de óxido de cobre ainda não foi iniciada devido à pendência na entrega do insumo, já adquirido. Essa etapa será conduzida assim que o material estiver disponível, dentro do prazo restante para conclusão do projeto.

## CONCLUSÕES:

Ao longo do desenvolvimento deste projeto, diversos desafios práticos e metodológicos foram enfrentados, especialmente no que diz respeito à miscibilidade entre os biopolímeros utilizados. A incompatibilidade entre alginato e quitosana em solução exigiu inúmeras tentativas e reformulações, incluindo o uso de aditivos como a argila Montmorilonita, que embora tenha melhorado a impressão, comprometeu a integridade das amostras após a liofilização. Esses entraves foram superados com a adoção de uma estratégia alternativa baseada na deposição de camadas alternadas dos materiais, o que resultou em melhor estabilidade, controle da impressão e manuseio das amostras.

A próxima etapa envolve a incorporação das nanopartículas de óxido de cobre, ainda pendente devido a questões logísticas relacionadas à entrega do material. Essa fase, já planejada, será executada dentro do prazo restante, permitindo a realização das análises físico-químicas, biológicas e antimicrobianas. Apesar das adversidades, o projeto evoluiu de forma consistente e estratégica, demonstrando flexibilidade frente aos obstáculos e mantendo seu potencial de gerar scaffolds com propriedades antimicrobianas para aplicação na engenharia de tecidos.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] MARKSTEDT, Kajsa et al. **3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose–alginate bioink for cartilage tissue engineering applications**. *Biomacromolecules*, v. 16, n.5, p. 1489-1496, 2015.
- [2] LI, Zhensheng et al. **Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering**. *Biomaterials*. 2005.
- [3] RAMYADEVI, Jeyaraman et al. **Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles**. *Materials letters*, v. 71, p. 114-116, 2012.
- [4] MALLAKPOUR, Shadpour; AZADI, Elham; HUSSAIN, Chaudhery. **State-of-the-art of 3D printing technology of alginate-based hydrogels - An emerging technique for industrial applications**. *Advances in colloid and interface science*, 2021.
- [5] LEU, Rebeca, et al. **3D printing of alginate-natural clay hydrogel-based nanocomposites**. *Gels*. 2021.
- [6] SADEGHIANMARYAN, Ali et al. **Fabrication of chitosan/alginate/hydroxyapatite hybrid scaffolds using 3D printing and impregnating techniques for potential cartilage regeneration**. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022
- [7] BERGONZI, Carlo et al. **3D printed chitosan/alginate hydrogels for the controlled release of silver sulfadiazine in wound healing applications: design, characterization and antimicrobial activity**. *Micromachines*. 2023.