

IMPRESSÃO 3D DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS DE ÓXIDO DE ZINCO PARA ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS

Palavras-Chave: Alginato, Nanocompósitos, Impressão 3D, Engenharia tecidual, Reparo ósseo.

Autores(as):

Raquel Zaffalon Pires Germin, FCA – UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. Lais Pellizzer Gabriel (orientadora), FCA – UNICAMP

Dr. Eronildo Alves Pinto Junior (coorientador), IQ – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A crescente incidência de defeitos ósseos decorrentes de infecções, traumas e tumores tem impulsionado a busca por alternativas aos enxertos ósseos convencionais, que ainda apresentam limitações clínicas (Battafarano et al., 2021). Nesse contexto, a engenharia de tecidos surge como uma abordagem promissora, visando o desenvolvimento de scaffolds que ofereçam suporte estrutural e favoreçam a regeneração óssea (Perić Kačarević et al., 2020; Wang et al., 2020). A impressão 3D tem se destacado na fabricação dessas estruturas porosas, permitindo a incorporação de compostos bioativos com propriedades osteogênicas (Chen et al., 2021; Li et al., 2022; Zhang et al., 2023).

Dentre os biomateriais utilizados, os hidrogéis, especialmente os de alginato, ganham destaque por sua biocompatibilidade, porosidade e capacidade de carregar células e fármacos. No entanto, a aplicação clínica ainda é restrita, sendo necessário o aprimoramento dos materiais (Li et al., 2021; Badhe et al., 2023). As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) têm se mostrado eficazes por suas propriedades antibacterianas e osteogênicas (Hernández-González et al., 2020), e o uso de doadores de óxido nítrico, como o GSNO, pode potencializar esses efeitos (Won, et al., 2022).

Assim, o presente projeto tem como objetivo desenvolver hidrogéis de alginato para impressão 3D de *scaffolds* personalizados, avaliando sua printabilidade e comportamento reológico, além de incorporar ZnO e GSNO para estimular a regeneração óssea e reduzir infecções, oferecendo uma alternativa promissora na engenharia de tecidos com potencial aplicação clínica.

METODOLOGIA:

A metodologia desenvolvida neste projeto concentrou-se na formulação do hidrogel, impressão tridimensional e caracterização visual e reológica, conforme representado esquematicamente na Figura 1.

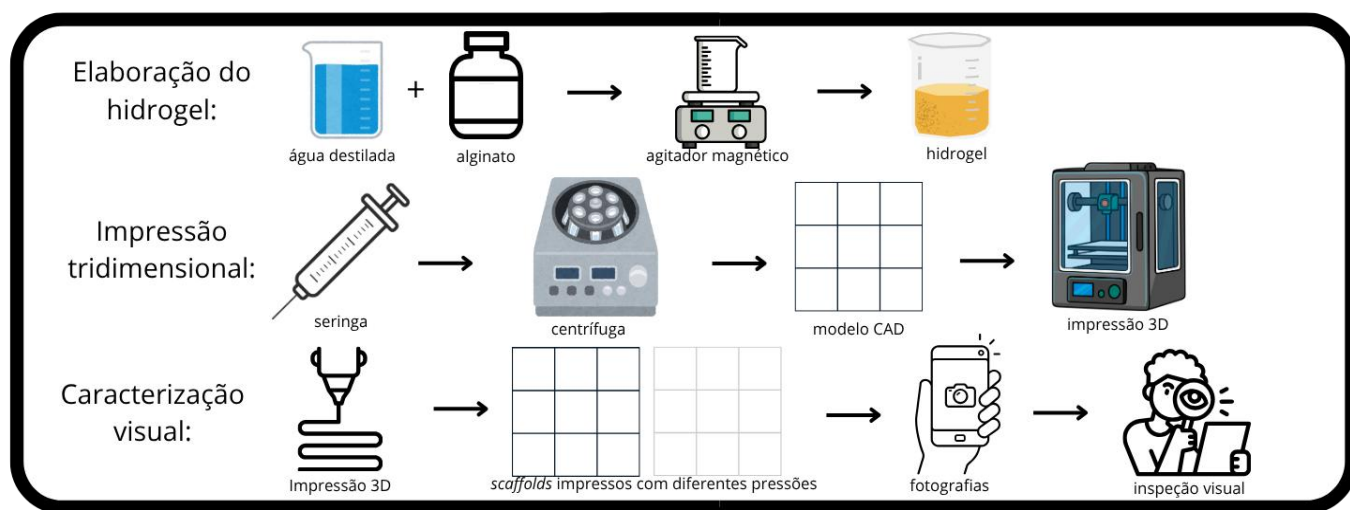


Figura 1. Modelo esquemático da metodologia de pesquisa quanto a fabricação, impressão e caracterização do hidrogel. (fonte: autoria própria)

Elaboração do hidrogel: Para o preparo dos *scaffolds*, foi utilizado alginato de sódio na concentração de 6% (m/m). O polímero foi adicionado gradualmente à água destilada sob agitação magnética até completa

dissolução. Em seguida, adicionou-se 1 mL de cloreto de cálcio (CaCl_2) 1 mol/L por gotejamento, promovendo a pré-reticulação e alcançando-se a homogeneização da solução por meio de homogeneizador tipo Ultra-Turrax. Em uma formulação paralela, também contendo alginato de sódio a 6% (m/m), foram incorporadas nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) na concentração final de 30 $\mu\text{g/mL}$, seguidas de homogeneização. As amostras foram armazenadas a 4 °C até o momento do uso.

Impressão tridimensional: para a impressão 3D, transferiu-se o alginato para uma seringa do tipo luer lock, em seguida foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm, com a finalidade de remover as bolhas, as quais podem comprometer a estrutura interna do *scaffold*, e condensar o hidrogel para que a impressão ocorra de maneira fluida. A partir de uma modelagem gerada por um CAD (desenho assistido por computador) e convertida para G-Code (linguagem de comandos utilizada pela impressora), foi utilizado o equipamento de impressão 3D, Allevi 2, com um bico de extrusão reto de 0,201 mm de diâmetro, a diferentes pressões de extrusão para construção dos modelos de *scaffolds*. Em conjunto, foi definida a velocidade de impressão equivalente a 1mm/s.

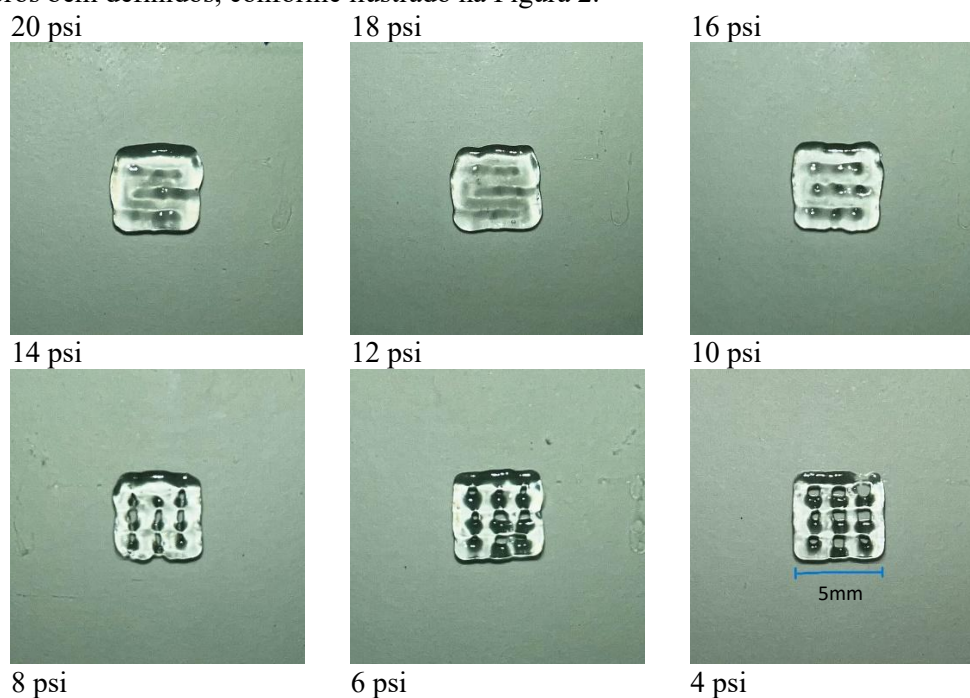
Caracterização visual: A otimização da pressão de extrusão foi realizada por inspeção visual de *scaffolds* impressos em diferentes pressões. As imagens foram obtidas em condições padronizadas de iluminação, fundo e distância. Considerou-se ideal o *scaffold* que apresentasse filamentos contínuos e poros bem definidos. Testes reológicos também foram realizados com objetivo de se avaliar a capacidade de impressão (printabilidade).

Caracterização reológica: conduzida utilizando um reômetro HAAKE MARS 60. Para tal, utilizou-se de uma geometria de placas paralelas (P35/2°) com um diâmetro de 35 mm e uma distância entre placas de 1 mm, a uma temperatura de 25 °C. Realizou-se testes no estado estacionário e oscilatório para duas amostras, uma de alginato com NPsZnO e outra de alginato com NPsZnO pré-reticulada com CaCl_2 :

- Viscosidade de cisalhamento em estado estacionário: realizado na faixa de 0,01 a 1000 s^{-1} .
- Varredura de amplitude: realizado a uma frequência angular de 10 rad. s^{-1} , variando-se a deformação de 0,01 a 100%, a fim de obter a faixa de viscoelasticidade linear (LVE). A deformação $\gamma_0 = 1\%$ foi adotada em ambas as amostras
- Recuperação da viscosidade: o qual foi realizado em três etapas para simular a impressão 3D, primeiramente com a aplicação de uma taxa de cisalhamento de 0,1 s^{-1} por um período de 60s (intervalo de descanso), após isso aumentou-se a taxa para 100 s^{-1} aplicada de forma constante pelo mesmo período e, por fim, retornou-se para a taxa de 0,1 s^{-1} e a manteve por um período de 360 s (intervalo de regeneração).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A avaliação da capacidade de impressão do hidrogel foi realizada por meio da caracterização visual descrita anteriormente. Foram testadas pressões de extrusão variando de 20 a 4 psi, em ordem decrescente, utilizando-se o mesmo hidrogel, a mesma velocidade de impressão e o mesmo diâmetro de bico. O intervalo de 8 a 10 psi foi considerado ideal, uma vez que apresentou melhor printabilidade, evidenciada pela formação de filamentos contínuos e poros bem definidos, conforme ilustrado na Figura 2.



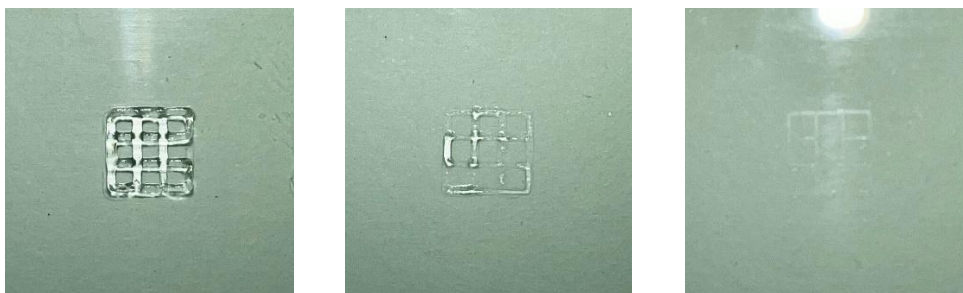


Figura 2: Estudo da capacidade de impressão de 20 a 4 psi, barra abaixo do 10 psi representando a escala de 5mm do scaffold. (fonte: autoria própria)

Observa-se que a pressão de extrusão influencia diretamente a qualidade da impressão. Em pressões mais elevadas (20 e 18 psi), a alta vazão do material resulta em filamentos com largura superior ao diâmetro do bico, o que prejudica a formação de poros e a fidelidade de impressão. Em pressões intermediárias (16, 14 e 12 psi), os poros começam a se formar, mas não apresentam padrão morfológico definido, e o filamento ainda se encontra com dimensões superiores às ideais. No intervalo entre 10 e 8 psi, observa-se a formação de filamentos contínuos com largura próxima ao diâmetro do bico e poros bem definidos, configurando-se como a faixa de pressão mais adequada para a impressão. Já em pressões mais baixas (6 e 4 psi), o filamento se torna descontínuo, com falhas visíveis na construção dos scaffolds. Abaixo de 4 psi, a pressão torna-se insuficiente para promover a extrusão do gel.

A reologia do hidrogel de alginato também desempenha papel fundamental na sua capacidade de impressão. Para essa avaliação, comparou-se um hidrogel de alginato sem pré-reticulação (Figura 3) com um hidrogel pré-reticulado com CaCl_2 (referido anteriormente na Figura 2).



Figura 3: Hidrogel de alginato (concentração 6% em massa) gotejando no bico em repouso.

Visualmente, observa-se que o hidrogel pré-reticulado apresenta maior viscosidade e estrutura mecânica mais estável, o que foi confirmado pelos resultados reológicos apresentados na Figura 4.

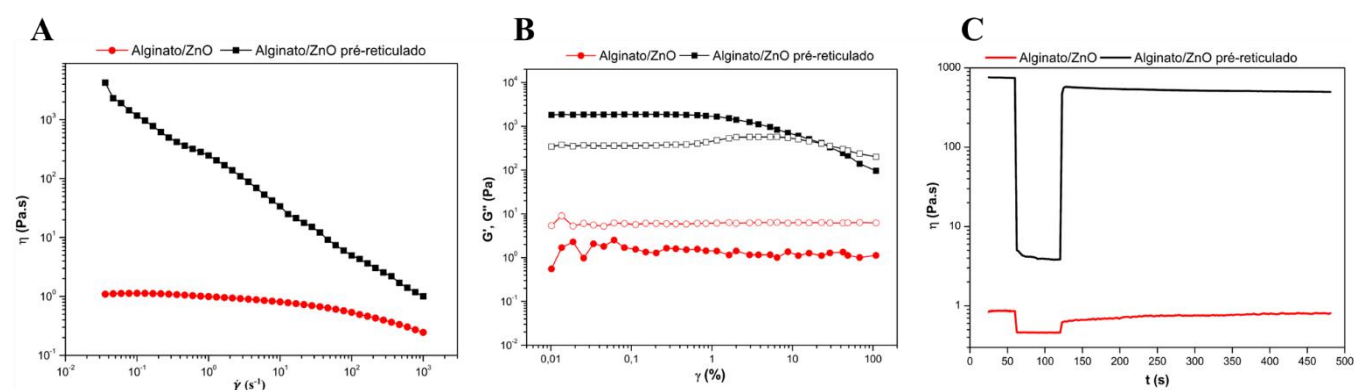


Figura 4. Ensaio de reologia. A) Viscosidade (η) como função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) sendo os quadrados referente ao alginato pré-reticulado e os círculos ao alginato sem pré-reticulação. B) Módulo de armazenamento (G') (símbolos preenchidos) e módulo de perda (G'') (símbolos vazados) em função da tensão (γ) para ambos os géis. C) Viscosidade (η) em função do tempo (t) em segundos para medir a recuperação dos géis com e sem pré-reticulação.

O teste de viscosidade – Figura 4 (a) - demonstrou que o alginato/ZnO apresentou um platô Newtoniano em taxas de cisalhamento baixas, o que é um comportamento característico esperado em soluções poliméricas. Já o

alginate pré-reticulado, apresentou um comportamento pseudoplástico, isto é, de um líquido não-Newtoniano, possuindo uma alta viscosidade em taxas de cisalhamento baixas, a qual diminui conforme a taxa de cisalhamento aumenta, comportamento esse adequado para impressão 3D de hidrogéis por extrusão, pois favorece a manutenção da forma após a deposição dos filamentos

A varredura de amplitude (Figura 4b) evidenciou que o hidrogel de alginato/ZnO sem pré-reticulação apresentou comportamento predominantemente do tipo líquido ($G'' > G'$) em toda a faixa de deformação analisada, sem ponto de cruzamento entre os módulos. Por outro lado, o hidrogel pré-reticulado apresentou comportamento do tipo sólido ($G' > G''$) em baixas deformações, com um ponto de cruzamento ($G' = G''$) bem definido, indicando a existência de um ponto de escoamento. Esse ponto marca a transição entre os comportamentos elástico e viscoso, simulando o momento de extrusão durante o processo de impressão.

A recuperação de viscosidade (Figura 4c) demonstrou que tanto o hidrogel pré-reticulado quanto o sem pré-reticulação apresentaram uma boa recuperação da viscosidade após aproximadamente 60s. O gel pré-reticulado apresentou 77,28% de recuperação após esse período de tempo acima citado. O que corrobora para uma boa printabilidade, pois o teste simula um escoamento do gel – produzido durante a impressão – e, em seguida, o gel recupera parte significativa da sua viscosidade, o que garante sua manutenção na geometria desejada quando a força de extrusão termina, como demonstrado por Pinto Junior (2023) com diferentes hidrogéis contendo alginato.

Esses resultados indicam que a printabilidade do hidrogel está diretamente relacionada ao seu comportamento reológico. Há uma viscosidade mínima que deve ser observada no gel para que a printabilidade seja boa, assim como demonstrado por Everux *et al* (2025). Além disso, o teste de amplitude simula como uma impressão é feita, em que o gel, quando em repouso não escoar devido seu comportamento do tipo sólido e sua alta taxa de viscosidade, entretanto, no ponto de fluxo, o gel passa e escoar permitindo a construção de *scaffolds*, sendo assim, a reologia do alginato pré-reticulado reforça a capacidade de impressão já demonstrada. O que foi demonstrado por Pinto Junior (2023) com diferentes hidrogéis de alginato/quitosana/celulose nanocristalina, que apresentaram uma capacidade de impressão que corrobora os resultados reológicos.

Embora os testes de capacidade de impressão tenham sido realizados com amostras isentas de óxido de zinco (ZnO), foi preparado um hidrogel contendo a concentração desejada do aditivo, com o objetivo de verificar sua adequada dispersão na matriz polimérica. A distribuição das nanopartículas foi avaliada por inspeção visual com auxílio de microscópio óptico.

Conforme evidenciado na Figura 5, o ZnO apresentou boa dispersão no hidrogel à base de água e alginato, sem formação visível de agregados ou fases separadas, indicando que o método de preparação utilizado favoreceu a solubilização e homogeneização do composto. Essa homogeneidade é essencial para garantir propriedades físico-químicas consistentes em toda a estrutura impressa, além de assegurar a distribuição uniforme do ZnO nas futuras aplicações biológicas do scaffold.



Figura 5. Imagens da microscopia de luz, objetivas de 40, 4 e 10X, respectivamente. (fonte: autoria própria)

CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos demonstraram que o hidrogel de alginato, com concentração 6% em massa, e óxido de zinco, com concentração 30 $\mu\text{g/mL}$, possuem boa capacidade de impressão, produzindo um filamento contínuo e apresentando uma boa nitidez dos poros do *scaffold*. Tal fato também é observado pelos resultados obtidos na caracterização reológica do gel, o qual apresentou comportamento pseudoplástico, como também um comportamento viscoelástico do tipo sólido – o que é imprescindível para não colapsar a impressão, garantindo que o *scaffold* esteja nas condições desejadas de printabilidade. Diante disso, concluiu-se que o hidrogel representa uma boa alternativa para a bioimpressão focada em regeneração óssea, o que é promovido pela ação osteogênica das NPsZnO e o doador de NO – GSNO.

BIBLIOGRAFIA:

BATTAFARANO, G. et al. Strategies for bone regeneration: from graft to tissue engineering *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 3, p. 1128, 2021. ISSN 1422-0067.

PERIĆ KAČAREVIĆ, Ž. et al. An introduction to bone tissue engineering. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 43, n. 2, p. 69-86, 2020. ISSN 0391-3988.

WANG, C. et al. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds. **Bioactive materials**, v. 5, n. 1, p. 82-91, 2020. ISSN 2452-199X.

CHEN, Z.-Y. et al. Antibacterial biomaterials in bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 11, p. 2594-2612, 2021.

LI, B. et al. Application and development of modern 3D printing technology in the field of orthopedics. **BioMed Research International**, v. 2022, 2022. ISSN 2314-6133.

BADHE, R. V. et al. Current advancements in bio-ink technology for cartilage and bone tissue engineering. **Bone**, v. 171, p. 116746, 2023. ISSN 8756-3282.

HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A. C.; TÉLLEZ-JURADO, L.; RODRÍGUEZLORENZO, L. M. Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 229, p. 115514, 2020. ISSN 0144- 8617.

J. WON et al, Guided Bone Regeneration with a Nitric-Oxide Releasing Polymer Inducing Angiogenesis and Osteogenesis in Critical-Sized Bone Defects, *Macromol Biosci* 22, 2022.

EVEREUX, Vesper; SAHA, Sunjeet; BHATTACHARYA, Chandrabali; PARK, Seungman. *Characterization of time-dependent viscoelastic behaviors of alginate-calcium chloride hydrogels for bioprinting applications*. **Biomedical Engineering Letters**, [S.l.], 27 jun. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13534-025-00488-2>.

PINTO JUNIOR, Eronildo Alves, 1990-P658m **Manufatura aditiva baseada em extrusão de hidrogéis do sistema alginato/nanocelulose para aplicações biomédicas** / Eronildo Alves Pinto Junior. – Campinas, SP: [s.n.], 2023.