

Avaliação da modificação de superfície em *scaffolds* de poliácido láctico tratados com hidróxido de sódio na adesão celular para aplicação na engenharia tecidual

Evaluation of surface modification in polylactic acid scaffolds treated with sodium hydroxide on cell adhesion for tissue engineering application

Evaluación de la modificación de la superficie en andamios de ácido poliláctico tratados con hidróxido de sodio sobre la adhesión celular para aplicaciones de ingeniería de tejidos

Recebido: 17/05/2022 | Revisado: 05/06/2022 | Aceito: 06/06/2022 | Publicado: 10/06/2022

Camila Cristina Mora Reina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4487-8451>
Universidade de Araraquara, Brasil
E-mail: camila.mreina@hotmail.com

Benedito Domingos Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7607-2738>
Universidade de Araraquara, Brasil
E-mail: bdneto@uniara.edu.br

Helois Sobreiro Selistre de Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2372-7814>
Universidade Federal de São Carlos, Brasil
E-mail: hsaraujo@ufscar.br

Hernane da Silva Barud

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9081-2413>
Universidade de Araraquara, Brasil
E-mail: hernane.barud@gmail.com

Monica Rosas da Costa Iemma

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1173-2111>
Universidade de Araraquara, Brasil
E-mail: mrciemma@uniara.edu.br

Resumo

As deformidades ósseas, congênitas ou resultantes de traumas, apresentam um desafio para seu reparo por tratar-se de um processo demorado com resultados frequentemente imprevisíveis, com elevada importância econômica. A engenharia de tecidos consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, por meio do desenvolvimento de novos dispositivos capazes de obter interações específicas com os tecidos biológicos, conhecidos como *scaffolds*. O polímero de PLA (poliácido láctico) apresenta-se de forma promissora para o uso como suporte temporário para substituição de tecidos por ser biodegradável, biocompatível e apresentar baixo custo. No entanto, sua característica hidrofóbica 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. Este 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, ensaio de adesão e viabilidade celular pelo método fluorimétrico com o reagente resazurina. As análises de AFM e FTIR confirmaram a modificação da superfície do material pelo tratamento alcalino. 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; Regeneração óssea; Biomateriais; Osteoblastos.

Abstract

Bone deformities, whether congenital or resulting from trauma, present a challenge for their repair because it is a lengthy process with often unpredictable results, with high economic importance. Tissue engineering consists of the regeneration of living organs and tissues, through the development of new devices capable of obtaining specific interactions with biological tissues, known as scaffolds. The PLA (poly lactic acid) polymer is promising for use as a temporary support for tissue replacement because it is biodegradable, biocompatible and has low cost. However, its hydrophobic characteristic is one of the main disadvantages of using this polymer. Therefore, current research aims to modify the surface of these devices in order to make them more hydrophilic. This study aimed to evaluate the surface modification of PLA scaffolds, chemically treated with sodium hydroxide (NaOH) to evaluate cell adhesion and

viability in scaffolds on alkaline treatment with NaOH. The FTIR-ATR (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared) and AFM (Atomic Force Microscopy) techniques were used for physical-chemical characterization of the material, adhesion and cell viability assay by the fluorimetric method with the resazurin reagent. The AFM and FTIR analyzes confirmed the surface modification of the material by the alkaline treatment. By analyzing cell adhesion, it was concluded that the treatment did not influence adhesion, but was more effective in maintaining cell viability.

Keywords: Tissue engineering; Regenerative medicine; Bone regeneration; Biomaterials; Osteoblasts.

Resumen

Las deformidades óseas, ya sean congénitas o resultantes de un traumatismo, presentan un desafío para su reparación debido a que es un proceso prolongado, con resultados muchas veces impredecibles y de alta importancia económica. La ingeniería de tejidos consiste en la regeneración de órganos y tejidos vivos, mediante el desarrollo de nuevos dispositivos capaces de obtener interacciones específicas con tejidos biológicos, conocidos como andamios. El polímero PLA (ácido poliláctico) es prometedor para su uso como soporte temporal para el reemplazo de tejidos porque es biodegradable, biocompatible y de bajo costo. Sin embargo, su característica hidrofóbica es una de las principales desventajas del uso de este polímero. Por lo tanto, la investigación actual tiene como objetivo modificar la superficie de estos dispositivos para hacerlos más hidrofílicos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la modificación de la superficie de andamios de PLA, tratados químicamente con hidróxido de sodio (NaOH) para evaluar la adhesión celular y la viabilidad en andamios en tratamiento alcalino con NaOH. Se utilizaron las técnicas FTIR-ATR (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared) y AFM (Atomic Force Microscopy) para la caracterización físico-química del material, ensayo de adhesión y viabilidad celular por el método fluorimétrico con el reactivo resazurina. Los análisis AFM y FTIR confirmaron la modificación superficial del material por el tratamiento alcalino. Al analizar la adhesión celular, se concluyó que el tratamiento no influyó en la adhesión, pero fue más efectivo en el mantenimiento de la viabilidad celular.

Palabras clave: Ingeniería de tejidos; Medicina regenerativa; Regeneración ósea; Biomateriales; Osteoblastos.

1. Introdução

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 & 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 (Fattini & Dângelo, 2001). Esse tecido é formado por células, que são agrupadas em duas linhas diferentes: (1) células da linha osteoblástica, as quais são responsáveis pelo processo de formação da matriz óssea, e (2) células da linha osteoclástica, as quais são relacionadas com a reabsorção e remodelagem do tecido ósseo. (Aubin et al., 1993; Judas, 2002).

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; Puzipe, 2016). O ciclo de remodelação óssea compreende uma série ordenada de eventos, que segue uma sequência imutável: ativação, reabsorção e formação. Diversos fatores, com ou sem causa aparente, são responsáveis por interferir no processo de remodelação e causar o retardo de consolidação óssea e pseudoartrose (Sahu, 2018). As deformidades ósseas resultantes de traumas (infecções, traumas, neoplasias ou falhas na artroplastia), por exemplo, apresentam um desafio para seu reparo por tratar-se de um processo demorado com resultados frequentemente imprevisíveis (Arealis & Nikolaou, 2015), com elevada importância econômica (Loi et al., 2016). Vários métodos têm sido adotados para superar esses problemas, como enxerto ósseo.

Os defeitos ósseos de tamanho crítico necessitam tratamento adicional que envolve desde implantes a substitutos ósseos de diferentes origens, que têm como função incentivar o crescimento ósseo no sítio lesado por meio de osteogênese, osteocondução e osteoindução (Puzipe, 2016). O enxerto ósseo autógeno é o procedimento de enxerto mais seguro e eficaz para o tratamento de defeitos ósseos, pois: (I) contém células-tronco mesenquimais do paciente que aumentam a osteogênese e (II) fatores de crescimento que aumentam a osteoindução, bem como (III) fornece uma estrutura osteocondutora calcificada

para o crescimento de novo osso (Rodríguez-Merchán, 2022). No entanto, devido às limitações na obtenção de enxertos ósseos autógenos e à morbidade associada à sua obtenção, vários materiais de cicatrização óssea têm sido desenvolvidos nos últimos anos.

O reparo ósseo é um processo de auto cura, entretanto, defeitos ósseos de tamanho crítico precisam de aumento ósseo, onde a engenharia do tecido ósseo desempenha um papel vital (Sivakumar et al., 2022). A produção de novos materiais de suporte para substituir ou reparar defeitos ósseos oferece um grande potencial quando se considera as 2,2 milhões de cirurgias de enxerto ósseo realizadas anualmente em todo o mundo (Leu Alexa et al., 2022). Os estudos na área da engenharia de tecidos e, implicitamente, da medicina regenerativa, concentram-se no desenvolvimento de biomateriais que restauram, mantêm ou melhoraram a função dos tecidos, que podem revolucionar a cirurgia de terapia óssea.

A engenharia de tecidos (ET) consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, por meio do desenvolvimento de novos dispositivos capazes de obter interações específicas com os tecidos biológicos, conhecidos como *scaffolds* (Santos et al., 2013). Os *scaffolds* projetados para utilização em reparo ou substituição tecidual devem ter sua estrutura tridimensional (3D) e porosa que forneça um ambiente adequado para as funções celulares, proporcionando suporte para proliferação celular e regeneração de tecidos (Albuquerque, 2015). Para que o *scaffold* seja viável e funcional, é necessário que seja biodegradável e não tóxico, além de ter propriedades mecânicas, físicas e biológicas mais próximas possíveis das características nativas do tecido lesionado. No local onde foram implantados, os *scaffolds* devem apresentar tempo de degradação compatível com o tempo de reparo do tecido para que, com o passar do tempo, o local retorne a seu perfeito estado (Lopes et al., 2012) .

Diversos materiais têm sido utilizados na fabricação desses suportes, incluindo metais, cerâmicas, polímeros naturais ou sintéticos e hidrogéis (Agrawal & Sinha, 2017; Gilbert Triplett & Budinskaya, 2017). A utilização de suportes porosos tridimensionais é essencial dentro da engenharia de tecidos. Nesses suportes são cultivados fatores de crescimento e células para a formação de tecidos (Martin et al., 2004). Dentre os polímeros sintéticos, encontram-se os poli (α - hidróxi ácidos) (Barbanti et al., 2005), destacando-se o poliláctico (PLA) (Rocha et al., 2012). Os *scaffolds* carregados com fatores de crescimento tem se mostrado como uma alternativa eficaz para estimular formação óssea, com isso, ET apresenta-se como opção de tratamento para os reparos ósseo. A utilização destes suportes promove a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblasticas ou células progenitoras pluripotentes em células ósseas (Agrawal & Sinha, 2017; Arealis & Nikolaou, 2015).

As tecnologias de impressão 3D têm contribuído de forma consistente para os avanços das abordagens da medicina regenerativa óssea, no transcorrer dos últimos anos. Dentro das estratégias de medicina regenerativa, uma das vantagens da impressão 3D é poder produzir objetos com formas customizadas às necessidades específicas de cada lesão, sejam eles implantes ortopédicos (dispositivos de osteossíntese) ou os próprios *scaffolds* (Chia & Wu, 2015). A tecnologia de impressão 3D vem contribuindo com novas possibilidades de pesquisas para alternativas de implantes e reparações teciduais, permitindo a impressão de um modelo 3D que mimetize uma estrutura biológica.

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., 2012). O polímero de PLA apresenta-se de forma promissora para o uso como suporte temporário para substituição de tecidos por ser biodegradável e biocompatível sendo degradado por hidrólise simples e metabolizado pelo corpo humano (Lopes et al., 2012). O baixo custo do PLA é outra característica vantajosa para o uso desse polímero o qual apresenta ótimos resultados na impressão 3D (Lasprilla et al., 2012). No entanto, há uma questão a ser estudada sobre o PLA que é a sua característica hidrofóbica, 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.

Em um trabalho anterior (Reina, 2019) 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 melhorar a adesão celular pelo ensaio da resazurina, embora não houvesse a comprovação da modificação pela técnica do FTIR-ATR (Infravermelho com Transformada de Fourier de Reflectância Total Atenuada). Outras técnicas são utilizadas para modificação de superfície de PLA, por exemplo: (1) modificação por quitosana/polifosfato de sódio, (2) modificação por escrita direta a laser (DLW), (3) por plasma atmosférico frio (CAP), e (4) por hidróxido de sódio (NaOH) (Wang et al., 2016). De acordo com Mohd Sabee et al. (2016) e Pinto; Maia; Thiré (2019), o tratamento dos *scaffolds* com NaOH tem como consequência torná-lo mais hidrofílico melhorando assim sua biocompatibilidade, além de também aumentar o número de sítios ativos para ligação celular.

Considerando o problema de hidrofobicidade do *scaffold* de PLA puro, que não o torna atraente para a migração celular e posterior aplicação na ET, o presente trabalho tem como objetivo modificar a superfície de PLA com o tratamento com NaOH em diferentes concentrações a fim de avaliar suas modificações superficiais e a eficácia de adesão celular nas diferentes concentrações do tratamento químico.

2. Metodologia

Obtenção dos *scaffolds* de PLA

O filamento utilizado para a impressão dos *scaffolds* foi o filamento transparente, da marca 3D Fila de diâmetro 1,75mm. O filamento de PLA foi utilizado para impressão dos *scaffolds* 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 1) 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.

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 do *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 à temperatura ambiente (Figura 2). Após uma hora do tratamento, os *scaffolds* foram lavados com água destilada e secos em estufa à 40°C durante 2 horas, até que estivessem totalmente secos.

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 a radiação ultravioleta (UV) durante 1 hora para cada lado do disco.

Infravermelho com transformada de Fourier de reflectância 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.. 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.

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 umidificada à 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 2x10⁵ células por poço, incluindo poço sem PLA para o grupo controle de adesão. A placa foi mantida em estufa humidificada à 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.

3. Resultados e Discussão

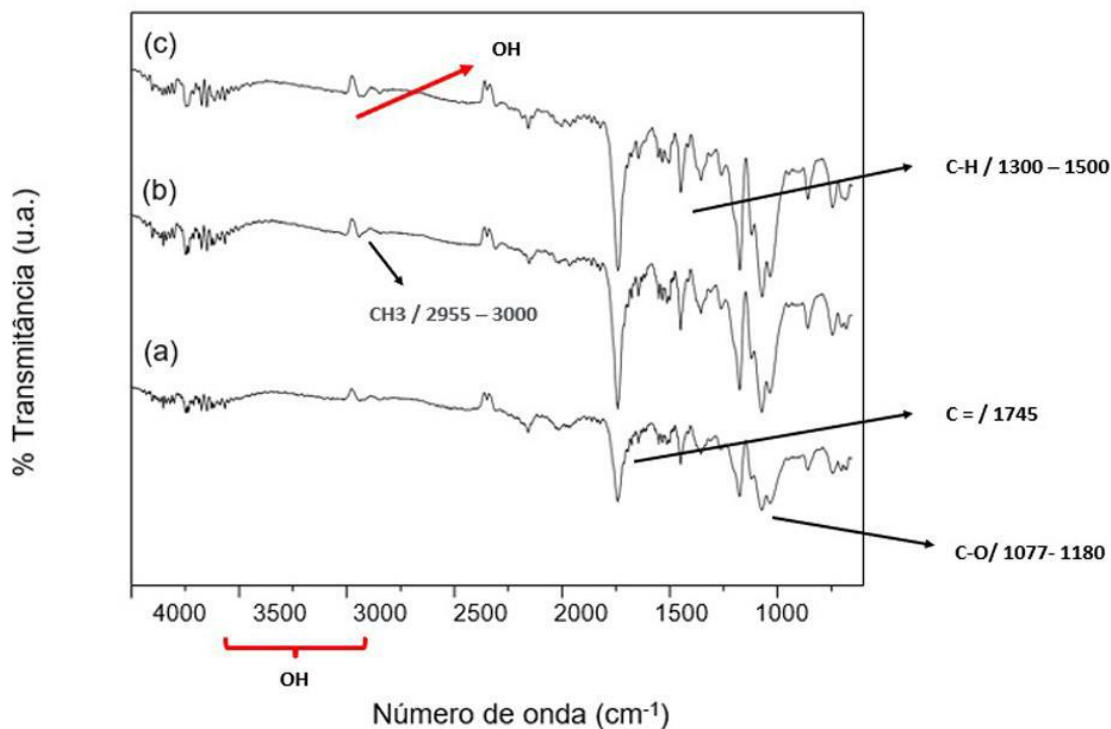
FTIR – ATR

Os espectros obtidos para as amostras de PLA estão representados na Figura 01. 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) (Chapple et al., 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.

Figura 1 - Análise por FTIR para os scaffolds tratados com NaOH.



Fonte: Elaboração própria.

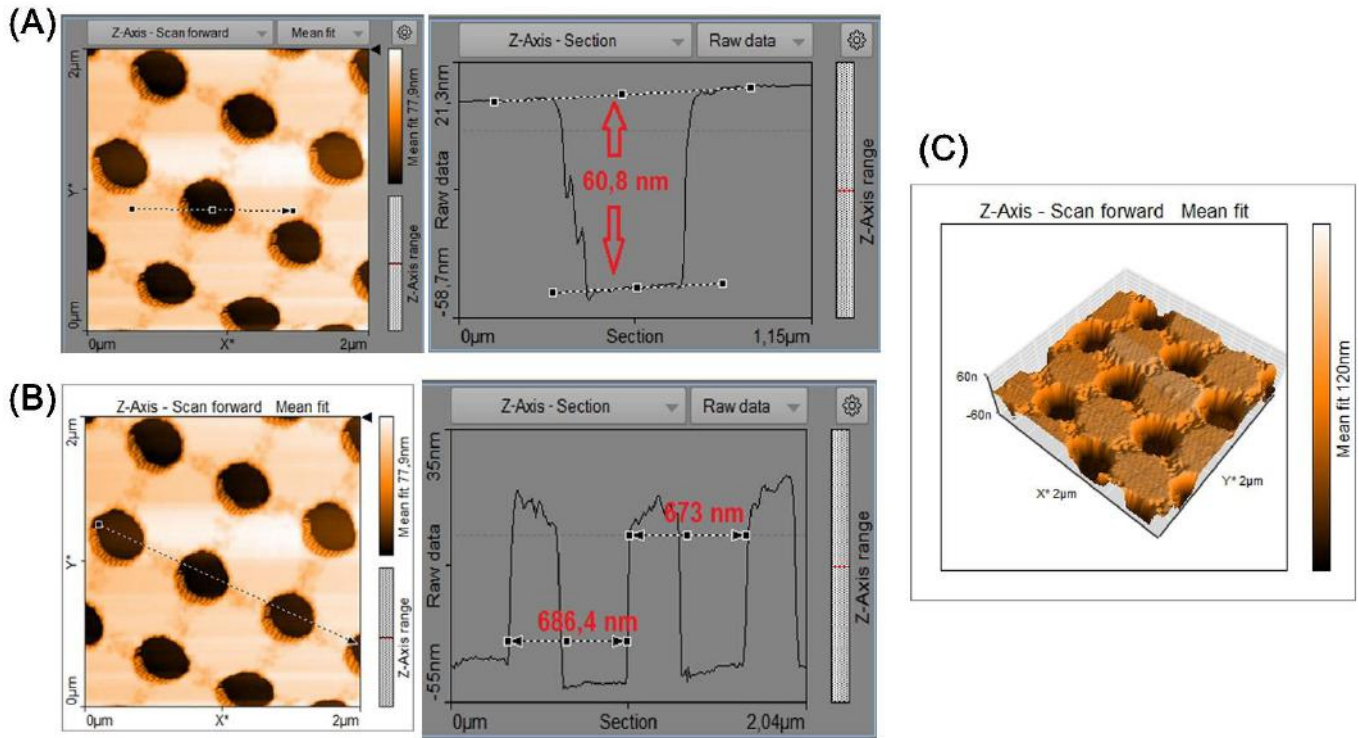
A Figura 1 representa que as mudanças químicas-estruturais ocorreram no comprimento de onda de 3300 a 3610 cm^{-1} . No gráfico obtido (a) representa o grupo controle (PLA sem tratamento) (b) representa PLA tratado com 0,25M NaOH, e (c) representa PLA tratado com 1M NaOH. O aparecimento de grupos -OH 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 (Mohd 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, pôde-se observar que a hidrólise alcalina dos scaffolds com NaOH modificou com sucesso a superfície do polímero de PLA, alterando sua característica de superfície hidrofóbica para uma superfície mais hidrofílica.

Microscopia de força atômica (AFM)

A análise superficial topográfica do scaffold realizada pela técnica de AFM é representada a seguir pela Figura 02.

Figura 2 - Calibração da topografia do scaffold.

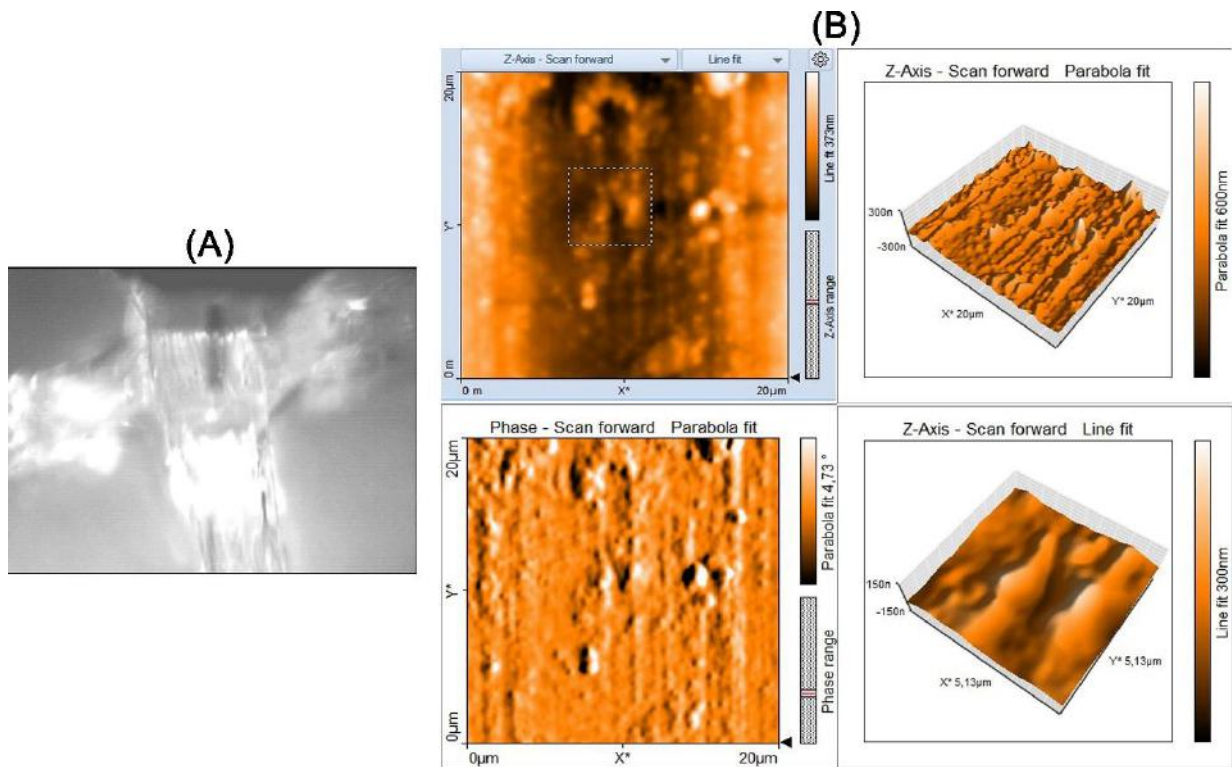


Fonte: Elaboração própria.

Na Figura 2, as imagens A e B são referentes a calibração da topografia do scaffold, enquanto a imagem C ilustra a topografia do scaffold.

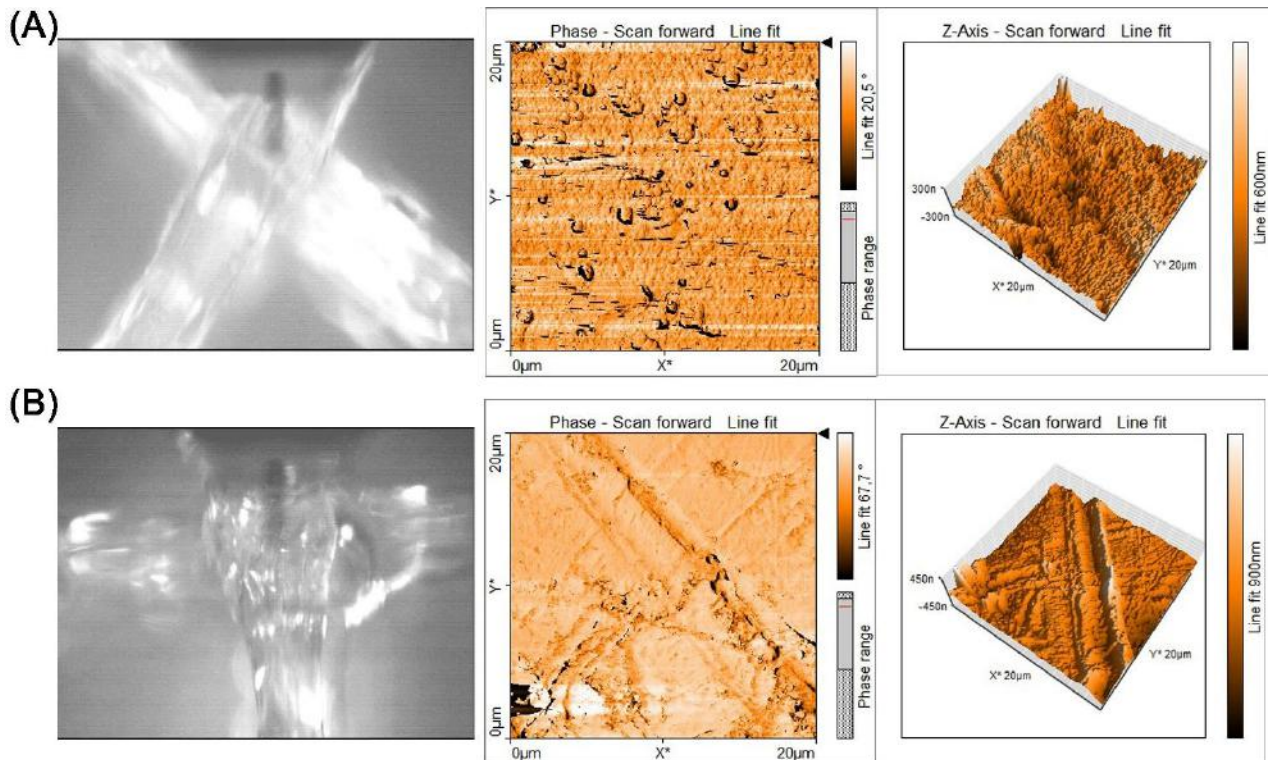
Com as figuras abaixo (Figuras 03 e 04) foi possível obter uma análise qualitativa com a comparação das mudanças visuais nas duas condições testadas (PLA puro e PLA tratado) na mesma região de zoom. Pelas imagens das amostras, é possível observar uma mudança aparente na rugosidade superficial do polímero tratado, sugerindo que o scaffold quando submetido ao tratamento com NaOH, sofreu 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.

Figura 3 - Zoom de 20 para 5 μm no PLA puro (sem tratamento).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Imagens obtidas de diferentes regiões por AFM do PLA tratado com 0,25M de NaOH.



Fonte: Elaboração própria.

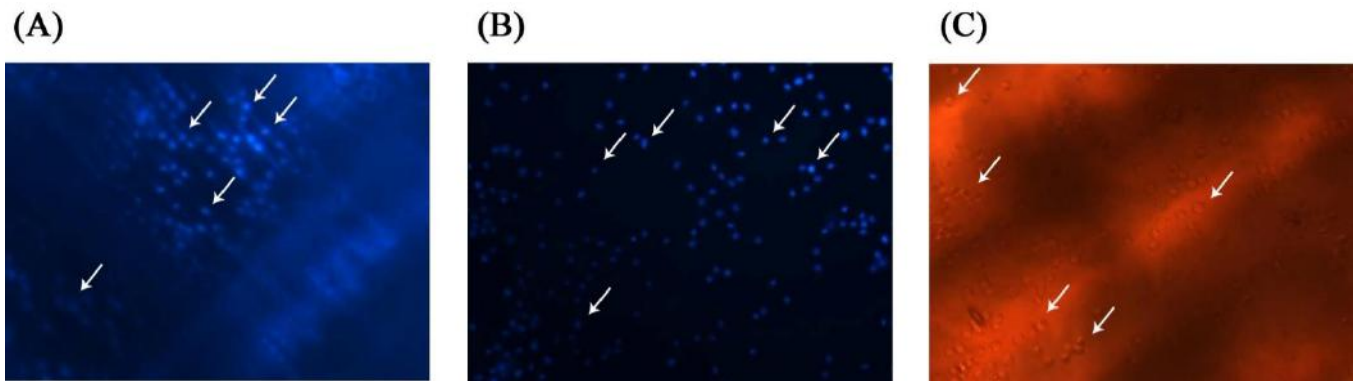
Visualmente nas figuras 3 e 4, observa-se pequenas nuances em questão à rugosidade. Onde na Figura 3 representando o PLA sem tratamento, apresenta uma rugosidade bruta e irregular e presença de desníveis no sentido da altura.

Na Figura 4, representando PLA tratado, pode-se observar novas características quando em comparação com a Figura 3. Em ambas as imagens as rugosidades brutas são transformadas em microrugosidades, demonstrando também que a superfície tem aumento de irregularidades, pequenas e dispersas.

Ensaio de viabilidade e adesão celular

A Figura 5 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 (pequenas esferas sinalizadas por setas) aderiram ao suporte, comprovando que o mesmo possui propriedade aderente e que a modificação química não afetou a propriedade atóxica do polímero.

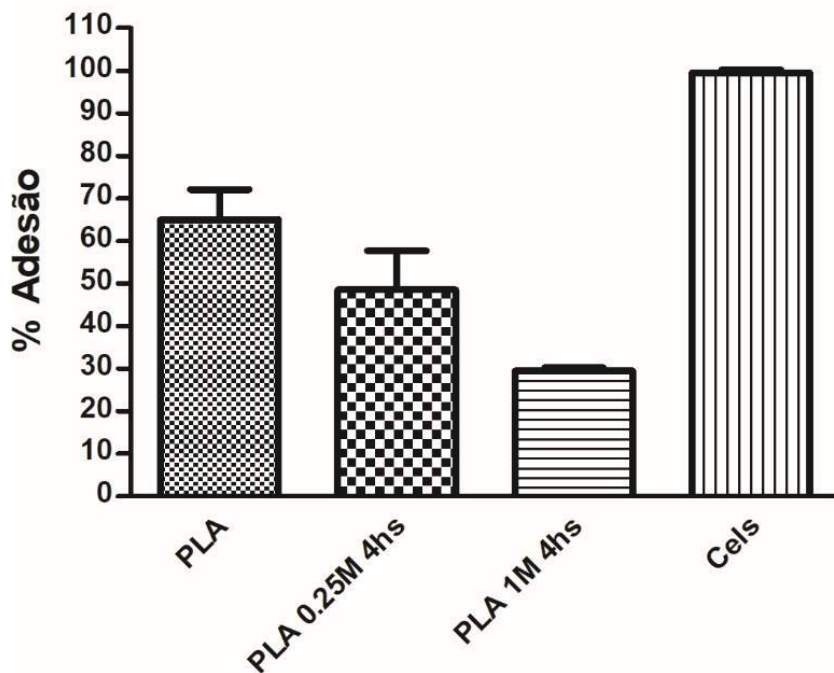
Figura 5 – (A) Células aderidas no scaffold PLA tratado com NaOH coradas com DAPI aumento 4 vezes; (B) Mesmo campo das células aderidas fotografadas em campo claro; (C) Células do grupo controle aderidas ao plástico coradas com DAPI.



Fonte: Elaboração própria.

A Figura 6, 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.

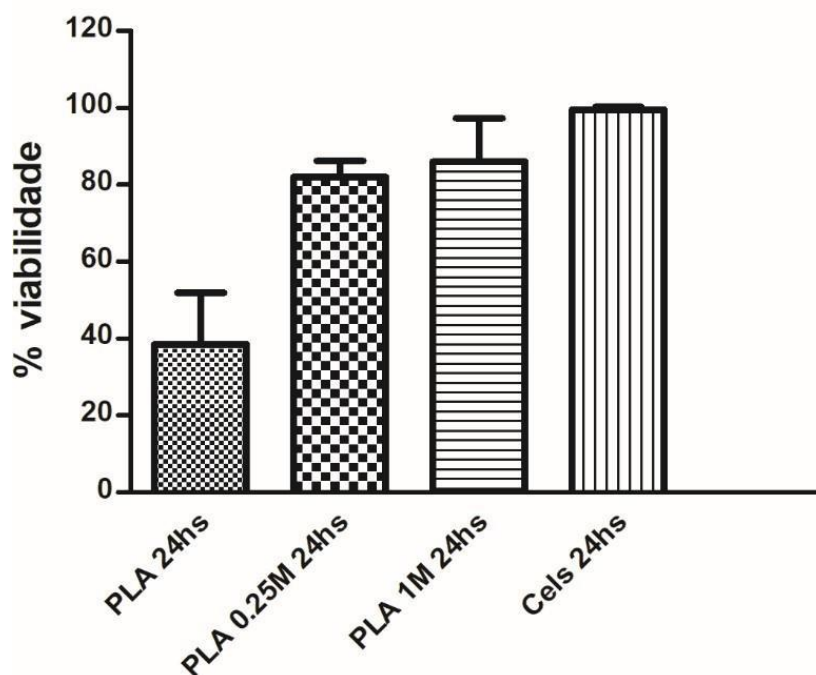
Figura 6 - Ensaio de adesão celular de Osteo-1 cultivadas na presença de scaffolds de PLA tratados e não tratados pelo método de redução da resazurina.



Fonte: Elaboração própria.

A Figura 7 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.

Figura 7 - Ensaio de Viabilidade celular de Osteo-1 cultivadas na presença de scaffolds dePLA tratados e não tratados pelo método de redução da resazurina.



Fonte: Elaboração própria.

Observou-se que as viabilidades celulares em ambas condições de tratamentos 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 Mohd Sabee et al. (2016).

4. Considerações Finais

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.

Referências

- Agrawal, V., & Sinha, M. (2017). A review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 105(4), 904–925. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33599>
- Albuquerque, M. T. P. (2015). Efeito de scaffolds de nanofibras incorporados com antibióticos sobre biofilmes formados por bactérias presentes nos canais radiculares [Universidade Estadual Paulista]. <http://acervodigital.unesp.br/handle/11449/132929>
- Arealis, G., & Nikolaou, V. S. (2015). Bone printing: New frontiers in the treatment of bone defects. *Injury*, 46 Suppl 8, S20-22. [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(15\)30050-4](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(15)30050-4)
- Aubin, J. E., Turksen, K., & Heersche, J. N. M. (1993). 1—OSTEOBLASTIC CELL LINEAGE. Em M. Noda (Org.), *Cellular and Molecular Biology of Bone* (p. 1–45). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092500-4.50005-X>

- Barbanti, S. H., Zavaglia, C. A. C., & Duek, E. A. R. (2005). *Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos*. *Polímeros*, 15, 13–21. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282005000100006>
- Chapple, S., Anandjiwala, R., & Ray, S. S. (2013). Mechanical, thermal, and fire properties of polylactide/starch blend/clay composites. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 113(2), 703–712. <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2776-6>
- Chia, H. N., & Wu, B. M. (2015). Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of Biological Engineering*, 9(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0001-4>
- Fattini, C. A., & Dângelo, J. G. (2001). *Anatomia humana básica* (2a ed.). Editora Atheneu.
- Gilbert Triplett, R., & Budinskaya, O. (2017). New Frontiers in Biomaterials. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 29(1), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2016.08.011>
- Judas, F. J. M. (2002). *Contribuição para o estudo de enxertos ósseos granulados alógenos e de biomateriais*. Universidade. Faculdade de Medicina.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2013). *Histologia Básica: Texto e Atlas* (12a ed.). Editora Guanabara Koogan.
- Lasprilla, A. J. R., Martinez, G. A. R., Lunelli, B. H., Jardini, A. L., & Filho, R. M. (2012). Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review. *Biotechnology Advances*, 30(1), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.019>
- Leu Alexa, R., Cucuruz, A., Ghițulică, C.-D., Voicu, G., Stamat (Balahura), L.-R., Dinescu, S., Vlasceanu, G. M., Stavarache, C., Ianchis, R., Iovu, H., & Costache, M. (2022). 3D Printable Composite Biomaterials Based on GelMA and Hydroxyapatite Powders Doped with Cerium Ions for Bone Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1841. <https://doi.org/10.3390/ijms23031841>
- Loi, F., Córdova, L. A., Pajarinen, J., Lin, T., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 86, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.02.020>
- Lopes, M. S., Jardini, A. L., & Filho, R. M. (2012). Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. *Procedia Engineering*, 42, 1402–1413. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.534>
- Martin, I., Wendt, D., & Heberer, M. (2004). The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 22(2), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001>
- Mohd Sabee, M. M. S., Kamalaldin, N., Yahaya, B., & Hamid, Z. (2016). Characterization and In Vitro Study of Surface Modified PLA Microspheres Treated with NaOH. *Journal of Polymer Materials*, 33, 191–200
- Pinto, M., Maia, M. D. C., & Thiré, R. M. S. M. (2019). Estudo da biocompatibilidade in vivo de arcabouço de poli (ácido láctico) (PLA) fabricados por impressão 3D para aplicação em engenharia tecidual. *A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde* 5. <https://doi.org/10.22533/AT.ED.02619030414>
- Puzipe, K. T. P. (2016). Reparação óssea com o uso do beta fosfato tricálcico (B-tcp)® na calota craniana de ratos submetidos ao alcoolismo experimental: Análises histomorfológica e histomorfométrica [Text, Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.25.2016.tde-04082016-221543>
- Reina, C. C. M. (2019). Funcionalização de scaffolds de PLA impresso em estrutura 3D para aplicação em engenharia de tecidos. XIV Congresso de Iniciação Científica Universidade de Araraquara – UNIARA, 1–358. <https://www.uniara.com.br/arquivos/file/cic/publicacoes/anais/2019-anais-XIV-congresso-iniciacao-cientifica.pdf>
- Rocha, A. M., Quintella, C. M., & Torres, E. (2012). Prospecção de artigos e patentes sobre polímeros biocompatíveis aplicados à Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa. *Cadernos de Prospecção*, 5, 72–85. <https://doi.org/10.9771/CP.V5I2.11463>
- Rodríguez-Merchán, E. C. (2022). Bone Healing Materials in the Treatment of Recalcitrant Nonunions and Bone Defects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3352. <https://doi.org/10.3390/ijms23063352>
- Sahu, R. L. (2018). Percutaneous autogenous bone marrow injection for delayed union or non-union of long bone fractures after internal fixation. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 53, 668–673. <https://doi.org/10.1016/j.rboe.2017.09.004>
- Santos, G. G. dos, Marinho, S. M. O. C., & Miguel, F. B. (2013). Polímeros como Biomateriais para o Tecido Cartilaginoso. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 12(3), 367–373. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v12i3.8239>
- Sivakumar, P. M., Yetisgin, A. A., Sahin, S. B., Demir, E., & Cetinel, S. (2022). Bone tissue engineering: Anionic polysaccharides as promising scaffolds. *Carbohydr Polym*, 119142–119142
- Wang, M., Favi, P., Cheng, X., Golshan, N. H., Ziemer, K. S., Keidar, M., & Webster, T. J. (2016). Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 46, 256–265. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.030>