

Estudo da reologia de hidrogéis compósitos de PEG-Laponita-alginato visando impressão 3D baseada em extrusão

Rheological study of PEG-Laponite-alginate composite hydrogels aiming 3D extrusion-based printing

Karina Feliciano Santos^{1,2}, José Luis Dávila², Marcos Akira d'Ávila³,
Andrea Cecília Dorion Rodas¹, Jorge Vicente Lopes da Silva²,
Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano^{1,2}

¹ Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas – UFABC, Alameda da Universidade, s/n, Anchieta, CEP: 09606-045 São Bernardo do Campo, SP, Brasil

² Núcleo de Tecnologias Tridimensionais - CTI - Dom Pedro I, Km 143,6, Amaraís, CEP: 13069-901, Campinas, SP, Brasil

³ Departamento de Engenharia de Manufatura e Materiais, Faculdade de Engenharia Mecânica – FEM/UNICAMP – Rua Mendeleev 200, Cidade Universitária, CEP: 13083-860, Campinas, SP, Brasil

e-mail: karina.feliciano@ufabc.edu.br, andrea.rodas@ufabc.edu.br, juliana.daguano@ufabc.edu.br, karina.santos@cti.gov.br, jose.davila@cti.gov.br, jorge.silva@cti.gov.br, madavila@fem.unicamp.br

RESUMO

Os hidrogéis, redes poliméricas reticuladas capazes de absorver e reter uma grande quantidade de água devido à sua natureza hidrofílica, chamam a atenção para aplicações na Engenharia Tecidual. Ainda, esses materiais oferecem o potencial de projetar arcabouços partindo do seu comportamento pseudoplástico, o que é fundamental para impressão tridimensional (3D) baseada em extrusão. A adição de Laponita, um nanosilicato bidimensional em forma de disco, permite modificar o comportamento reológico de alguns géis, criando uma condição otimizada. Neste estudo, foi realizada a caracterização reológica do hidrogel compósito PEG-Laponita-alginato (PL-Alg) e de seu gel precursor PEG-Laponita (PL), visando futuramente a bioimpressão 3D. Inicialmente, foi avaliado o comportamento reológico de diferentes concentrações de Laponita no compósito PL. Verificou-se que a viscosidade da solução de PEG aumentou drasticamente como uma função da adição de Laponita, de modo que se observou um comportamento reológico não-Newtoniano fortemente pseudoplástico. O efeito dos diferentes teores de Laponita também pode ser notado para o compósito (PL-Alg), mantendo-se fixa a concentração de PEG e alginato, sendo este último adicionado com o intuito de ser um segundo precursor de rede para reticular o hidrogel de PEG-Laponita. Ainda, todos os compósitos apresentaram uma recuperação parcial da viscosidade em função do tempo, após a aplicação de cisalhamento, parâmetro a ser considerado no desenvolvimento de biotintas. Os arcabouços de PL-Alg foram impressos contendo até 10 camadas e colocados em uma solução de CaCl_2 para a reticulação das cadeias do alginato. Posteriormente, testes *in vitro* foram realizados, mostrando que a dissolução da rede do hidrogel compósito foi mais crítica para a amostra com 5% de Laponita. Em conclusão, para trabalhos futuros deverá ser considerada a maneira mais apropriada de reticulação da cadeia de PEG, para melhorar as propriedades mecânicas e a resistência à degradação, viabilizando a utilização do sistema PEG-Laponita-alginato para aplicações em bioimpressão 3D.

Palavras-chave: Compósito, nanosilicato Laponita, alginato, impressão 3D, reologia.

ABSTRACT

Hydrogels, crosslinked polymeric networks capable of absorbing and retaining a large number of water due to their hydrophilic nature, draws attention to Tissue Engineering applications. These materials offer the potential to design scaffolds based on their pseudoplastic behavior, which is essential for extrusion-based three-dimensional (3D) printing. The addition of Laponite, a two-dimensional disk-shaped nanosilicate, allows modifying the rheological behavior of some

gels, creating an optimized condition for 3D printing. In this study, the rheological characterization of the composite hydrogel PEG-Laponite-Alginate (PL-Alg) and its precursor gel PEG-Laponite (PL) was carried out, aiming in the future for 3D bioprinting of constructs. Initially, the rheological behavior of different concentrations of Laponite in the PL composite was evaluated. The viscosity of the PEG-400 increased dramatically as a function of the addition of Laponite, characterizing a strong shear-thinning and solid-like rheological behavior, ideal for 3D printing. The effect of different levels of Laponite can also be noted for the composite (PL-Alg), keeping the concentration of PEG400 and alginate fixed, the latter being added as a second network precursor to crosslink the PEG-Laponite hydrogel. Besides, all composites showed a partial recovery of viscosity as a function of time after the application of shear. This rheological parameter must be considered in the development of a bioink. PL-Alg scaffolds containing Laponite were printed containing up to 10 layers and placed in a CaCl_2 solution to promote crosslinking of the alginate chains. Subsequently, *in vitro* tests were performed in phosphate-buffered saline solution, showing that the dissolution of the composite hydrogel network was more critical for the sample with 5% Laponite. In conclusion, for future work, the most appropriate way of crosslinking the PEG chain should be considered to improve the mechanical properties and the resistance to degradation, enabling the use of the PEG-Laponite-Alginate system as a bioink for 3D bioprinting applications.

Keywords: Composite, Laponite nanosilicate, alginate, 3D printing, rheology.

1. INTRODUÇÃO

A bioimpressão baseada em extrusão é a abordagem mais popular para criar construtos impressos em 3D carregados de células, ou do inglês *cell-laden* [1]. Para tanto, as biotintas são colocadas em seringas descartáveis de plástico para uso médico e depois dispensadas pneumaticamente ou mecanicamente (pistão ou parafuso rotativo) sobre substratos estéreis. A configuração de deposição acionada por pistão fornece um melhor controle do escoamento da biotinta, enquanto sistemas acionados por parafuso permitem um bom controle da trajetória da deposição e são valiosos para o depósito de biotintas altamente viscosas. Assim, o desenvolvimento e formulações de biotintas com características reológicas adequadas para a bioimpressão é fundamental e tem sido um grande desafio [2, 3]

A viscosidade da biotinta é de extrema importância para produzir construtos funcionais, sendo que o biomaterial imprimível ideal deve ter viscosidade suficiente para permitir a extrusão controlada nos bicos e a rápida cura pós-impressão, por meio de propriedades de gelificação ou viscoelasticidade [4]. Ao procurar materiais com pseudoplasticidade e que mimetizem os tecidos nativos, favorecendo o crescimento e a proliferação celular, os hidrogéis têm sido extremamente explorados [2]. Os hidrogéis podem ser definidos como materiais poliméricos que apresentam cadeias tridimensionais, reticulados por ligações covalentes ou mantidos por interações físicas intramoleculares e intermoleculares [5]. Sendo altamente hidrofílicos, apresentam alta capacidade de absorverem grandes quantidades de água ou fluidos biológicos, intumescendo e mantendo suas cadeias [5-7].

Dentre os hidrogéis utilizados para a bioimpressão, o uso do poli(etilenoglicol) (PEG) tem atraído atenção por suas diversas propriedades, principalmente por ser biocompatível, de degradação controlável, imunogênico, por apresentar capacidade adsorvente e ser altamente hidrofílico [7]. Entretanto, apresenta como desvantagem a sua natureza bioinerte, não oferecendo ambiente ideal para adesão celular [8, 9]. Consequentemente, sendo necessário combinar suas propriedades com materiais bioativos para formação de um novo tecido [10].

O PEG pode ser encontrado comercialmente como mistura de diferentes oligômeros e com uma ampla massa molar [11-13]. Como o PEG por si só não forma hidrogéis é necessário fazer modificações químicas para formar estruturas tridimensionais e reticuláveis [14]. Porém, por apresentar uma estrutura linear ramificada, geralmente para que a reticulação ocorra, pode ser incorporado em suas cadeias grupos funcionais como acrilato, metiloxil, tiol, sulfona, conciliando esse método com outros de reticulação [15-17]. Os hidrogéis à base de PEG podem ter suas cadeias reticuladas basicamente por dois processos, físicos ou químicos. Dependendo do método de reticulação escolhido, isso pode interferir na estrutura e estabilidade do hidrogel formado. Existem diversas formas de reticulação física (iônica, por ligações de hidrogênio, por interações eletroestáticas), a qual é a mais apropriada para a área biomédica, devido à baixa/ausência do reticulador químico, apresentando baixa citotoxicidade. Entretanto, uma das desvantagens desse método é a natureza mais fraca das interações, consequentemente, quando na presença de tensão mecânica, os hidrogéis podem reverter para fase líquida, não mantendo sua estrutura [12, 15, 16]. Em contrapartida, hidrogéis reticulados quimicamente apresentam em sua maioria ligações do tipo covalente e permanente, exibindo boa resistência mecânica e à degradação, quando comparados aos hidrogéis reticulados por meios físicos. De forma similar, a reticulação química pode ser promovida por algumas técnicas, sendo as mais comuns o uso de luz UV e a polimerização por radicais livres, dentre outras. Entretanto, esses métodos podem ser potencialmente tóxicos às células, necessitando de lavagens para remover o resíduo do reticulado, além de apresentar maior custo de

obtenção [18, 19].

Recentemente, diversos estudos mostraram que o alginato é um dos biomateriais amplamente explorados, em vários campos da engenharia tecidual, devido a sua capacidade de formação de arcabouços [20-22]. O alginato pode ser facilmente fabricado como estrutura tridimensional ao usar um sistema de reticulação com íons bivalentes, como os íons de cálcio, o que facilita consideravelmente o processo de bioimpressão [23, 24]. Ainda, como vantagem a aplicações biomédicas, hidrogéis de alginato possibilitam boa adesão celular. Além disso, no campo da bioimpressão, o alginato tem sido aplicado em conjunto com outros materiais que apresentam dificuldade em formar géis de alta viscosidade, conferindo propriedades desejáveis para a impressão 3D, como a estruturação do arcabouço após o processo [25, 26].

Outro material que tem despertado grande interesse como modificador reológico de tintas e biotintas é a Laponita [10, 27]. Os discos da Laponita XLG apresentam cargas positivas nas bordas, enquanto as suas faces apresentam cargas negativas. Esse princípio pode ocorrer dependendo do pH do meio, e segundo a literatura, ocorrem preferencialmente em pH básico [28, 29]. A Laponita tem a capacidade de interagir eletrostaticamente com pequenas moléculas e polímeros, que quando na presença de tensão de cisalhamento, pode resultar na alteração da viscosidade, devido à formação de estruturas do tipo “castelo de cartas”, sendo bastante atrativo para a impressão 3D [18, 28]. CIDONIO *et al.* [27] avaliaram a influência da Laponita no metacrilato de gelatina (GelMa), desenvolvendo uma biotinta aplicada tanto a tecidos duros como moles. O hidrogel de GelMa apresenta baixa viscosidade, dificultando a formação de filamentos para extrusão com fidelidade de forma. Com adição do modificador, há um aumento na viscosidade da biotinta, que por sua vez resultou melhorias no controle de qualidade do filamento extrudado, originando estruturas com fidelidade aprimorada e porosidade interconectada [29].

Assim, a Laponita tem sido amplamente requisitada pela indústria farmacêutica e de cosméticos, sendo crescente sua utilização em aplicações biomédicas, tal como a nanomedicina, por promover o comportamento pseudoplástico e tixotrópico em produtos à base de água [30, 31]. Entretanto, é conhecido que essa propriedade é uma função de sua concentração [13]. Por sua vez, o poli(etilenoglicol) (PEG) é um dos polímeros sintéticos biocompatíveis mais utilizados em medicina e biomedicina, inclusive aprovado pelo FDA dos EUA, sendo bastante versátil em suas aplicações [17]. Mediante os favoráveis atributos, alguns autores vêm buscando o desenvolvimento de biotintas à base de PEG-Laponita para impressão 3D por extrusão [32, 33]. Entretanto, poucos estudos se direcionam a entender a viabilidade de sistemas mais simples, como o proposto nesse trabalho.

Portanto, esse trabalho busca compreender o comportamento reológico de uma simples formulação de biotinta, visando posterior aplicação na bioimpressão 3D por extrusão de construtos para Engenharia Tecidual. O sistema escolhido tem como precursor de rede PEG-400 e diferentes teores de Laponita, e apropria-se do alginato como reticulador da rede, na presença de íons de cálcio. Dessa forma, o objetivo principal foi caracterizar o comportamento reológico do compósito PEG-Laponita-alginato com diferentes concentrações de Laponita (5, 7,5 e 10% m/m), mantendo as concentrações fixas de PEG e alginato, a fim de avaliar a imprimibilidade pela técnica escolhida. Hidrogéis de PEG-Laponita foram testados como controle. Também foram realizados testes sobre a capacidade de intumescimento e degradação *in vitro* dos arcabouços impressos em meio fisiológico simulado para compreender sua viabilidade como biotinta.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente, foi preparada uma formulação tendo como principal precursor de rede um compósito de PEG-Laponita, onde buscou-se avaliar o efeito reológico da Laponita sobre o hidrogel de PEG. Sequencialmente, uma segunda formulação foi estabelecida, sendo utilizado o alginato como precursor de rede para reticular o hidrogel de PEG-Laponita, com posterior imersão em solução de cloreto de cálcio. Para avaliação dos arcabouços impressos, a composição de PEG-Laponita e alginato teve o comportamento reológico, a degradação *in vitro* e a capacidade de intumescimento analisados.

2.1 Materiais utilizados

Os materiais utilizados para a síntese dos compósitos foram o poli(etilenoglicol) (PEG-400) de MM entre 380.000-420.000 g.mol⁻¹ (Sinergia, Brasil). A Laponita XLG foi doada pela empresa Colormix, Brasil. O alginato de sódio de alga marrom, massa molar entre 80.000 a 120.000 g.mol⁻¹, com proporção de M/G igual a 1,56 foi adquirido da Sigma-Aldrich Corp., EUA. Todos os reagentes utilizados no preparo da solução de reticulação (cloreto de cálcio) e na solução tamponada de fosfato – PBS (cloreto de potássio, cloreto de sódio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico anidro) foram da Sigma-Aldrich Corp., EUA.

2.2 Caracterização dos Compósitos

Inicialmente, foi estabelecida uma concentração fixa de PEG apenas variando a concentração de Laponita. Para o preparo do hidrogel compósito foi utilizada uma solução de PEG-400 (80% v/v) e diferentes adições do nanosilicato Laponita (5, 7,5 e 10% em massa). Como ambos os precursores são solúveis em água, foi escolhida a água deionizada como solvente para a dissolução. Para o hidrogel de PEG-Laponita, foram dispersas as partículas do nanosilicato em água deionizada, sob agitação constante por 10 minutos e sonicação por mais 20 minutos, para melhor controle da homogeneidade. Em seguida, a solução de PEG (80% v/v) foi adicionada à dispersão lentamente, agitando por mais 20 minutos. O gel resultante foi centrifugado a 200 rpm por 20 minutos em centrífuga para retirada de bolhas. Após preparo, o mesmo foi armazenado sob refrigeração (aproximadamente 8 °C) por período de 24 horas, antes da realização da caracterização reológica.

Seguindo o mesmo protocolo, partindo-se do hidrogel anterior PEG-Laponita, foi adicionado um teor de 2,5% em massa de alginato para obtenção dos arcabouços compósitos de PEG-Laponita-alginato. Na Tabela 1 é possível identificar as concentrações utilizadas na preparação dos compósitos.

Tabela 1: Componentes utilizados na preparação das amostras.

PROPORÇÃO DOS COMPONENTES UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DAS AMOSTRAS (%)						
PL			PL-Alg			
Amostras	Solução de PEG	Laponita	Amostras	Solução de PEG	Laponita	Alginato
P5L	95,0	5,0	P5L-Alg	92,5	5,0	2,5
P7,5L	92,5	7,5	P7,5L-Alg	90,0	7,5	
P10L	90,0	10,0	P10L-Alg	87,5	10,0	

2.3 Caracterização das amostras

2.4 Caracterização reológica

Todas as composições foram caracterizadas no reômetro a fim de obter informações sobre sua imprimibilidade, utilizando um equipamento compacto modular Anton Paar MCR-102. Os testes foram conduzidos a 25 °C, com um dispositivo para evitar a evaporação do solvente, usando uma geometria placa-placa com 50 mm de diâmetro em um espaço de 1 mm. Para determinação de viscosidade, foram realizadas medidas na faixa de taxa de cisalhamento de 1 a 1000 s⁻¹. Enquanto os testes de varredura de amplitude foram realizados a uma frequência angular constante de 10 rad. s⁻¹, com a deformação por cisalhamento variando de 0,01 a 100%. A partir disso, a faixa de viscoelasticidade linear (LVE) foi obtida, e então uma deformação constante de $\gamma_0 = 1\%$ foi usada para realizar os testes de varredura de frequência. Estes últimos foram realizados em uma faixa de frequência angular de 0,1 a 240 rad.s⁻¹. Os testes de recuperação da viscosidade foram realizados em três intervalos: (i) repouso – 1 s⁻¹, (ii) aplicação de cisalhamento – 100 s⁻¹ e (iii) repouso – 1 s⁻¹. O comportamento pseudoplástico dos materiais pode ser confirmado pela Lei das Potências, conforme Equação (1):

$$\eta(\dot{\gamma}) = m (\dot{\gamma})^{n-1} \quad (1)$$

Onde η é a viscosidade do material, m é o índice de consistência, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, n é o índice da Lei de Potências.

2.5 Teste de formação de filamento

A capacidade de formação de filamento dos hidrogéis de PEG-Laponita foi examinada usando um microscópio óptico acoplado ao cabeçote da impressora 3D. O *software* Repetier-Host V2.1.3 foi utilizado para gerar uma velocidade de pistão de 0,526 mm/min (vazão de 0,2 ml/min). Neste teste, uma pequena vazão garante que o filamento seja formado devido às propriedades do material e não devido a uma alta vazão. A extrusão

do material ocorreu através de uma ponta de bico 22G de 25 mm de comprimento comprada na Injex, Brasil.

2.6 Ensaio de Degradação *in vitro* e Intumescimento dos arcabouços

Antes do material ser impresso, os hidrogéis de PL-Alg foram adicionados em seringas descartáveis, e devido à presença de bolhas, foram novamente submetidos à centrifugação a 200 rpm por 20 minutos. O processo de impressão 3D foi baseado em extrusão, no qual a mistura foi depositada na forma de filamentos. Os parâmetros utilizados para a impressão foram: velocidade de impressão de 10 mm/s; velocidade do pistão de 1 mm/min (5%), 1,2 mm/min (7,5%) e 1,4 mm/min (10%); número de 10 camadas para cada amostra, sendo altura de 0,25 mm em cada camada e espaçamento de 2 mm entre os filamentos. A impressora utilizada foi uma open-source baseada no projeto RepRap, com cabeçote de seringa e bico cônico de 400 µm de diâmetro. O software utilizado para geração do G-code dos arcabouços foi o BioScaffolds PG-V2 [34]. Logo após a impressão, os arcabouços foram mantidos em solução de cloreto de cálcio concentração de 2% para promoção da reticulação da rede de alginato, e posteriormente, armazenados em refrigeração a 8 °C.

Para o ensaio de degradação *in vitro*, as amostras de arcabouços impressos de PL-Alg foram submersas em uma solução tampão de fosfato (PBS – pH 7,4). As amostras foram condicionadas por períodos de até 48h sob agitação constante em incubadora shaker (Excella E24, New Brunswick Scientific, Canadá) a temperatura de 37 °C. Durante esse período, alterações nos valores de pH da solução e das massas das amostras foram determinadas. Para as análises foram utilizadas 6 amostras de cada composição. A solução de PBS foi trocada a cada coleta. Após o ensaio, foi calculada a perda de massa (%) pela equação (2):

$$\%P = (M_{final} - M_{inicial}/M_{inicial}) \times 100 \quad (2)$$

Para determinação da capacidade de intumescimento dos arcabouços, as amostras foram secas e pesadas após submersão em solução PBS, nas mesmas condições do ensaio de degradação. Para o cálculo do índice de intumescimento foi utilizada a equação (3).

$$\%I = (M_{int} - M_{seca}/M_{seca}) \times 100 \quad (3)$$

Onde M_{int} é a massa úmida da amostra após intumescimento, M_{seca} é a massa seca da amostra antes do ensaio, e % I é o Índice de intumescimento do hidrogel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O desenvolvimento de biotintas à base de PEG-Laponita para impressão 3D por extrusão é atualmente objeto de vários estudos, por conseguinte, formulações otimizadas continuam sendo um desafio. Na Figura 1 são apresentadas as curvas de caracterização reológica das amostras de gel PEG-400 contendo Laponita. A Figura 1(a) mostra as curvas de viscosidade, onde pode ser observado um aumento nessa propriedade devido à adição da Laponita. Todos os compósitos avaliados possuem comportamento pseudoplástico. Esse comportamento é associado à formação da estrutura de “castelo de cartas”, quando o gel não está submetido a uma tensão de cisalhamento. Quando é aplicado a tensão, a estrutura é destruída progressivamente em função da taxa de cisalhamento. Como resultado, a viscosidade diminui de maneira significativa, o que é de grande importância durante o processo de impressão [29, 35, 36]. O comportamento pseudoplástico permite depositar o gel na plataforma da impressora 3D de uma maneira controlada e sem a necessidade de aplicar uma alta pressão no cabeçote. Durante a extrusão são geradas altas taxas de cisalhamento nas paredes do bico da impressora, nesse momento, a viscosidade diminui permitindo o fácil escoamento do material. No entanto, a viscosidade deve ser recuperada quando o material está depositado na plataforma de construção, para manter a estruturação durante o processo. Para isso, foi analisada a viscoelasticidade dos géis; nas Figuras 1(b) e 1(c) são mostrados os testes oscilatórios dinâmicos de varredura de amplitude e de varredura de frequência. O módulo de armazenamento (G') está relacionado com a componente elástica do material e o módulo de perda (G'') com a componente viscosa.

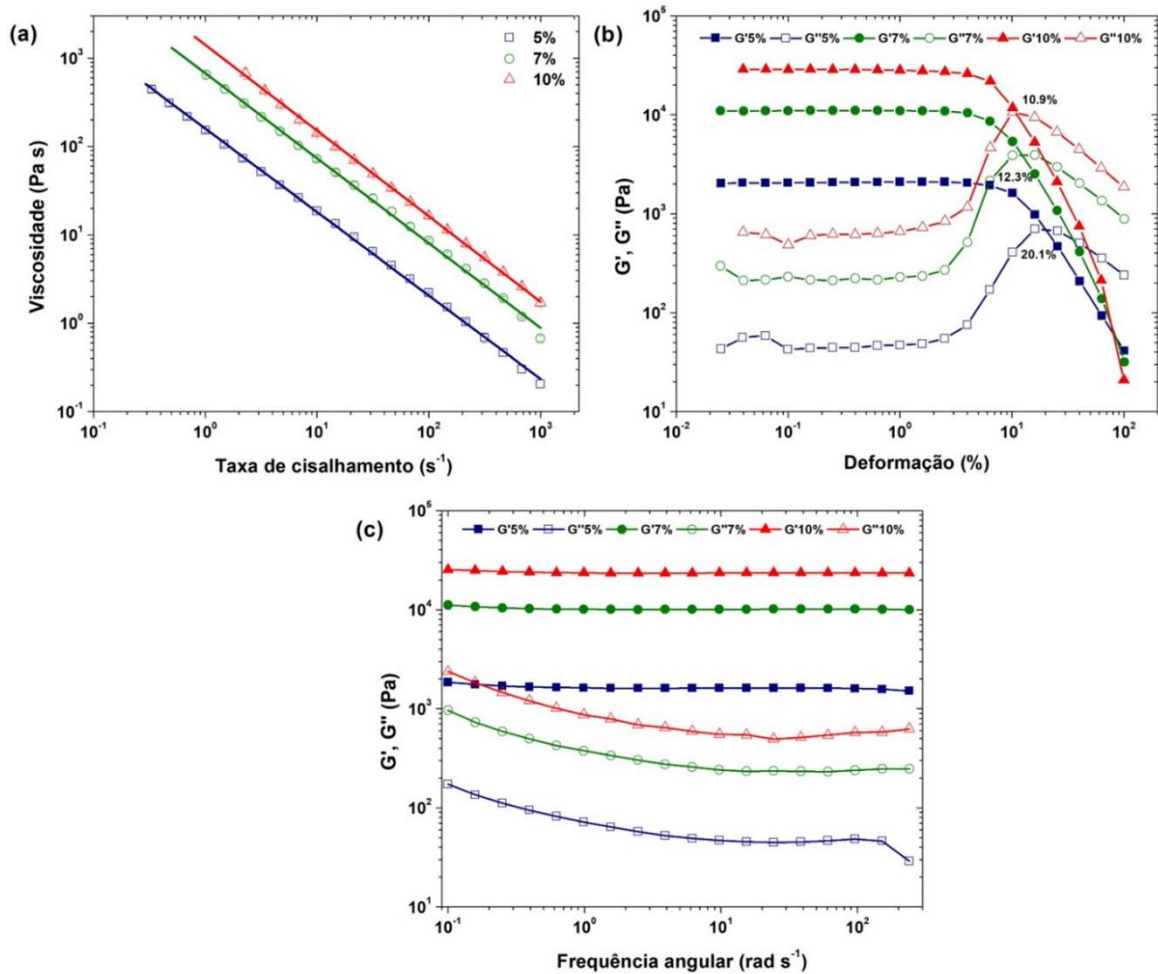


Figura 1: Caracterização reológica dos hidrogéis compósitos PL5, PL7,5 e PL10: (a) curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, (b) teste de varredura de amplitude (c) teste de varredura de frequência G' módulo de armazenamento (símbolo cheio) e G'' módulo de perda (símbolo vazio).

Para todos os casos, foi possível observar o comportamento predominantemente elástico ($G' > G''$). Na presença de pequenas deformações, os compósitos têm uma maior tendência de manter a sua estrutura. Essa característica juntamente com a recuperação da viscosidade permite que as amostras originadas no processo de impressão 3D mantenham sua forma. Ainda, na Figura 1(b) é possível observar um ponto de transição, onde o material passa de um comportamento predominantemente elástico para um comportamento viscoso. Após o ponto de transição ($G'' > G'$), sob maiores deformações, o gel dissipa energia com maior facilidade devido ao caráter viscoso, corroborando o fácil escoamento pela ponta do bico [1, 2]. Na Figura 1(c), como observado nos testes de varredura de frequência, as amostras apresentaram comportamento predominantemente sólido após sofrer pequenas amplitudes de deformação, o que aumenta a probabilidade de que o material venha a manter a sua forma após a deposição.

RODRIGUEZ *et al.* [37] determinaram alguns parâmetros reológicos de hidrogel de PEG400-Laponita com auxílio de um viscosímetro, variando a concentração de Laponita. Eles mostraram que em baixas concentrações (< 1%), o material exibe comportamento de fluido Newtoniano, sendo que somente entre concentrações de 1,5 e 4,5% de Laponita passa a ter comportamento de gel, com um acréscimo na viscosidade em uma ordem de magnitude, denotando também tixotropia. PEAK *et al.* [33] constataram que em hidrogéis de PEG-Laponita (utilizando 10%(m/v) de PEG 3,4kDa) a formação de gel ocorre em concentrações acima de 4% de Laponita após 24 horas.

Para avaliação da imprimibilidade do compósito PEG-Laponita foi realizado o teste de formação de filamento, onde constatou-se a adequabilidade da extrusão do material durante o processo de impressão 3D, como suportado pelos dados de viscosidade da Figura 1(a). A adequabilidade pode ser constatada pela formação de um filamento contínuo, o qual possibilitará a deposição em camadas contínuas. Assim, a Figura 2 mostra o perfil dos filamentos formados para cada composição, não sendo distinguidas diferenças entre eles.

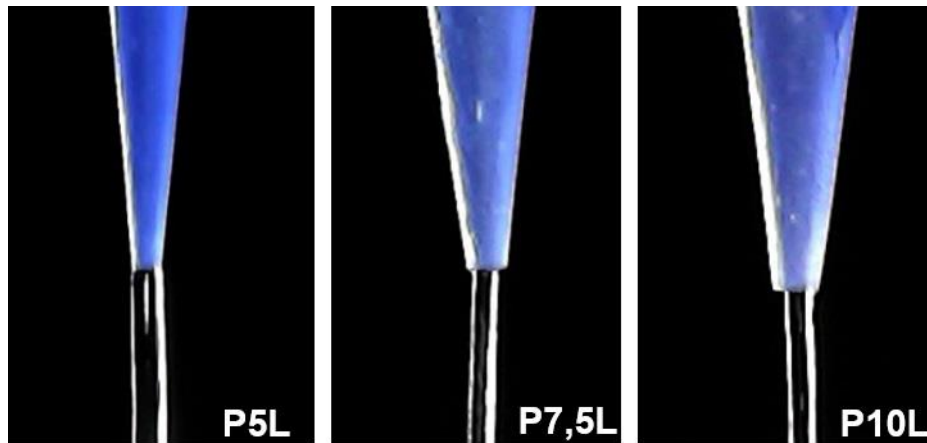


Figura 2: Capacidade de formação de filamentos do compósito PEG-Laponita.

Na Figura 3 são mostradas as curvas de reologia dos materiais compósitos contendo a concentração fixa de 2,5% de alginato, com intuito de avaliar que a nova composição apresenta características adequadas de uma tinta e, futuramente, como biotinta para biopressão 3D. Na Figura 3(a) é observado em todos os casos um aumento da viscosidade do sistema após a adição do biopolímero. De forma equivalente ao compósito PEG-Laponita (Figura 1(a)), o nanosilicato tem a capacidade de interagir eletrostaticamente com os biopolímeros. Da interação entre o alginato e as partículas de nanosilicato podem surgir ligações entre os discos de Laponita e as moléculas de alginato aniônico [29]. Dessa forma, aprimorando a capacidade pseudoplástica do material na presença de tensão de cisalhamento, o que demonstra que a adição de alginato foi benéfica ao sistema, mesmo que a motivação primária a sua inclusão seja a reticulação.

Na Figura 3(b) são apresentados os resultados do teste de varredura da amplitude de deformação. De forma símil ao compósito anterior, foi observado que todas as amostras apresentam um comportamento predominantemente elástico ($G' > G''$), indicando que após a impressão terão as suas estruturas preservadas. Também, foi possível observar o processo de transição do comportamento de gelificação do compósito devido à interação eletroestática do nanosilicato com os polímeros presentes. Sucedeu-se que todas as amostras após o ponto de fluxo tiveram seu comportamento predominantemente viscoso ($G'' > G'$), sendo indicativo de que as amostras quando em contato com as paredes do bico de impressão, escoarão mais facilmente, em seguida recuperando a sua forma após o seu depósito. Na Figura 3(c) os testes de varredura por frequência indicam que as amostras apresentam comportamento majoritariamente elástico após sofrer pequenas amplitudes de deformação. Esse comportamento é de suma importância para que os arcaouços mantenham sua estrutura após a impressão [2, 36].

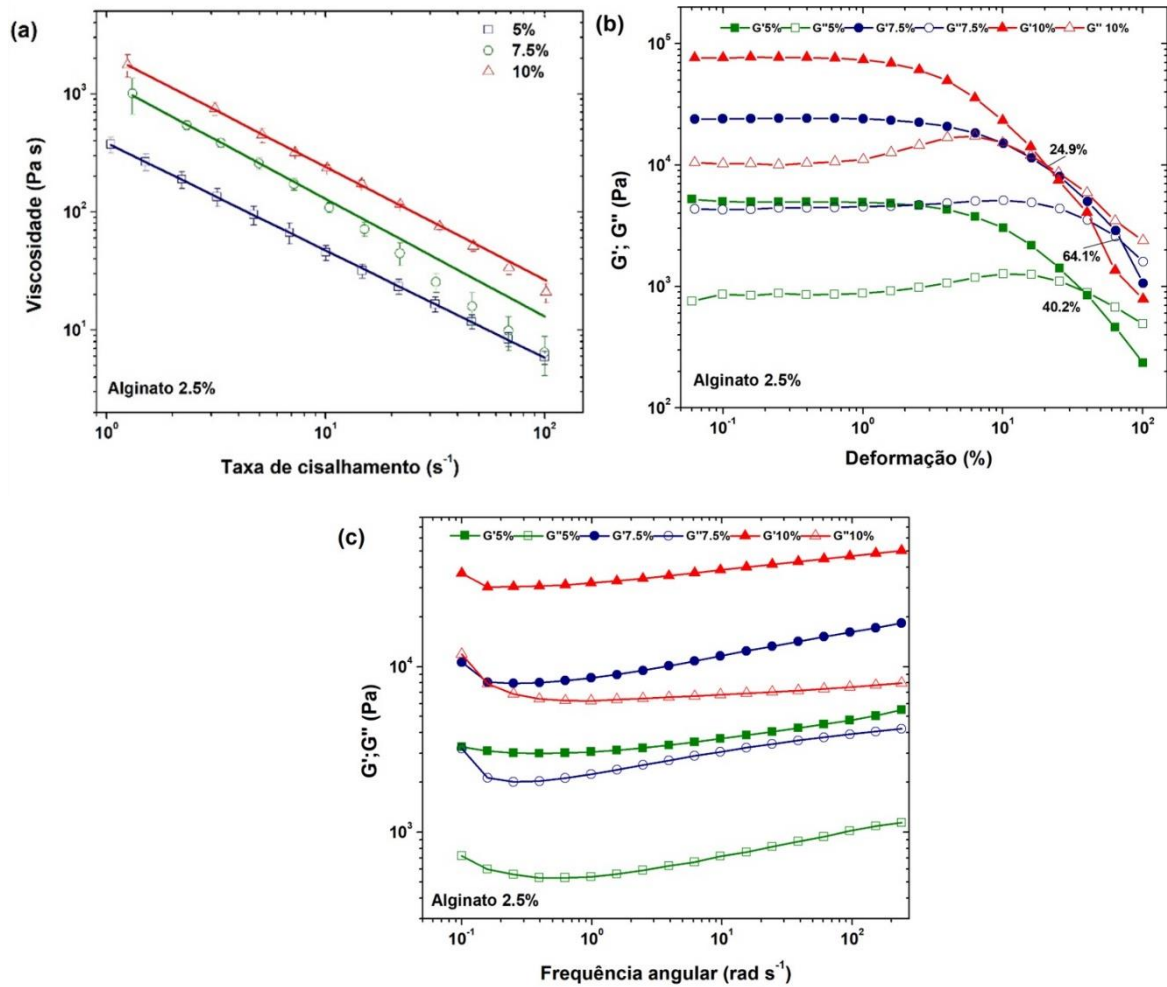


Figura 3: Caracterização reológica dos hidrogéis compostos PL5-Alg, PL7,5-Alg e PL10-Alg: (a) curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, (b) Teste de amplitude por varredura (c) teste varredura de frequência. G' módulo de perda (símbolo cheio) e G'' módulo de armazenamento (símbolo vazio).

Correlacionando as curvas de viscosidade da Figura 1(a) e 3(a) com a Tabela 2, é possível confirmar que as amostras exibem um comportamento pseudoplástico, como determinado pela Lei das Potências. O índice de consistência (m) está ligado diretamente à viscosidade dos compostos, uma vez que este é definido como a viscosidade quando a taxa de cisalhamento é 1 s^{-1} . Contudo, n pode descrever o grau de plasticidade que um sistema exibe. Quando $n = 1$, a solução é considerada newtoniana; $n < 1$ pseudoplástica; $n > 1$ dilatante [29, 33]. Nesse sentido, é possível afirmar que a contribuição da Laponita foi mais significativa em atribuir a pseudoplasticidade às duas formulações de composto, uma vez que com o aumento do teor de Laponita, há uma diminuição significativa de n . Entretanto, como mostrado na Tabela 2, o índice de consistência (m) de todas as composições contendo alginato é maior, o que corrobora o aumento da viscosidade.

Tabela 2: Parâmetros do modelo de Lei das Potências ($\eta = m \dot{\gamma}^{n-1}$)

Parâmetros	Compósito PEG-Laponita			Compósito PEG-Laponita-alginato		
	P5L	P7,5L	P10L	P5L-Alg	P7,5L-Alg	P10L-Alg
$m \text{ (Pa s}^n\text{)}$	159 ± 9	674 ± 50	1407 ± 82	383 ± 61	1276 ± 203	2164 ± 106
$n (-)$	$0,55 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,03$

Conforme ocorre a adição de Laponita XLG no compósito, há um acréscimo no valor de m , devido à aproximação da estrutura de “castelo de cartas”, onde as forças de repulsão são equilibradas com as forças de atração. Por sua vez, o decréscimo em n é atribuído à quebra do equilíbrio entre as forças de Van der Waals e eletrostáticas no compósito. Com a ação do cisalhamento, a Laponita se orienta paralelamente à direção do fluxo. Sugere-se que, devido à carga eletrostática, duas partículas paralelas de Laponita se repelem, deslizando uma sobre a outra para produzir um fluido pseudoplástico [38]. Ainda, é pertinente considerar que as partículas de Laponita reticulam-se entre si fisicamente, tanto quanto com as redes poliméricas do PEG e do alginato [29, 37]. Portanto, para todos os casos, os valores de $n < 1$ confirmam o comportamento ideal de uma biotinta, ou seja, os materiais quando mediante a presença de tensão de cisalhamento apresentaram diminuição de suas viscosidades [36].

A Figura 4 apresenta os dados do teste de recuperação de viscosidade dos hidrogéis de PL-Alg. Após uma aplicação de alta taxa de cisalhamento, a viscosidade é parcialmente recuperada. Para todas as amostras, pode ser notada uma recuperação no terceiro intervalo após 100 s. Assim, pode-se afirmar que em relação à análise de recuperação da viscosidade, os compósitos contendo 5 e 10% de Laponita apresentaram uma recuperação parcial, enquanto que os compósitos contendo 7,5% apresentaram uma recuperação total (tixotrópicos) após a aplicação de cisalhamento, parâmetro reológico a ser considerado no desenvolvimento de uma biotinta.

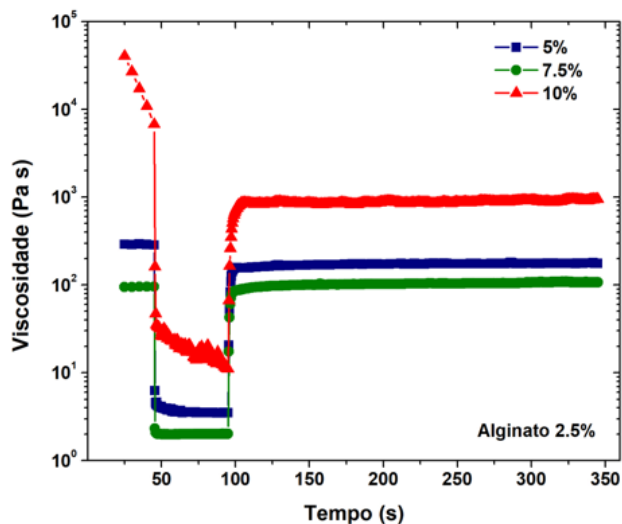


Figura 4: Teste de recuperação da viscosidade do hidrogel de PL-Alg com diferentes teores de Laponita.

Essa propriedade é de grande interesse, uma vez que é necessário que a estrutura impressa mantenha sua integridade durante o processo. A recuperação observada no material está associada à reestruturação da estrutura de “castelo de cartas” após passar pelo cisalhamento no bico da impressora. A componente elástica das cadeias poliméricas também contribui na recuperação da viscosidade, já que a energia elástica permite a reorganização parcial da rede polimérica [39]. Uma outra consideração importante a ser feita é que a recuperação da viscosidade após o cisalhamento determina a facilidade de incorporação de células para uso como biotintas. A recuperação rápida do material sugere que a incorporação de células poderá ser pipetada várias vezes [32].

Os arcabouços de PL-Alg impressos com 10 camadas, e reticulados em cloreto de cálcio (CaCl_2), são exibidos para ilustrar o efeito da composição sobre o processo (Figura 5). Pela imagem é possível distinguir uma pequena diferença na porosidade dos arcabouços, considerando que todos foram impressos na mesma condição, mas como consequência da espessura dos filamentos, sendo mais espesso em função do aumento do teor de Laponita. Vale destacar que a distância entre os filamentos foi mantida a mesma para a impressão de todos os materiais. De forma geral, as amostras de P7,5L-Alg e P10L-Alg apresentaram uma melhor capacidade de impressão, gerando arcabouços mais homogêneos e regulares, em outras palavras, com melhor fidelidade de forma.

Em estudo anterior, demonstrou-se que a impressão 3D de arcabouços de PEG-Laponita, originados a partir de soluções de PEGDA4K e PEGDA10K a 20% (m/v), somente foi adequada quando utilizado 7% de Laponita. Em concentrações menores, o arcabouço impresso não mantinha uma forma fixa, entretanto, ao exceder 7%, a viscosidade da solução de hidrogel de PEG-Laponita era muito alta para ser impressa à tempe-

ratura ambiente sob pressão mais baixa [33].

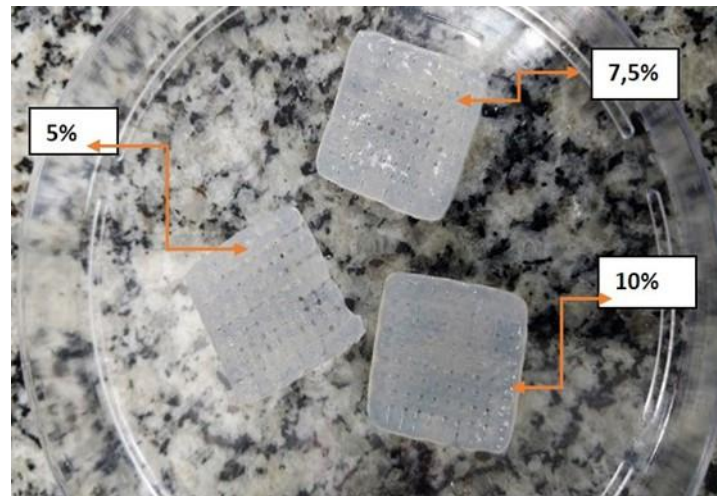


Figura 5: Diferentes amostras do compósito PL-Alg após etapa de reticulação em CaCl₂.

Uma ressalva é válida, pois nesse estudo a fidelidade do processo de impressão foi determinada qualitativamente por meio de imagens. Seria interessante investigar a fidelidade de maneira quantitativa em estudos futuros, medindo o diâmetro e o espaçamento das fibras dos arcabouços impressos [40].

Os resultados dos ensaios de intumescimento e degradação *in vitro* dos arcabouços impressos por período de até 48 horas são apresentados na Figura 6.

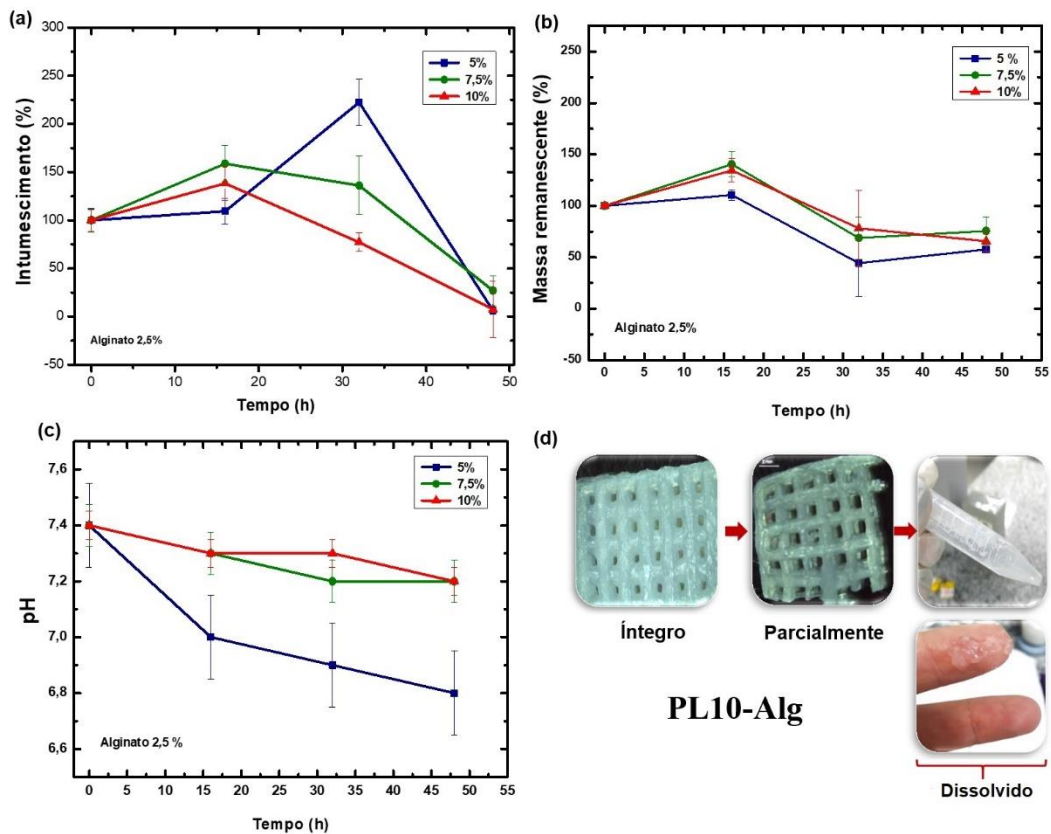


Figura 6: Curva de intumescimento e degradação *in vitro* dos compósitos PL-Alg.

Na Figura 6(a) podem ser notados os dados de intumescimento em meio PBS. No ensaio é possível verificar que, inicialmente, as amostras absorveram o solvente salino de forma mais controlada (até 20 h), sendo que as amostras P7,5L-Alg e P10L-Alg apresentaram os resultados mais interessantes para um arca-

boço. A capacidade de intumescimento de muitos hidrogéis pode ser associada a presença de polieletrólitos. As curvas de intumescimento desses arcabouços mostram melhor controle hídrico em maior espaço de tempo, enquanto na amostra de PL5-Alg houve uma absorção acelerada do meio (> 30 h), atingindo rapidamente a sua capacidade, e conseqüentemente, ocasionando a dissolução das ligações entre suas cadeias. Em período maior que 40 h, há uma diminuição significativa na capacidade de intumescimento, corroborando com as curvas de degradação. Novamente, as amostras com teor de 7,5 e 10% apresentaram melhores resultados (Figura 6(b)), uma vez que o tempo de dissolução foi mais controlado, diferentemente da amostra P5L-Alg. Após o período de 16 h, as amostras apresentaram indícios de dissolução, e em período de 48 h, todas se encontravam totalmente solubilizadas no meio salino. Após a retirada das amostras da solução salina, o pH foi controlado para verificar se houve alguma modificação da neutralidade do meio apesar da dissolução do compósito no sistema. Na Figura 6(c) pode ser observado que não houve alterações significativas. Esses valores foram encontrados em trabalhos semelhantes [41-43]. Na Figura 6(d), temos exemplo das amostras de PL10-Alg demonstrando o processo de dissolução das cadeias, sendo é possível observar que as amostras perderam totalmente a sua forma. Acredita-se que diversos fatores influenciaram tanto na capacidade de absorção de líquido como na dissolução dos arcabouços em um curto período. Dentre eles, a baixa massa molar do PEG, baixa cristalinidade da rede, o tipo de reticulação, pH, presença de aditivos [37].

Portanto, o estudo de degradação demonstrou que a tinta à base de PEG-400, um polímero de baixa massa molar, apresentou ser um hidrogel com cadeias bastante suscetíveis à dissolução, quando exposto à ambiente aquoso, mesmo sendo reforçado com as partículas de Laponita [10, 12]. Possivelmente, gerando subprodutos monoméricos não tóxicos, e conseqüentemente não restringindo seu uso [11]. Ademais, sabe-se que os íons de cálcio reticulam ionicamente os grupos gulurônicos (bloco G) do alginato formando uma estrutura conhecida por “caixa de ovos”, o que restringe a mobilidade das cadeias poliméricas, tendo como resultado uma rede reticulada, e que por ser reversível torna-se de grande valia para a bioimpressão 3D. Entretanto, altas concentrações de alginato inibem parcialmente o efeito de modificador reológico da Laponita, sendo fundamental contrabalancear essas propriedades frente a novas formulações [37]. Por fim, é oportuno considerar que futuros estudos visando buscar a maneira mais apropriada de reticulação da cadeia de PEG, viabilizaria a utilização do sistema PEG-Laponita-alginato como biotinta para aplicações em bioimpressão 3D para Engenharia Tecidual.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudou-se a composição de PEG400-Laponita-alginato, a fim de obter uma tinta com propriedades reológicas adequadas para bioimpressão 3D, uma vez que essa formulação utiliza materiais de baixo custo, fácil acesso e boa biocompatibilidade. Apesar do significativo número de trabalhos reportados para essa área, a literatura ainda carece de estudos mais aprofundados, principalmente com informações sobre o comportamento e protocolos reológicos para que sejam reproduzidos. Logo, foi possível observar o efeito da adição de Laponita, ao conferir viscoelasticidade adequada ao sistema proposto, possibilitando com a inclusão de alginato como agente reticulante, a estruturação de arcabouços com 10 camadas via impressão por extrusão. Embora o compósito tenha se dissolvido, os resultados demonstram adequada imprimibilidade do material, o que o torna atraente para aplicação pretendida. Para trabalhos futuros, salienta-se a necessidade de um método de reticulação que seja mais eficiente em envolver as cadeias de PEG, com intuito de postergar a viabilidade dos arcabouços com aprimoramento de suas propriedades mecânicas e de reticulação.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer ao auxílio financeiro concedido sob os processos nº 2019/11950-6 e nº 2017/23776-5 pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001. Os autores também gostariam de agradecer à empresa Colormix Especialidades pela doação da Laponita XLG. Pesquisa apoiada pelo CTI-Nano, laboratório estratégico do SisNano, MCTI e financiado pelo CNPq.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] KHOEINI, R., NOSRATI, H., AKBARZADEH, A., *et al.*, “Natural and Synthetic Bioinks for 3D Bioprinting”, *Advanced NanoBiomed Research*, v. 1, n. 8, pp. 2000097, 2021.

- [2] PAXTON, N., *et al.*, “Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability”. *Biofabrication*, v. 9, n. 4, pp. 044107, Aug. 2017.
- [3] MAGALHÃES, I. P., OLIVEIRA, P. M. D., DERNOWSEK, J., *et al.*, “Investigation of the effect of nozzle design on rheological bioprinting properties using computational fluid dynamics”, *Revista Matéria*, <http://www.materia.coppe.ufrj.br>. Acessado em janeiro de 2022.
- [4] HÖLZL, K., *et al.*, “Bioink properties before, during and after 3D bioprinting”, *Biofabrication*, v. 8, n. 3, pp. 032002, Sep.2016.
- [5] MATAI, I., *et al.*, “Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering”, *Biomaterials*, v. 226, pp. 119536, Oct. 2020.
- [6] VO, R., HSU, H., JIANG, X., “Hydrogel facilitated bioelectronic integration”, *Biomaterials Science*, v. 9, n. 1, pp. 23-37, 2021.
- [7] WU, Y., *et al.*, “Effect of cross-linking on the diffusion of water, ions, and small molecules in hydrogels”. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 113, n. 11, pp. 3512-3520, Feb. 2009.
- [8] FU, Z., *et al.*, “Printability in extrusion bioprinting”, *Biofabrication*, v. 13, n. 3, pp. 033001, jul. 2021.
- [9] ARAÚJO, L. C. P., OLIVEIRA, J. M., ARANHA, N. “Síntese e caracterização de scaffolds de fibroína”. *Revista Matéria*, v. 23, 2018. <http://www.materia.coppe.ufrj.br>. Acessado em janeiro de 2022.
- [10] ZHAI, X., *et al.*, “Nanoclay incorporated polyethylene-glycol nanocomposite hydrogels for stimulating in vitro and in vivo osteogenesis”. *Journal of biomedical nanotechnology*, v. 14, n. 4, pp. 662-674, April 2018.
- [11] TEE, H. T., *et al.*, “Poly(methyl ethylene phosphate) hydrogels: Degradable and cell-repellent alternatives to PEG-hydrogels”, *European Polymer Journal*, v. 141, pp. 110075, 2020.
- [12] TRUONG, V. *et al.*, “Hydrophilic and amphiphilic polyethylene glycol-based hydrogels with tunable degradability prepared by click chemistry”. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 12, pp. 4012-4021, Nov.2012.
- [13] MURUGESAN, S., SCHEIBEL, T., “Copolymer/Clay Nanocomposites for Biomedical Applications”, *Advanced Functional Materials*, pp. 1908101, Feb. 2020.
- [14] XIN, S., *et al.*, “Clickable PEG hydrogel microspheres as building blocks for 3D bioprinting”, *Biomaterials science*, v. 7, n. 3, pp. 1179-1187, 2019.
- [15] CALÓ, E., KHUTORYANSKIY, V.V., “Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products”, *European Polymer Journal*, v. 65, pp. 252-267, April 2015.
- [16] IZA, M., *et al.*, “Hydrogels of poly(ethylene glycol): mechanical characterization and release of a model drug”, *Journal of Controlled Release*, v. 52, n. 1-2, pp. 41-51, March 1998.
- [17] JANG, H., SHIN, C.Y., KIM, K., “Safety evaluation of polyethylene glycol (PEG) compounds for cosmetic use”. *Toxicological research*, v. 31, n. 2, pp. 105-136, Jun. 2015.
- [18] ORYAN, A., *et al.*, “Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds”, *International journal of biological macromolecules*, v. 107, pp. 678-688, Feb.2018.
- [19] LÓPEZ, S., *et al.*, “Synthesis and Operating Optimization of the PEG Conjugate via CuAAC in scCO₂”, *ACS omega*, v. 6, n. 9, pp. 6163-6171, 2021.
- [20] HU, W., *et al.*, “Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels”. *Biomaterials science*, v. 7, n. 3, pp. 843-855, Dec. 2019.
- [21] OOI, H.W., *et al.*, “Thiol-ene alginate hydrogels as versatile bioinks for bioprinting”, *Biomacromolecules*, v. 19, n. 8, pp. 3390-3400, 2018.
- [22] TIĞLI, R. S, GÜMÜŞDERELIOĞLU, M., “Evaluation of alginate-chitosan semi IPNs as cartilage scaffolds”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, n. 3, pp. 699-709, Nov.2009.
- [23] ALDANA, A. A., VALENTE, F., DILLEY, R., *et al.*, “Development of 3D bioprinted GelMA-alginate hydrogels with tunable mechanical properties”, *Bioprinting*, v. 21, pp. e00105, 2021.
- [24] GLUKHOVA, S. A., *et al.*, “Printable Alginate Hydrogels with Embedded Network of Halloysite Nanotubes: Effect of Polymer Cross-Linking on Rheological Properties and Microstructure”, *Polymers*, v. 13, n. 23, pp. 4130, 2021.
- [25] SANCILIO, S., *et al.*, “Alginate/hydroxyapatite-based nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering improve dental pulp biomineralization and differentiation”. *Stem Cells International*, v. 2018, pp. 1-13 Jun. 2018.
- [26] KACZMAREK-PAWELSKA, A. “Alginate-based hydrogels in regenerative medicine”. In: *Alginates. IntechOpen*, Jun. 2019.
- [27] CIDONIO, G., *et al.*, “Osteogenic and angiogenic tissue formation in high fidelity nanocomposite Laponite-gelatin bioinks”, *Biofabrication*, v. 11, n. 3, pp. 035027, April 2019.
- [28] LIU, X., BHATIA, S. R., “Laponite® and Laponite®-PEO hydrogels with enhanced elasticity in phosphate-buffered saline”, *Polymers for Advanced Technologies*, v. 26, n. 7, pp. 874-879, 2015.

- [29] DÁVILA, J. L., D'ÁVILA, M. A., "Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing". *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, v. 101, n. 1-4, pp. 675-686, Nov.2018.
- [30] TOMÁS, H., *et al.*, "Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications?" *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 14, n. 7, pp. 2407-2420, Oct. 2018.
- [31] LIU, P., *et al.* "Spherical metal oxides-LAPONITE® sheets interactions: Microstructure, rheology and thixotropy of composite gels", *Applied Clay Science*, v. 208, pp. 106113, 2021.
- [32] ZHAI, X., *et al.*, "3D-Bioprinted Osteoblast-Laden Nanocomposite Hydrogel Constructs with Induced Microenvironments Promote Cell Viability, Differentiation, and Osteogenesis both In Vitro and In Vivo". *Advanced Science*, v. 5, n. 3, pp. 1700550, Nov.2018.
- [33] PEAK, C.W., *et al.*, "Nanoengineered colloidal inks for 3D bioprinting". *Langmuir*, v. 34, n. 3, p. 917-925, Oct. 2018.
- [34] DÁVILA, J. L., *et al.* "Software to generate 3-D continuous printing paths for the fabrication of tissue engineering scaffolds", *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, v. 84, n. 5-8, pp. 1671-1677, Sep.2016.
- [35] KOKOL, V., *et al.*, "Rheological properties of gelatine hydrogels affected by flow- and horizontally-induced cooling rates during 3D cryo-printing", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 616, pp. 126356, 2021.
- [36] BOM, S., *et al.*, "On the progress of hydrogel-based 3D printing: Correlating rheological properties with printing behaviour", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 615, pp. 121506, 2022.
- [37] RODRIGUEZ, M. J. *et al.*, "3D freeform printing of silk fibroin". *Acta biomaterialia*, v. 71, pp. 379-387, April 2018.
- [38] SHAHIN, A., JOSHI, Y. M., "Hyper-aging dynamics of nanoclay suspension". *Langmuir*, v. 28, n. 13, pp. 5826-5833, March 2012.
- [39] LI, J., *et al.*, "3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications". *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v. 140, pp. 100543, April 2020.
- [40] WU, D., *et al.*, "3D bioprinting of gellan gum and poly (ethylene glycol) diacrylate based hydrogels to produce human-scale constructs with high-fidelity", *Materials & Design*, v. 160, pp. 486-495, 2018.
- [41] REID, B., *et al.*, "PEG hydrogel degradation and the role of the surrounding tissue environment", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 9, n. 3, pp. 315-318, 2015.
- [42] TANG, L., *et al.*, "LAPONITE® nanorods regulating degradability, acidic-alkaline microenvironment, apatite mineralization and MC3T3-E1 cells responses to poly(butylene succinate) based bio-nanocomposite scaffolds", *RSC Advances*, v. 8, n. 20, p. 10794-10805, 2018.
- [43] NAIR, B., *et al.*, "Polycaprolactone-laponite composite scaffold releasing strontium ranelate for bone tissue engineering applications", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 143, pp. 423-430, July 2016.
- [44] DÁVILA, J. L., D'ÁVILA, M. A., "Laponite as a rheology modifier of alginate solutions: Physical gelation and aging evolution", *Carbohydrate Polymers*, v. 157, pp. 1-8, 2017.

ORCID

Karina Feliciano Santos

<https://orcid.org/0000-0001-5296-1610>

José Luis Dávila

<https://orcid.org/0000-0003-0502-5963>

Marcos Akira d'Ávila

<https://orcid.org/0000-0003-1981-9692>

Andrea Cecília Dorion Rodas

<https://orcid.org/0000-0001-9920-6882>

Jorge Vicente Lopes da Silva

<https://orcid.org/0000-0002-2347-5215>

Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano

<https://orcid.org/0000-0001-6098-6826>