

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS COMO BIOTINTAS PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS MUSCULARES ESQUELÉTICOS

Palavras-Chave: BIOIMPRESSÃO, HIDROGEL, ENGENHARIA TECIDUAL

Autores:

HENRIQUE AURELIANO LOURENÇO DA COSTA, FEQ – UNICAMP

FERNANDA CARLA BOMBALDI DE SOUZA, FEQ - UNICAMP / R-CRIO

RENATA FRANCIELLE BOMBALDI DE SOUZA, FEQ - UNICAMP / R-CRIO

ISABELA MARÇAL LIMA, FEQ - UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. ÂNGELA MARIA MORAES (orientadora), FEQ – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O desenvolvimento de tecnologias para impressão 3D voltadas para a engenharia tecidual tem crescido ao longo dos anos, visando a proposição de tratamentos alternativos de condições que causam degeneração ou danos aos tecidos humanos (Iranmanesh, 2021). Dentre as técnicas utilizadas para a fabricação dessas estruturas, destaca-se a impressão por extrusão, que consiste na deposição da tinta por compressão do êmbolo de uma seringa, com o depósito de camadas sequenciais que formam uma estrutura tridimensional estável (Ma, 2024). O material a ser extrudado deve possuir capacidade de mimetizar a matriz extracelular (ECM), bem como permitir a adesão e proliferação celular em seu interior (Iranmanesh, 2021). Diferentes tipos de hidrogéis poliméricos vêm sendo estudados para tal aplicação, pois as cadeias destes materiais associam-se a quantidades significativas de água e possibilitam a produção de estruturas porosas, o que facilita o transporte de nutrientes e a migração celular (Teixeira, 2022).

Os polímeros biológicos destacam-se neste contexto, tendo como vantagens a biocompatibilidade e biodegradabilidade (Teixeira, 2022). Dentre os biopolímeros disponíveis, destaca-se o alginato (A), oriundo de algas marrons, que possui capacidade de reticulação na presença de cátions bivalentes (Soltan, 2019), proporcionando uma estruturação primária ao gel. A goma xantana (X) proporciona características pseudoplásticas ao material (sua viscosidade diminui conforme é aplicada uma taxa de cisalhamento à formulação) (Herrada-Manchón; Fernández; Aguilar, 2023), melhorando suas características mecânicas e reológicas (Teixeira, 2022). A gelatina (G), advinda do colágeno, apresenta a sequência de peptídeos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), que

fornece sítios de adesão celular, promovendo o crescimento e proliferação celular no material (Ke, 2021).

Neste trabalho, hidrogéis compostos por alginato, goma xantana e gelatina foram formulados com diferentes proporções A:X entre si, e concentrações finais de gelatina ajustadas em 6% m/v (AXG-1, AXG-2 e AXG-3) ou 3% m/v (AXG-7, AXG-8 e AXG-9). Visando avaliar a viabilidade desses materiais para a impressão 3D, foram realizados testes de determinação da força necessária para a extrusão, bem como de parâmetros relacionados à impressão, como a printabilidade, espalhamento do filamento e porcentagem de poros formados.

METODOLOGIA:

PREPARO DAS FORMULAÇÕES

As soluções dos polissacarídeos A e X foram preparadas em PBS aquecido a 40 °C, sob agitação de 600 rpm por 25 minutos, para garantir a completa homogeneização. Os polímeros foram misturados em proporções pré-definidas dentro de seringas de 20 mL. A gelatina foi solubilizada em PBS a 45 °C sob agitação magnética e adicionada à mistura A:X, obtendo-se a concentração final desejada. O hidrogel foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos, e posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos dentro de seringas de 5 mL de capacidade, para eliminar bolhas e garantir uma distribuição interna uniforme. A formulação foi armazenada a 4 °C e os testes foram conduzidos à temperatura ambiente.

TESTE DE EXTRUSÃO

O teste foi realizado em um texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA.XTplus - Texture Analyser). Foram analisadas amostras produzida por extrusão na impressora 3D sem bico de extrusão (SG) e empregando 3 tamanhos diferentes de diâmetro do bico de extrusão (*gauge*): 18G, 20G e 22G, correspondente a 0,838; 0,603 e 0,413 mm. O deslocamento do êmbolo foi de 4 mm, sendo que a força média de extrusão foi obtida na região linear do gráfico força x deslocamento (Baú, 2023).

TESTES DE IMPRESSÃO

As impressões foram realizadas em uma biopressora TissueStart™ (TissueLabs), à temperatura ambiente, mantendo uma velocidade fixa de 2 mm/s e variando o fluxo de saída do material (*flow*). A printabilidade (medida do quanto os poros impressos se assemelham ao modelo teórico estabelecido) foi avaliada segundo a equação 1 (Habib, 2018):

$$Pr = \frac{L^2}{16A_c} \quad (1)$$

em que L é o perímetro e A_c é a área do poro. Valores de Pr próximos de 1 indicam que o poro formado melhor se aproxima de um quadrado (maior fidelidade do objeto impresso ao modelo). Valores de Pr maiores que um indicam maior viscosidade e quanto menor a printabilidade, o inverso ocorre (Ouyang, 2016). Em ambos os casos a fidelidade ao modelo teórico é comprometida.

O espalhamento do filamento foi obtido pela equação 2:

$$F_s = \frac{F_{w,r} - F_{w,t}}{F_{w,t}} * 100 \quad (2)$$

em que $F_{w,r}$ e $F_{w,t}$ representam os valores real e teórico da largura do filamento, respectivamente.

A porcentagem de poros formados é dada pela razão entre a quantidade de poros da diagonal formados pela quantidade total prevista.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Observou-se que a força necessária para extrusão aumenta conforme a proporção de xantana se eleva na formulação, corroborando o papel do polímero na estruturação mecânica do hidrogel. A força necessária para extrudar a formulação AXG-9, que contém uma proporção elevada de xantana, ficou acima de 1,8 vezes do valor determinado para a AXG-7, para todos os bicos de extrusão utilizados (razão entre a força AXG-9/força AXG-7 > 1,8 em todos os casos).

O *gauge* também exerce influência na força aplicada, sendo que para todas as formulações a redução do diâmetro do bico de extrusão levou a um aumento da força média. O aumento da força requerida, observado na Figura 1 para a formulação AXG-1, decorre da redução da área de escoamento, que dificulta a passagem do material pela saída do bico de extrusão.

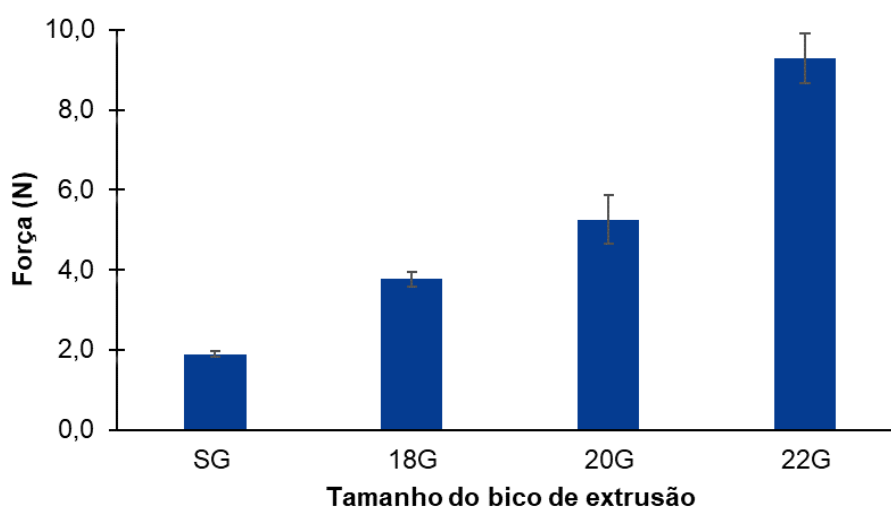


Figura 1: Força necessária para extrusão da formulação AXG-1. SG: sem bico de extrusão.

Percebe-se que as variáveis relacionadas à impressão sofrem influência do fluxo utilizado, do *gauge* do bico de extrusão, da proporção de xantana e da concentração final de gelatina na formulação. Considerando as variáveis citadas, os testes de impressão foram conduzidos em uma faixa de fluxos entre 150%-450%. As formulações que continham gelatina em uma menor concentração necessitaram de fluxos menores para serem impressas, visto que a proteína também traz estruturação mecânica ao material, devido à reticulação que sofre em temperatura ambiente.

A influência do *gauge* no formato do desenho para a formulação AXG-1 é apresentada na Figura 2. Observa-se que conforme ele aumenta, mantendo-se o fluxo fixo em 400%, os poros do

desenho tendem a serem preenchidos, por conta do excesso de material que é depositado, apesar da diminuição das falhas em relação ao desenho. Portanto, para 22G reduziu-se o fluxo para 250%, que resultou em um desenho com filamentos mais finos e poros com melhor resolução.

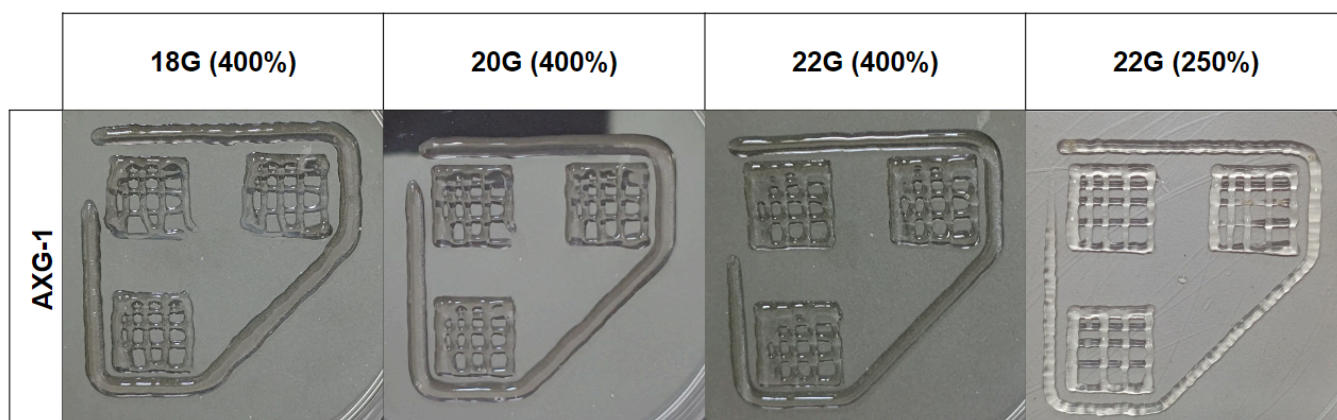


Figura 2: Impressão da formulação AXG-1 em diferentes gauges e flows. Fonte: Autoria própria.

No geral, a porcentagem de poros formados variou entre 26% a 80%, sendo que a formulação AXG-9 formou menos poros independentemente do bico de extrusão utilizado. Os valores de printabilidade foram acima de 0,8 para todas as formulações testadas. Para todos os *gauges*, a partir do poro $3 \times 3 \text{ mm}^2$, conforme o tamanho do poro aumenta, a printabilidade se aproxima de 1. Para 22G, os valores de printabilidade ficaram abaixo de 1 para todos os tamanhos de poro e formulações testadas. Para o tamanho 20G, o espalhamento de filamento foi abaixo de 170% para todas as formulações, sendo que as que foram impressas com fluxos acima de 300% tiveram maior espalhamento, devido à quantidade excessiva de hidrogel extrudado.

CONCLUSÕES:

Conclui-se que formulações que contêm maior proporção de xantana necessitam de maior força para serem extrudadas da seringa, o mesmo sendo observado ao se utilizar maiores *gauges*. A impressão é influenciada por parâmetros externos à composição do material (*gauge* e fluxo), que impactam na printabilidade e espalhamento do filamento, e por características intrínsecas do hidrogel (quantidade de xantana e concentração de gelatina), tendo efeito na porcentagem de poros formados. Os testes conduzidos contribuíram no entendimento da identificação e impacto das variáveis presentes no processo de impressão 3D por extrusão, que auxiliarão a definir as melhores condições para a impressão de estruturas homogêneas e com geometria adequada.

Testes futuros estão previstos para avaliar aspectos reológicos do material, como a recuperação da viscosidade e a determinação dos módulos viscoso (G'') e elástico (G'). Estudos adicionais serão conduzidos por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os quais possibilitarão estimar os diâmetros dos poros internos do material, visando analisar a efetividade da transferência de matéria e de crescimento celular em seu interior.

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos ao Me. Victor Marchiori de Souza, pesquisador do LEBC, pela assistência na operação do texturômetro, bem como na constante ajuda nas práticas laboratoriais. Ao Me. Rafael Abboud Azoubel, orientado do Prof. Marcos A. D'Ávila da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da UNICAMP, pelo apoio nos testes de impressão. Ao técnico Gilson Barbosa pelo empréstimo do suporte utilizado no teste de extrusão. À Ma. Luisa Pires Vaz pelo auxílio na esterilização dos hidrogéis. Finalmente, agradecemos ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo financiamento do projeto.

BIBLIOGRAFIA

BAÚ, Rosana Z. **Influência do Ácido Hialurônico e Alginato de Sódio na Reologia e na Liberação da Sinvastatina em Hidrogéis Termossensíveis a Base de Pluronic F127**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2023.

HABIB, Ahasan et al. 3D Printability of Alginate-Carboxymethyl Cellulose Hydrogel. **Materials**, v. 11, p. 454, 2018.

HERRADA-MANCHÓN, Helena; FERNÁNDEZ, Manuel Alejandro; AGUILAR, Enrique. Essential Guide to Hydrogel Rheology in Extrusion 3D Printing: How to Measure It and Why It Matters? **Gels**, v. 9, p. 517–517, 2023.

IRANMANESH, Pedram et al. Bioprinting of three-dimensional scaffold based on alginate-gelatin as soft and hard tissue regeneration. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 14, p. 2853–2864, 2021.

KE, Cherng-Jyh et al. Alginate-gelatin based core-shell capsule enhances the osteogenic potential of human osteoblast-like MG-63 cells. **Materials & Design**, v. 210, p. 110109, 2021.

MA, Yue et al. Advancements of 3D bioprinting in regenerative medicine: Exploring cell sources for organ fabrication. *Heliyon*, v.10, p. e24593, 2024.

OUYANG, Liliang et al. Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. **Biofabrication**, v.8, p. 035020, 2016.

SOLTAN, Nikoo et al. Printability and Cell Viability in Bioprinting Alginate DialdehydeGelatin Scaffolds. **ACS Biomaterial Science & Engineering**, v.5, p. 2976-2987, 2019.

TEIXEIRA, Maria C. et al. A Guide to Polysaccharide-Based Hydrogel Bioinks for 3D Bioprinting Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 6564, 2022.