

Estabelecimento de um bioprocesso de manufatura aditiva para produção de um biogel resultante da associação do plasma rico em plaquetas (PRP), alginato de sódio e fibroína de seda

Thaís Amaral França^{1,2}, João Tadeu Ribeiro-Paes², Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano¹

thais.franca@unesp.br, ribeiro.paes@unesp.br, juliana.daguano@cti.gov.br

**¹Divisão de Tecnologias para Produção e Saúde
CTI/MCTI Renato Archer – Campinas/SP**

**²Faculdade de Ciências e Letras de Assis
Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – Assis/SP**

Abstract. *Regenerative medicine has optimized the development of biomaterials for biomedical applications. Three of the biomaterials studied are silk fibroin, sodium alginate and platelet-rich plasma. 3D printing of a hydrogel combination of these materials may be able to achieve not only localized delivery and sustained release of growth factors, but also an improvement in the skin's regenerative capacity. In this study, the biogel resulting from this association was standardized for the extrusion 3D printing methodology, in order to support the creation of a new therapeutic approach in the treatment of difficult-to-heal skin wounds.*

Resumo. *A medicina regenerativa tem permitido otimizar o desenvolvimento de biomateriais para aplicações biomédicas. Três dos biomateriais estudados são a fibroína de seda, alginato de sódio e o plasma rico em plaquetas. A impressão 3D de hidrogel obtido a partir da combinação desses materiais pode ser capaz de alcançar não apenas a entrega localizada e a liberação sustentada de fatores de crescimento, mas também a melhora da capacidade regenerativa da pele. Neste estudo foi realizada a padronização do biogel resultante dessa associação para a metodologia de impressão 3D por extrusão, a fim de fundamentar a criação de uma nova abordagem terapêutica no tratamento de feridas cutâneas de difícil cicatrização.*

1. Introdução

A medicina regenerativa (RM) representa uma nova área de conhecimento que tem despertado grande interesse, não só de diferentes grupos de pesquisa das ciências biomédicas e bioengenharia, mas também das indústrias farmacêuticas e de dispositivos médicos. Todo este interesse é decorrente do grande potencial de aplicabilidade da RM em terapêutica humana e veterinária. Conceitualmente, a RM é um campo de saber interdisciplinar que resulta da aplicação e interação de diferentes áreas do conhecimento buscando manter, melhorar, reparar, regenerar ou substituir tecidos ou órgãos acometidos por diferentes patologias. Desta forma, segundo Dieckmann et al (2010) a RM pode ser definida como o “reparo, substituição ou regeneração de células, tecidos e

órgãos que restauram funções comprometidas decorrentes de defeitos congênitos, doenças, traumas e envelhecimento”. A interação do conjunto de conhecimentos e técnicas específicas da medicina regenerativa (RM) e engenharia de tecidos (TE), referida atualmente pelo acrônimo TERM (Fisher and Mauk, 2013), tem permitido otimizar o desenvolvimento de materiais sintéticos ou biológicos, denominados de biomateriais, os quais podem, ainda, atuar como arcabouços (scaffolds) para inserção de células ou diferentes tipos de moléculas (citocinas, fatores de diferenciação, antibióticos, etc...) que poderão concorrer para a regeneração de tecidos e órgãos com alterações morfológicas e/ou funcionais.

Os biomateriais podem, portanto, ser definidos como um material “projetado para direcionar, pelo controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, em medicina humana ou veterinária” (Williams, 2009). Entre os principais atributos dos biomateriais vale destacar a necessidade de serem atóxicos, porosos, permissivos à adesão celular, biodegradáveis, com elasticidade adequada ao tecido em que é aplicado e biocompatível, de modo a não ser reconhecido como corpo estranho pelo sistema imune do receptor (Hernandez and Reyes-Romero, 2019). Entre os biomateriais que apresentam tais propriedades e têm sido mais comumente empregados, vale citar quitosana, alginato, colágeno, polietileno, ácido hialurônico e fibroína (Bellini et al., 2012). Mais recentemente, a fibroína da seda vem sendo estudada como um biomaterial promissor para novas aplicações biomédicas em função de não estimular respostas inflamatórias e poder ser empregada em diferentes conformações como membrana, fibra, hidrogel e filme (Araujo et al, 2018).

A fibroína é um polímero natural derivado da seda, principalmente dos casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). A seda é organizada através da disposição da fibroína em filamentos envoltos por sericina, proteína que possui propriedade adesiva, mantendo as fibras de fibroína unidas (Debari et al., 2020). Li et al (2020) estabeleceram uma metodologia para obtenção da fibroína na forma de um hidrogel por meio da formação de uma estrutura β -folha por reações físicas, químicas ou fotoquímicas que pode ser usada como componente estrutural de um arcabouço (scaffold) para matriz extracelular, confirmando, também, que essa formulação apresenta excelentes propriedades mecânicas para ser empregada em manufatura aditiva (Kopp et al, 2019).

Com os recentes avanços da manufatura aditiva (impressão 3D) tornou-se possível a fabricação de suportes que orientam a propagação celular, permitindo construir estruturas altamente porosas, facilitando o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos, com arranjos personalizados em diferentes formas e tamanhos.

Verifica-se na literatura um expressivo número de artigos relativos à associação de diversos biomateriais e plasma rico em plaquetas (PRP). Há, no entanto, um número muito restrito de publicações sobre a associação de PRP com fibroína. O PRP é uma fração derivada do sangue contendo altas concentrações de plaquetas, que secretam fatores de coagulação, citocinas, moléculas de adesão, integrinas e, principalmente,

fatores de crescimento com propriedades mitogênicas e quimiotáticas (Stessuk et al., 2020, Marques et al., 2014) que estimulam a proliferação celular no processo de cicatrização (Mir et al., 2018; Li et al., 2020). Tais características conferem ao PRP a função fisiológica de regeneração endotelial e epitelial, estimulação à angiogênese, síntese de colágeno e homeostase (Stessuk et al., 2016). Considerando tais propriedades físico-químicas e moleculares é possível aventar a hipótese que a associação de fibroína e PRP poderá resultar num efeito aditivo ou sinérgico na regeneração tecidual em úlceras cutâneas.

Diante deste contexto, buscou-se com este estudo, estabelecer um bioprocesso exequível e reprodutível resultante da associação de PRP e fibroína de seda por meio de impressão 3D, que possa, a curto e médio prazo, fundamentar a elaboração de novas abordagens terapêuticas em úlceras cutâneas de difícil cicatrização, tais como aquelas que ocorrem em pacientes diabéticos e em pacientes acamados por longos períodos, desencadeando as úlceras de pressão.

2. Materiais e métodos

2.1. Obtenção do plasma rico em plaquetas

A obtenção do PRP foi feita conforme descrito por Franco et al (2012) a partir de sangue de doadores coletados em tubos contendo citrato de sódio em 10%. O sangue total foi submetido à centrifugação de 400 G por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido à segunda centrifugação a 800 G por 10 minutos. O terço inferior do volume total resultante da segunda centrifugação foi recuperado, correspondendo ao PRP.

2.2. Associação e impressão 3D do biogel de Alginato de sódio+PRP+fibroína

Após a obtenção de PRP, o plasma foi homogeneizado com o hidrogel de fibroína da seda, concedido por um laboratório parceiro que utiliza a metodologia de Araújo et al. (2018) com pequenas modificações. O hidrogel de alginato de sódio (Dinâmica, Brasil) foi elaborado a partir da dissolução em tampão fosfato - PBS (LGC Biotecnologia, Brasil) a 60°C nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8% e 10%. A associação do PRP e hidrogel de fibroína foram testadas em diferentes concentrações e proporções que foram padronizadas durante o desenvolvimento do projeto. Os biogéis foram inseridos em seringa de 10 ml e impressos com morfologia previamente programada no software PrusaSlicer sobre uma placa de Petri por um bico de extrusão utilizando a impressora BioEnder (BioEdTech, Brasil), conforme a metodologia de Marques et al (2019).

2.3. Análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos por análise no espectrofotômetro FT-IR (PerkinElmer, Spectrum GC), com varredura entre 4000 e 400 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1}

e 32 scans de acumulação. Os espectros foram obtidos conforme a metodologia previamente empregada por Kwok et al. (2005) e Lu et al (2016).

2.4. Análise por estereomicroscopia

Após impressão 3D e reticulação, as amostras foram observadas em estereomicroscópio (SZX16, Olympus, Japão) a fim de analisar a morfologia tridimensional dos construtos após diferentes reticulações.

2.5. Ensaio de dissolução

Os biogeis com 8% e 10% de alginato de sódio foram divididos em 3 grupos com diferentes soluções de reticulação: cloreto de cálcio 2%, cloreto de cálcio 10% e gluconato de cálcio 10%. Após impressão 3D, as amostras foram mantidas em geladeira na solução reticulante. A análise da dissolução foi realizada conforme descrito por Bratskaya et al (2021) com pequenas modificações. As amostras foram submersas em 15 ml de solução PBS e gentilmente agitadas por 60 e 120 minutos em shaker orbital a 37 °C, sendo analisadas qualitativamente ao final do ensaio.

2.6. Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNESP – Campus de Assis e os doadores de sangue estavam cientes quanto à doação e a finalidade da pesquisa, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3. Resultados e Discussão

3.1. Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O PRP foi obtido a partir da coleta de 10 mL de sangue de doadores jovens, saudáveis, com idade entre 20 e 30 anos, seguindo as normativas do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Unesp de Assis. Para evitar a formação de coágulos, o sangue foi disposto em tubos de coleta contendo citrato de sódio 10%. Após submetido à primeira centrifugação de 400 G por 10 minutos, foi possível observar, na Figura 1, a separação das hemácias, da camada leucocitária e do plasma sanguíneo.

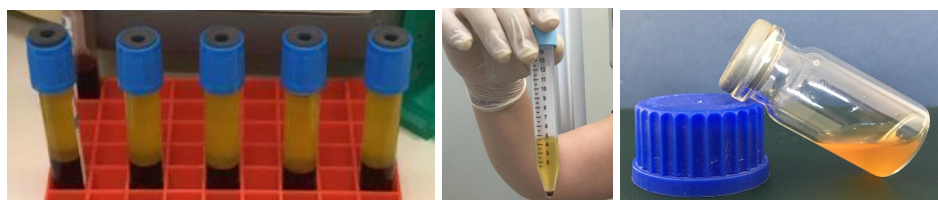


Figura 1. Sangue após a primeira centrifugação e plasma sanguíneo após a segunda centrifugação e plasma rico em plaquetas (PRP)

O sobrenadante foi coletado, evitando-se aspirar a camada leucocitária acima das hemácias, pois, segundo Marques et al (2014), as células brancas podem desencadear uma resposta inflamatória indesejável na ferida. Assim, a segunda centrifugação de 800 G por 10 minutos resultou na separação do plasma rico em plaquetas do plasma pobre em plaquetas. O plasma rico em plaquetas corresponde ao terço inferior do volume total, acima das hemácias residuais. E ao final do procedimento, para cada 10 ml de sangue coletado, foi obtido 1 ml de PRP (Figura 1).

3.2. Impressão 3D de um biogel resultante da associação do plasma rico em plaquetas (PRP), alginato de sódio e fibroína de seda.

A fibroína de seda, obtida pelo método de Araújo et al (2018), foi fornecida por pesquisadores parceiros da Universidade Estadual de Londrina, como apresentado na Figura 4 e armazenada a -20 °C em alíquotas. Seguindo o estudo de Li et al (2020), a fibroína de seda e o plasma rico em plaquetas foram associados na proporção de 1:9, respectivamente (SF+PRP), que resultou na associação apresentada na Figura 2.

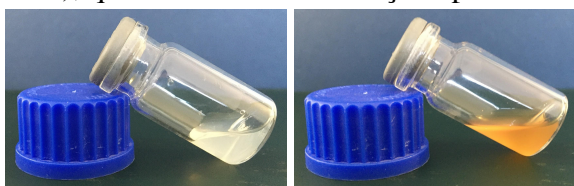


Figura 2. Fibroína de seda (SF) e associação da fibroína de seda com plasma rico em plaquetas (1:9 SF+PRP)

O alginato de sódio foi dissolvido em PBS nas concentrações de 4%, 6%, 8% e 10% (m/v). A associação SF+PRP foi adicionada à uma proporção de 10% aos hidrogéis de alginato de sódio (AG+SF+PRP), resultando no biogel apresentado da Figura 3. Foi possível visualizar a mudança de viscosidade do hidrogel, devido à presença de íons cálcio no PRP que proporcionaram uma reticulação interna do alginato de sódio.

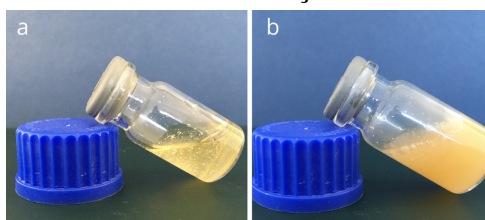


Figura 3. Solução de alginato de sódio a) Solução de alginato de sódio a 8%; b) Alginato de sódio associado ao SF+PRP.

Os biogéis foram dispostos em seringas de 10 ml e extrudados manualmente a fim de formar um filamento entre as extremidades de dois Beckers para avaliar sua capacidade de autossustentação. Assim, foi possível observar que os biogéis com concentração de 4% e 6% de alginato de sódio não apresentaram viscosidade suficiente para formar filamentos auto-sustentáveis, enquanto os biogéis com concentração de 8% e 10% de alginato apresentaram tal característica compatível com a impressão 3D por extrusão,

mesmo após 7 dias de armazenamento em geladeira (Figura 4). Assim, os biogéis 8% e 10% de alginato foram selecionados para o processo de impressão 3D.

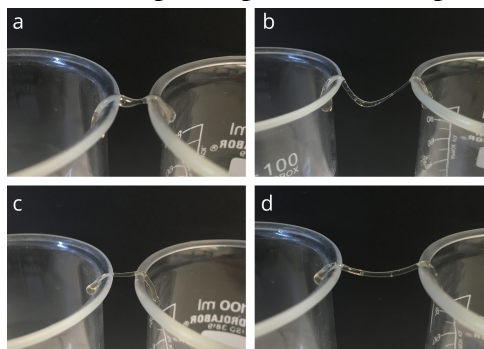


Figura 4. Teste de auto-sustentação do biogel a) Hidrogel AG 6% +SF+PRP; b) Hidrogel AG 6% +SF+PRP; c) Hidrogel AG 8% +SF+PRP; d) Hidrogel AG 8% +SF+PRP.

Antes de iniciar o processo de impressão 3D, foi feita uma modelagem digital no software PrusaSlicer seguindo as diretrizes apresentadas na Figura 5. Os biogéis com alginato a 8% e 10% foram colocados em uma seringa de 10 mL e submetidos à impressão 3D por extrusão na bioimpressora 3D BioEnder (BioEdTech, Brasil).

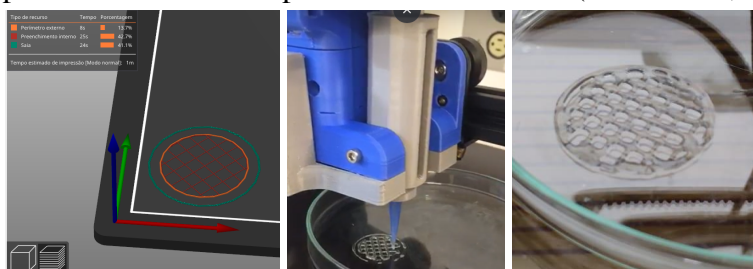


Figura 5. Impressão 3D do biogel a) Modelagem digital; b) Impressão 3D do biogel AG+SF+PRP; c) Biogel após impressão 3D.

Segundo Zhang et al (2021), o alginato de sódio pode resultar em um polímero quando adicionado à íons de cálcio, a partir da formação de um gel iônico na presença de cátions polivalentes. Assim, a reticulação é resultado da troca iônica entre íons monovalentes da solução de alginato e cátions polivalentes da solução de cálcio. Portanto, após a impressão 3D, foi realizada a pulverização com soluções de cloreto de cálcio e gluconato de cálcio nos biogéis, como mostra a Figura 6.

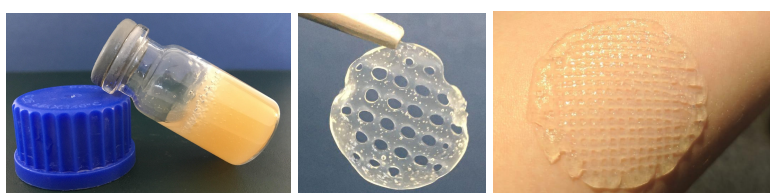


Figura 6. Biogel AG+SF+PRP após reticulação com solução de cloreto de cálcio.

3.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia foi realizada para analisar os grupos funcionais presentes nas amostras. É possível notar bandas características de -OH, devido à alta concentração de água do biogel. Não houve o aparecimento de bandas diferentes após a associação dos compostos e reticulação, indicando que não houve modificações químicas do biogel, caracterizando um processo de reticulação físico (Figura 7).

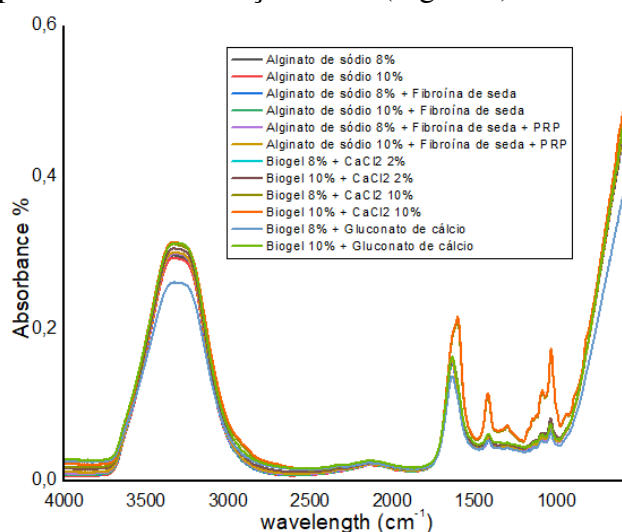


Figura 7. Análise de Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.

3.4. Estereomicroscopia

As amostras resultantes do biogel composto pela associação de PRP, alginato de sódio 8% e fibroína de seda foram obtidas utilizando-se os mesmos parâmetros de impressão 3D (tamanho dos poros = 0,98 mm² e preenchimento retilíneo), entretanto, apresentaram diferentes valores de área média dos poros. Tal discrepância é decorrente das diferentes soluções reticulantes nas quais as amostras foram submetidas: cloreto de cálcio 2%, cloreto de cálcio 10% e gluconato de cálcio 10% (Figura 8). Sendo que, o biogel reticulado com cloreto de cálcio 10% apresentou menor definição dos poros (Área média dos poros = 0,214 mm²), comparado aos outros grupos analisados.

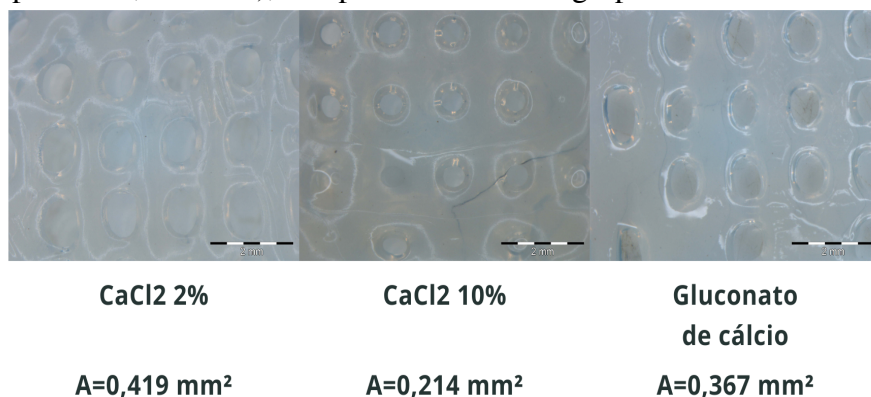


Figura 8. Biogel resultante da associação do PRP, alginato de sódio 8% e fibroína de seda reticulado com cloreto de cálcio 2%, cloreto de cálcio 10% e gluconato de cálcio 10%, respectivamente.

As amostras do biogel resultante da associação de PRP, alginato de sódio 10% e fibroína de seda também apresentaram perda de definição, comparado ao parâmetro de impressão. Entretanto, deve-se destacar a preservação da característica retangular presente nos poros das amostras reticuladas com gluconato de cálcio 10% (Área dos poros = 0,686 mm²). Não foi possível observar tal característica nos outros grupos (Figura 9).

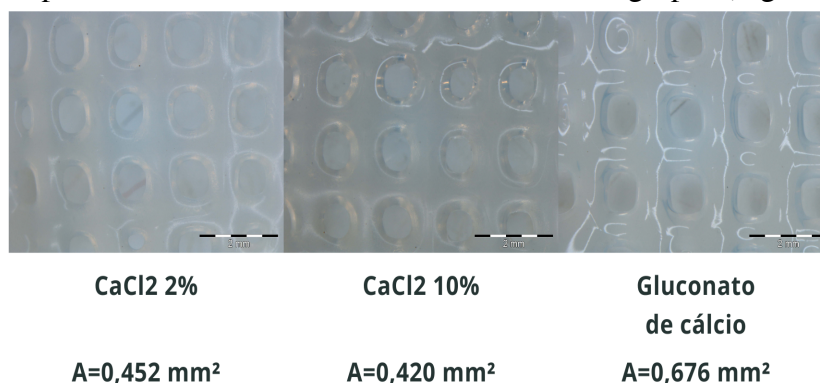


Figura 9. Biogel resultante da associação do PRP, alginato de sódio 10% e fibroína de seda reticulado com cloreto de cálcio 2%, cloreto de cálcio 10% e gluconato de cálcio 10%, respectivamente.

Tabela 1 - Análise estatística da área dos poros e resolução das amostras.

Amostra	Área média dos poros (mm ²)	Resolução
Biogel alginato 8% + CaCl ₂ 2%	0,419	42,78%
Biogel alginato 8% + CaCl ₂ 10%	0,214	21,87%
Biogel alginato 8% + Gluconato de cálcio	0,367	37,43%
Biogel alginato 10% + CaCl ₂ 2%	0,452	46,08%
Biogel alginato 10% + CaCl ₂ 10%	0,420	42,84%
Biogel alginato 10% + Gluconato de cálcio	0,676	68,98%

Considerando que, o tamanho do poro adotado nos parâmetros de impressão foi de 0,98 mm², é possível afirmar que, quanto maior a área média dos poros da amostra, maior o comportamento de auto-sustentação do biomaterial após a impressão, bem como o potencial da solução reticulante de preservar a morfologia inicial da estrutura tridimensional. Portanto, a amostra que apresentou melhor fidelidade ao desenho digital e aos parâmetros de impressão foi o Biogel alginato 10% reticulado com gluconato de cálcio 10%, com 68,98% de resolução (Tabela 1).

3.6. Ensaio de dissolução

As amostras com 8% e 10% de alginato foram analisadas após 60 minutos de ensaio e apresentaram diferentes atividades de dissolução conforme a solução reticulante (Figura 10). Foi possível visualizar que, as amostras reticuladas com cloreto de cálcio 2% apresentaram maior dissolução comparada à outras amostras.

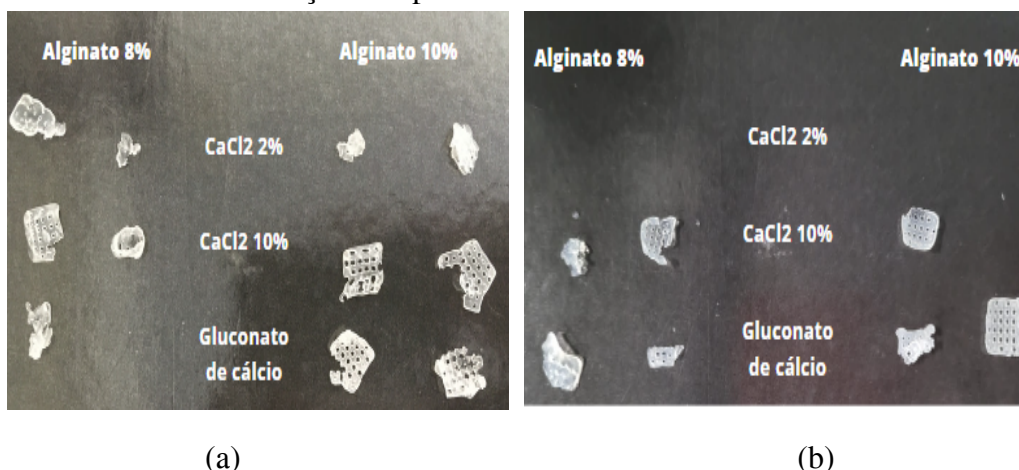


Figura 10. Ensaio de dissolução após (a) 60 minutos e (b) 120 minutos.

Após 120 minutos as amostras foram analisadas, apresentando maior atividade de dissolução, comparado ao resultado de 60 minutos. Todas as amostras reticuladas com cloreto de cálcio a 2% foram totalmente dissolvidas durante o ensaio, enquanto as amostras de biogel com alginato a 10% e reticulados com gluconato de cálcio demonstraram menor grau de dissolução, portanto, tendo a reticulação mais efetiva.

5. Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que, utilizando a metodologia apresentada de obtenção da fibroína de seda, associando-se ao plasma rico em plaquetas e ao alginato de sódio a 10% e reticulado com gluconato de cálcio a 10%, é possível formular um biogel que apresenta características exequíveis e reproduzíveis para impressão 3D por extrusão. Ademais, os resultados abrem grandes perspectivas para novas abordagens terapêuticas no tratamento de feridas de difícil cicatrização. São, no entanto, imprescindíveis estudos adicionais de caracterização e citotoxicidade do biogel, a fim de viabilizar uma possível translação deste bioprocesso para terapia em pacientes humanos, sobretudo em pacientes com úlceras cutâneas de difícil cicatrização.

6. Referências

- Araujo, L. C. P.; Oliveira Junior, J. M.; Aranha, N. (2018) “Síntese e caracterização de scaffolds de fibroína.” Rev. Matéria (Rio J.). 23 (4): 12212, Brazil.
- Bellini, M.Z., Pires, A.L.R., Vasconcelos, M.O., Moraes, A.M. (2012) “Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions.” Special Issue: Biopolymers and Renewably Sourced Polymers, 125: 421-431.

Bratskaya, S., Skatova, A., Privar, Y., Boroda, A., Kantemirova, E., Maiorova, M., and Pestov, A. (2021) “Stimuli-responsive dual cross-linked n-carboxyethylchitosan hydrogels with tunable dissolution rate.” *Gels*, 7.

Debari, M. K. et al. (2020) “3D printing with silk: considerations and applications.” *Connective Tissue Research*, 61 (2): 163-173.

Dieckmann, C., Renner, R., Milkova, L., Simon, JC. (2021) “Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond.” *Experimental Dermatology*, 19 (8): 697–706.

Fisher M.B., Mauck R.L. (2013) “Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation.” *Tissue Eng Part B Rev*, 19:1, 1-13.

Franco, D. et al. (2012) “Protocol for Obtaining Platelet- Rich Plasma (PRP), platelet-Poor Plasma (PPP), and Thrombin for Autologous Use.” *Aesth last Surg*, 36: 1254-1259.

Hernandez, E. D. D., & Reyes-Romero, J. R. (2019) “Characteristics of polymeric materials used in medicine.” In *Materials for Biomedical Engineering*, 479-506, Elsevier.

Kopp A., et al. (2019) “Production and characterization of porous fibroin scaffolds for regenerative medical application.” *In Vivo*, 33: 757–762.

Kwok Sch, Wang J, Chu Pk. (2015) “Surface energy, wettability, and blood compatibility phosphorus doped diamond-like carbon films.” *Diamond & Related Material*, 14 (1), 78–85.

Li, Z. et al. (2020) “Addition of Platelet-Rich Plasma to Silk Fibroin Hydrogel Bioprinting for Cartilage Regeneration.” *Tissue Engineering*, parte A.

Lu B, et al. (2016) “Healing of skin wounds with a chitosan–gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma.” *International Journal of Biological Macromolecules*, 82: 884–891.

Marques, L.F. et al. (2014) “Platelet-rich plasma (PRP): methodological aspects and clinical applications.” *Platelets*, 26 (2): 101-113.

Mir, M., Ali, M.N., Barakullah, A. et al. (2018) “Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review.” *Prog Biomater*, 7: 1–21.

Stessuk, T. et al (2016) “Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro.” *Archives of Dermatological Research*, 308 (7): 511-520.

Stessuk, T. et al (2020) “A topical cell therapy approach for diabetic chronic ulcers: Effects of mesenchymal stromal cells associated with platelet-rich plasma.” [published online ahead of print, 2020 Feb 14]. *J Cosmet Dermatol*, 10.1111, jocd.

Williams, DF. (2009) “Sobre a natureza dos biomateriais.” *Biomaterials*, 30: 5897-5909;

Zhang, H., Cheng, J., & Ao, Q. (2021). "Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine." *Marine Drugs*, 19.