

Desenvolvimento e avaliação da reticulação externa de géis inteligentes à base de alginato/gelatina/PNIPAm

Camila Laura DA Silva Albuquerque^{1,2}, Kaline do Nascimento Ferreira¹, Juliana Kelmy Macario Barboza Daguano¹, Jorge Vicente Lopes da Silva¹

clsalbuquerque@cti.gov.br, kaline.ferreira@cti.gov.br,
juliana.daguano@cti.gov.br, jvlsilva@cti.gov.br

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

²Faculdade de Tecnologia de Campinas FATEC– Campinas/SP

Abstract. In the domain of 3D bioprinting for tissue engineering, hydrogels are employed as bioinks, with a focus on the fabrication of scaffolds that emulate the cellular microenvironment. The present study investigates the incorporation of a smart polymer, namely PNIPAm, into hydrogels. This incorporation is analysed in terms of its behaviour and the crosslinking of hydrogels with Sr^{2+} ions. The objective is to evaluate the mechanical stability and swelling capacity of these materials, with a view to their application in bioprinting. The methodology comprised the preparation of different hydrogel formulations, swelling tests and 3D prints to evaluate the printing conditions of the materials. The research demonstrated that external crosslinking in combination with internal crosslinking with CaCo yielded favourable results in terms of swelling. In printing, hydrogels with a higher percentage of gelatine proved to be superior, while the percentage of PNIPAM showed the same intelligent character.

Keywords: Hydrogels, PNIPAm, External crosslinking, 3D printing.

Resumo Hidrogéis são usados como biotintas para bioimpressão 3D na engenharia de tecidos, focando na criação de scaffolds que possam mimetizar o microambiente celular. A pesquisa explora a inserção de um polímero inteligente (PNIPAm) em hidrogéis, analisando seu comportamento e a reticulação de hidrogéis com íons Sr^{2+} para avaliar a estabilidade mecânica e a capacidade de inchaço desses materiais, para a aplicação na bioimpressão. A metodologia envolveu a preparação de diferentes formulações de hidrogéis, testes de inchaço e impressões 3D para avaliar as condições de impressão dos materiais. A pesquisa demonstrou que a reticulação externa em combinação com a reticulação interna com CaCo teve um bom resultado em relação a seu intumescimento, na impressão, os hidrogéis com maior % de gelatina se mostraram melhores para a impressão, já em relação a % do PNIPAM, as concentrações demonstram o mesmo caráter inteligente.

Palavras-chave: Hidrogéis, PNIPAm, Reticulação externa, impressão 3D.

1. Introdução

A engenharia de tecidos é uma área que reúne informações e técnicas para a reconstrução de novos tecidos e órgãos. Nesse âmbito, a bioimpressão 3D, que relaciona a deposição de células, biomaterias e fatores de crescimento camada por camada, a fim de produzir órgãos e tecidos biossimilares e biocompatíveis, tem o princípio de retornar o processo natural da construção de tecido por células, obtendo scaffolds sintéticos capazes de se assemelhar ao microambiente natural do tecido. Com as técnicas atuais, pode ser feita a bioimpressão 3D utilizando biotintas, que na grande maioria são hidrogéis, composições compostas por moléculas hidrofilicas com o potencial para encapsular células, podendo ser modificados e mimetizarem o microambiente celular (BARBANTI, S. H., et al., 2005), (TREVIZAN, Lucas Noboru Fatori et al., 2022).

O alginato de sódio (SA) é um dos materiais usados para formulações de biotintas (TREVIZAN, Lucas Noboru Fatori et al., 2022), extraído de algas marinhas marrons, age como componente estrutural nas células. Podendo fornecer rigidez e flexibilidade na parede celular (GARCIA-CRUZ, C. H., 2008), por conta da sua rápida gelificação iônica com íons divalentes, porém, sozinho o SA não fornece uma adesão celular eficiente, devido uma fraca interação célula-material, além de sua degradação não controlável, essas limitações podem ser recompensadas com a inserção da gelatina e através da reticulação do SA (PRESTES, Rosa Cristina et al., 2013).

A reticulação externa nos hidrogéis à base de SA é uma técnica em que as interações químicas ou físicas são realizadas na superfície externa do hidrogel. Isso é frequentemente utilizado para formar hidrogéis com uma camada externa distinta, oferecendo benefícios como o controle da liberação de medicamentos ou a melhoria das propriedades mecânicas. Uma reticulação comum é a reticulação iônica, com íons divalentes, frequentemente o cálcio (Ca^{+2}), usado para reticular cadeias de SA, criando uma rede que resulta numa estrutura mais rígida e estável, como pode ser visto na Figura 1 (Junyan Tan, et al., 2023).

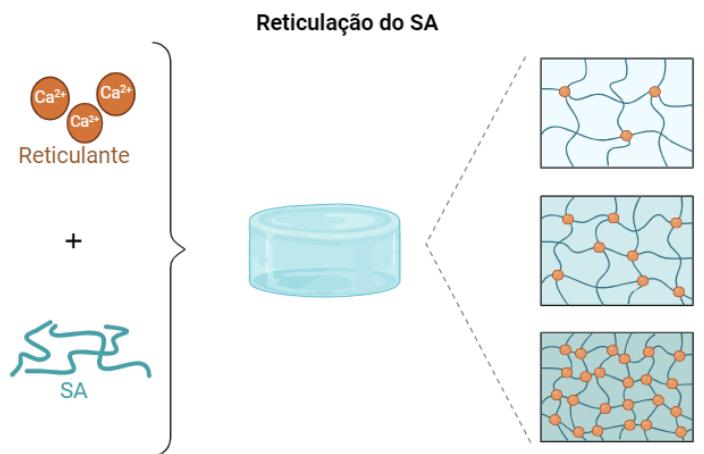


Figura 1 Reticulação do SA

O intumescimento pode ajudar na conceção de *scaffolds*, uma vez que eles necessitam preservar a sua forma e estabilidade mecânica durante um período prolongado, onde as células podem sintetizar uma quantidade suficiente de componentes da matriz extracelular, o que pode melhorar o processo de regeneração (BAJPAI, S. K., 2004). Controlando esse transporte de solutos entrando e saindo, ajuda a fornecer nutrientes e oxigênio para o interior. Assim o hidrogel proporciona um ambiente biologicamente ativo para as células (MENDOZA GARCÍA, M.; IZADIFAR, M.; CHEN, X, 2017).

Outra adição para o melhoramento de hidrogéis são os polímeros inteligentes, que são capazes de responder a estímulos, como a temperatura, pH, humidade, campos elétricos e magnéticos, podendo alterar suas propriedades físicas ou químicas, mudando de cor, estrutura ou até sua solubilidade em água. São polímeros únicos, já que conseguem rápidas mudanças reversíveis, como é o caso dos polímeros que ao serem estimulados através da temperatura são chamados de termossensíveis, que é o caso da gelatina. O corpo humano é um ambiente que ocorre muitas variações térmicas naturalmente, por esse motivo esses tipos de polímeros têm muita potencialidade para serem aplicados na biomédica (CASTRO, Patrícia Tavares de, 2013; Holton, M. and Alexander, S., 1995), (SARKER, Bapi et al., 2014).

Desta forma, o intuito deste artigo é analisar a desenvoltura dos géis no intumescimento dos mesmos e inserir um polímero inteligente, PNIPAM, averiguando a melhor formulação com base na impressão 3D.

2. Objetivo

O objetivo da pesquisa é desenvolver e avaliar a reticulação externa com Sr^{+2} de géis a base de alginato e gelatina reticulado internamente e inserir no mesmo gel um polímero inteligente, PNIPAM.

3. Metodologia

3.1. Método de preparo dos hidrogéis para reticulação externa

Com o objetivo de concluir os ensaios e avaliação do PIBIC de vigência 2023-2034, preparamos novamente três composições de hidrogéis com diferentes misturas cátions 0.16 M na proporção 1:1 (Ca^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2}), que podem ser vistos na Tabela 1, por etapas, cada um com 10 mL no total, Tendo como base SA à 4% (m/v).

Tabela 1. Formulações dos hidrogéis para reticulação externa.

Componentes	SA+CaCo	SA+CaZn	SA+ZnCo
SA	0,4 g	0,4 g	0,4 g
Água deionizada	9mL	9mL	9mL
Ions (Ca/Co/Zn)	$0,5\text{Ca}^{+2} + 0,5\text{Co}^{+2}\text{mL}$	$0,5\text{Ca}^{+2} + 0,5\text{Zn}^{+2}\text{mL}$	$0,5\text{Zn}^{+2} + 0,5\text{Co}^{+2}\text{mL}$

De início, foi pesado 0,4 g de SA e adicionado 8 mL de água deionizada e foi dissolvido por 6 horas em temperatura ambiente, misturou-se num Mini agitador mecânico eletrônico obtido da Sinergia Científica, assim que o gel ficou homogêneo, foi adicionado 1 mL da solução de reticulante com a mistura de íons e novamente foi agitado no Mini agitador Mecânico Eletrônico. A solução de reticulação foi preparada na proporção 1:1 dos diferentes cátions.

3.2. Liofilização

Para a realização das análises, os géis foram liofilizados, após a obtenção do mesmo, foram colocados em eppendorfs e congelados em nitrogênio líquido e depois colocado no liofilizador (LABCONCO) por 24 h, conforme pode ser visto na Figura 2.

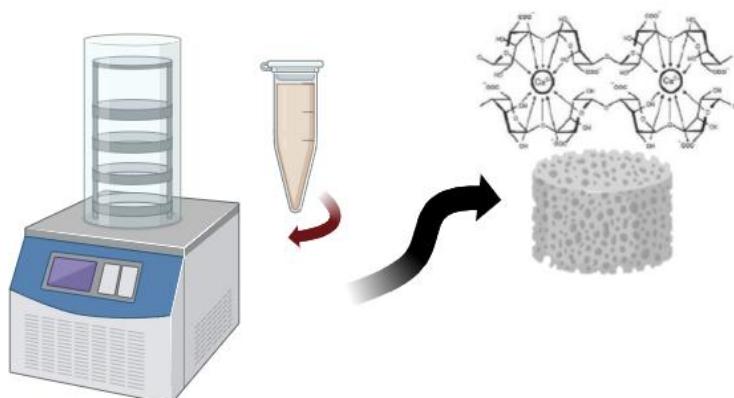


Figura 2. Liofilização dos géis.

3.3. Teste de intumescimento

A cinética de intumescimento dos scaffolds pré-reticulados internamente com os íons divalente e reticulados externamente com Sr^{+2} foi realizada por meio do método gravimétrico (Vajda, Jernej te al.,2023). Com amostras em formato de cilíndricos, foram reticulados com uma solução de 5% de SrCl_2 por 15 min para garantir reticulação completa. Após a reticulação, todas as amostras foram liofilizadas e pesadas (peso inicial, m_0). As estruturas secas foram imersas em meio de cultura modificado por Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Ref D0025) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e incubadas em um Shaker da New Brunswick Scientific modelo Excella E24 Incubator (Nova Jersey, EUA) a 37° C. As respectivas amostras foram removidas do meio de cultura celular em intervalos de dias, sendo dia 0, 2, 4, 6 e 14. O excesso de líquido foi removido com papel de filtro limpo, seguindo pela pesagem. A taxa de inchaço no tempo t foi calculada usando a Eq. (1):

$$\text{Proporção de inchaço\%} = \frac{m_t - m_0}{m_t} \quad \text{Equação 1}$$

onde m_0 e m_t , são pesos do liofilizado e do material intumescido nos respectivos intervalos de tempo fixos t . Todos os experimentos foram obtidos de amostras em triplicata, e o resultado é relatado e plotado como a média com o desvio padrão.

3.4. Método de preparo dos hidrogéis com PNIPAM

Para cada formulação (Tabela 2), foi pesado 0,4 g de SA e adicionado 6,44 mL de água deionizada e foi dissolvido por 6 horas em temperatura ambiente.

Tabela 2 Formulação dos hidrogéis com PNIPAM

Componentes	PNIPAM 1,5% + Gel 1%	PNIPAM 0,5% +Gel 1%	PNIPAM 1% +Gel 1%	PNIPAM 1% +Gel 0,5%	PNIPAM 1% +Gel 1,5%
SA	0,4g	0,4g	0,4g	0,4g	0,4g
Ions	$0,5\text{Ca}^{+2} + 0,063\text{Co}^{+2}\text{mL}$				
Gelatina	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,05 g	0,15 g
PNIPAM	0,15 g	0,05 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g

Assim que o gel ficou homogêneo misturou-se num mini agitador mecânico obtido da Sinergia Científica, foi adicionado à solução de reticulante de Ca^{2+} e Co^{2+} e novamente foi agitado no Mini agitador Mecânico Eletrônico, como pode ser visto na Figura 3. Em seguida foi preparada a solução de gelatina e PNIPAM com 3 mL de água deionizada, aquecida e homogeneizada em um agitador magnético a 35°C por 10 min.

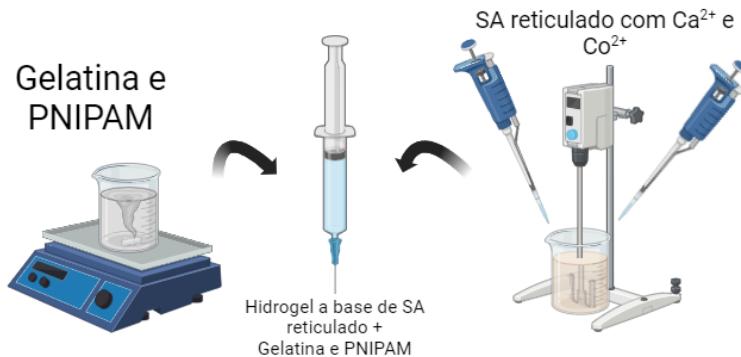


Figura 3 Preparo dos hidrogéis com PNIPAM

3.5. Impressão 3D

Para verificar a extrudabilidade dos hidrogéis, foi utilizado a impressora 3D (Figura 4), baseada no sistema de extrusão, 593iCAN LTDA (São Paulo, Brasil), com o código G gerado no software BioSacaffoldsPG, com scaffolds de 12 mm aproximadamente, cada com 7 filamentos, utilizando bicos cônicos de 580 μm de diâmetro interno e a velocidade da impressão de 10 mms^{-1} . Os géis foram colocados em seringas de 10 mL.

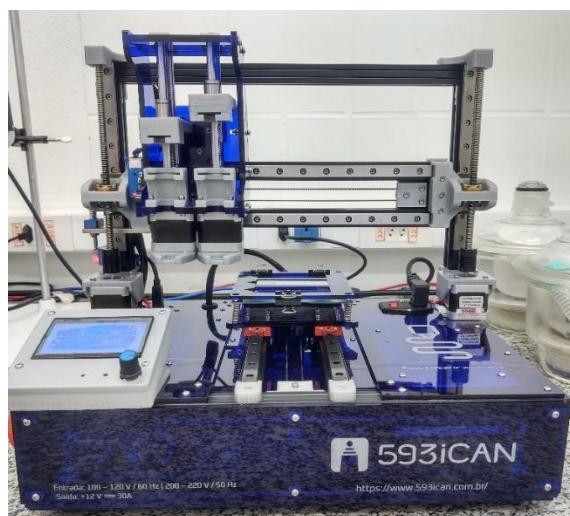


Figura 4. Impressora 3D 593iCAN.

3.6. Avaliação do comportamento termossensível dos Géis contendo PNIPAm

Para investigar o comportamento termossensível dos hidrogéis contendo PNIPAm, foram preparadas três formulações com concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% do polímero, conforme exposto na tabela 2, todos os géis com 1% de gelatina. Os hidrogéis foram aplicados sobre lâminas de vidro e expostos a temperaturas abaixo e acima da Temperatura Crítica Inferior de Solução (LCST, *Lower Critical Solution Temperature*) do PNIPAM, que é de aproximadamente 37°C.

A análise foi realizada por meio de observações visuais, com registro fotográfico, a fim de identificar mudanças instantâneas na aparência, especialmente variações de cor, indicativas da transição de fase do hidrogel em resposta às diferentes temperaturas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Teste de intumescimento

A proporção de inchaço dos hidrogéis está apresentada na Figura 5, no qual o hidrogel de SA demonstra a maior porcentagem de inchaço. Isso destaca a vantagem da ausência de reticulação interna, permitindo maior facilidade de penetração e umedecimento pela água. A reticulação interna, quando presente, diminui essa capacidade de inchaço, pois as cadeias poliméricas estão mais restritas.

Quanto à reticulação externa, o inchaço dos hidrogéis ocorre devido à troca iônica entre os íons presentes na solução de PBS e os íons Sr^{2+} ligados aos grupos carboxilato (COO^-). Esse processo provoca o relaxamento das cadeias poliméricas e aumenta o inchaço do gel, em função da maior repulsão eletrostática entre os grupos COO^- carregados negativamente. Inicialmente, há uma troca entre os íons Sr^{2+} e Na^+ , o que permite a expansão do hidrogel à medida que este absorve mais água [10].

Conforme observado no gráfico, o hidrogel com maior proporção de inchaço foi o SAGel-ZnCo, uma vez que os íons de zinco (Zn^{2+}) e cobalto (Co^{2+}) apresentam menor eficácia na reticulação comparados ao cálcio (Ca^{2+}), devido ao menor tamanho de suas moléculas. Isso facilita o desprendimento das cadeias poliméricas, aumentando a capacidade de inchaço do material. Em seguida, os hidrogéis SAGel-CaCo e SAGel-CaZn também apresentaram

inchaços significativos, beneficiados pela presença de cálcio, que contribui para uma reticulação interna mais eficiente.

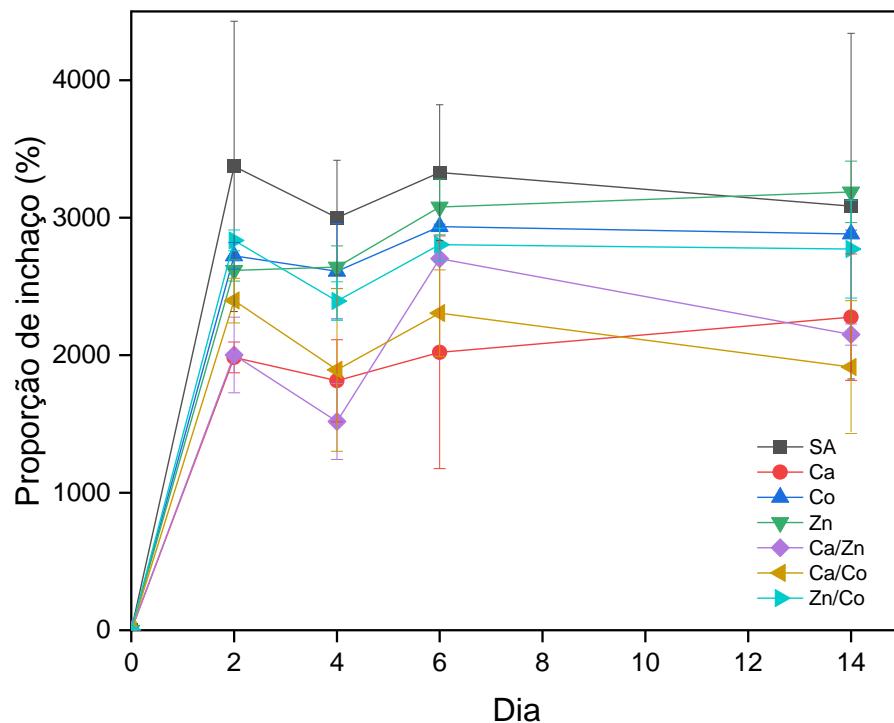


Figura 5. Proporção de inchaço dos hidrogéis de Alginato (SA) e o SA reticulados com os íons de cálcio, cobalto e zinco e os hidrogéis SA-Ca/Zn, SA-Ca/Co e SA-Zn/Co ao decorrer de 14 dias.

4.2. Impressão 3D dos scaffolds

A análise das impressões realizadas mostrou que o hidrogel composto por 1% de PNIPAM+1,5% de gelatina apresentou uma boa fidelidade de forma, resultando em um gel mais viscoso, como pode ser observado na Figura 5 (e). À medida que a porcentagem de gelatina aumenta, o desempenho do gel melhora, como evidenciado na Figura 5, onde filamentos bem estruturados e poros visíveis são claramente observados.

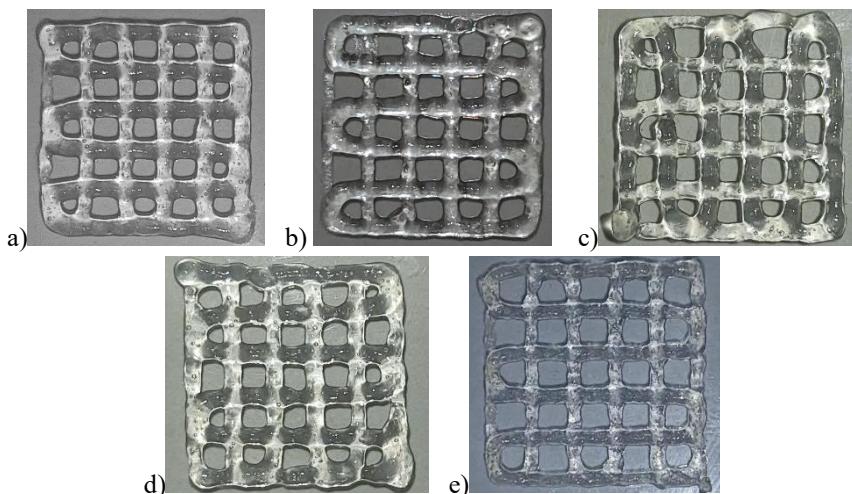


Figura 6, Scaffolds dos géis, a) Alg-PNIPAM 1,5%/Gel 1%, b) Alg-PNIPAM 1%/Gel 1%, c) Alg-PNIPAM 0,5%/Gel 1%, d) Alg-PNIPAM 1%/Gel 0,5% e e) Alg-PNIPAM 1%/Gel 1,5%

4.3. Comportamento termossensível dos Géis contendo PNIPAm

O comportamento termo-sensível do PNIPAm está relacionado à sua transição de fase em resposta à temperatura. Esse polímero apresenta uma temperatura crítica inferior de solução (LCST, *Lower Critical Solution Temperature*), que para o PNIPAm ocorre em torno de 32°C. Quando a temperatura está abaixo de sua LCST, como por exemplo, a 37 °C, o PNIPAm sofre uma transição de comportamento. Abaixo dessa temperatura, o PNIPAm é hidrofilico e se encontra solubilizado em água, com suas cadeias poliméricas expandidas e interagindo com moléculas de água, o que podemos identificar bem na Figura 6 a, ao qual o gel permanece translúcido.

Entretanto, quando a temperatura excede a LCST (como a 37°C), ocorre uma mudança conformacional: o PNIPAm torna-se hidrofóbico, suas cadeias poliméricas colapsam e expulsam a água, resultando na formação de agregados ou precipitação do material. Esse fenômeno de colapso faz com que o material mude suas propriedades físicas, como viscosidade e solubilidade, o que podemos identificar na Figura 6 b, ao qual o gel torna-se mais opaco. Esse comportamento termosensível do gel pode ser bastante explorado em aplicações de liberação controlada de fármacos e engenharia de tecidos, onde o PNIPAm pode ser projetado para responder a mudanças de temperatura fisiológica.

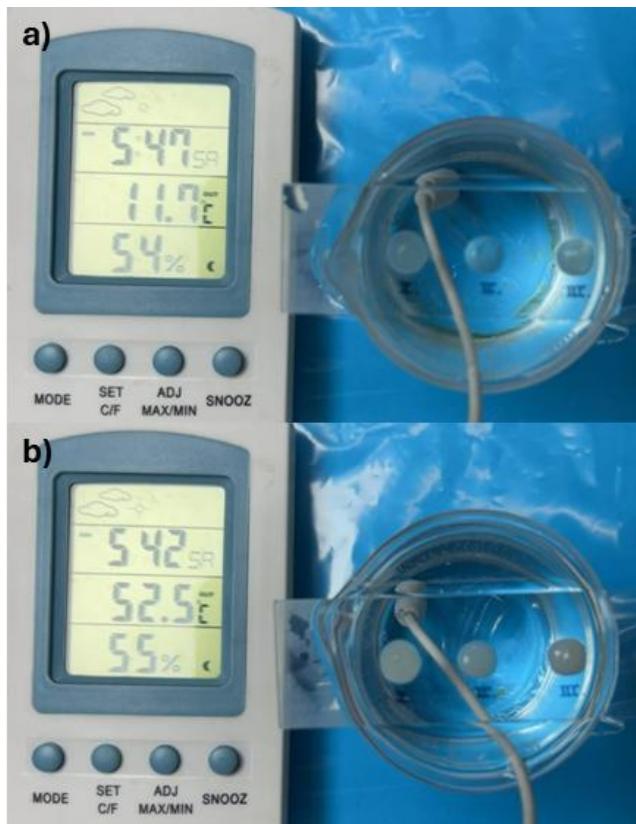


Figura 7, Comportamento termossensível dos géis, a) abaixo da temperatura crítica inferior de solução e b) acima da temperatura crítica inferior de solução: I- SA-PNIPAm 0,5%/Gel 1%, II- SA-PNIPAm 1%/Gel 1% e III- SA-PNIPAm 1,5%/Gel 1%.

5. Conclusão

A pesquisa demonstrou que a reticulação com íons Sr^{2+} , em conjunto com a adição de PNIPAm, melhora significativamente a estabilidade mecânica e a capacidade de inchaço dos hidrogéis. As formulações SA-CaZn e SA-CaCo se destacaram como as mais promissoras. Também foi observado que a substituição de íons altera a interação do hidrogel em solução, e que a variação na concentração de gelatina e PNIPAm pode aprimorar a fidelidade das biotintas durante o processo de impressão 3D.

Além disso, confirmamos que a inserção de PNIPAm em todas as concentrações avaliadas conferiu um comportamento termossensível aos géis, permitindo sua resposta a mudanças de temperatura. Esses hidrogéis mostraram grande potencial para serem utilizados como biotintas,

especialmente em aplicações futuras de engenharia de tecidos, onde a preservação da forma e a estabilidade mecânica dos scaffolds são essenciais para o sucesso da regeneração tecidual.

6. Referências

- BAJPAI, S. K.; SHARMA, S.** Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions. *Reactive and Functional Polymers*, v. 59, n. 2, p. 129–140, maio 2004.
- BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R.** Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, p. 13–21, 2005.
- CASTRO, Patrícia Tavares de.** Polímeros Inteligentes: Relação entre Reologia e Nanoestrutura. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, E Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.
- GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. DA.** Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. *Química Nova*, v. 31, p. 1800–1806, 2008.
- Junyan Tan, Yuning Luo, Yuqiong Guo, Yue Zhou, Xinying Liao, Dingxilei Li, Xinyi Lai, Yang Liu.** Development of alginate-based hydrogels: Crosslinking strategies and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 239, 2023, 124275. ISSN 0141-8130. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124275>.
- MENDOZA GARCÍA, M.; IZADIFAR, M.; CHEN, X.** Evaluation of PBS Treatment and PEI Coating Effects on Surface Morphology and Cellular Response of 3D-Printed Alginate Scaffolds. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 8, n. 4, p. 48, 1 nov. 2017.
- PRESTES, Rosa Cristina et al.** Caracterização da fibra de colágeno, gelatina e colágeno hidrolisado. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 15, n. 4, p. 375-382, jan. 2013. Campina Grande.
- SARKER, Bapi et al.** Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, n. 11, p. 1470, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). doi:10.1039/c3tb21509a.
- TREVIZAN, Lucas Noboru Fatori et al.** Prospecção tecnológica: polímeros aplicados ao desenvolvimento de biotintas para bioimpressão 3D / technological prospection. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 5, p. 42163-42181, 30 maio 2022. South Florida Publishing LLC. doi:10.34117/bjdv8n5-612.
- Vajda, Jernej; Boštjan Vihar; Laura Činč Ćurić; Uroš Maver; Matej Vesenjak; Polona Dobnik Dubrovski; Marko Milojević.** Polysaccharide hydrogels in tissue engineering.

XXVI Jornada de Iniciação Científica do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer - JICC'2024
PIBIC/CNPq/CTI agosto de 2024 – Campinas – São Paulo

Journal of Materials Research and Technology, v. 23, 2023, p. 1805-1820. ISSN 2238-7854.
<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.01.149>.