

Avaliação do caráter Inteligente de tintas reticuladas com diferentes cátions para bioimpressão

Camilly 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.** Bioinks are hydrogels loaded with cells, with properties that can be modified to mimic the cellular microenvironment. For the formulation of the bioink, a commonly used material is alginate, which undergoes rapid ionic gelation with divalent ions. When combined with gelatin, it can enhance cell adhesion and proliferation. If these bioinks emit a response through stimuli, they can be termed smart materials. The present study is based on developing formulations of alginate gels crosslinked with divalent ions and gelatin. Through FTIR, the interaction of the materials constituting the hydrogel was observed, and according to UV-vis, the smart behavior of the hydrogels was confirmed.*

***Resumo.** Biotintas são hidrogéis carregados com células, com propriedades que podem ser modificadas para mimetizarem o microambiente celular. Para a formulação da biotinta, um material muito utilizado é o alginato, que tem rápida gelificação iônica com íons divalentes e em conjunto com a gelatina, podem melhorar a adesão e a proliferação celular. E se através de estímulos, essas biotintas emitirem alguma resposta, pode-se denominar um material inteligente. O presente estudo se baseia em desenvolver formulações de géis de alginato reticulados com íons divalentes e a gelatina. Através do FTIR foi possível observar a interação dos materiais que constituem o hidrogel e de acordo com o UV-vis, foi possível comprovar o comportamento inteligente dos hidrogéis.*

1. Introdução

A bioimpressão 3D está relacionada com a deposição hidrogéis carregados com células, biomoléculas e fatores de crescimento camada por camada, com o intuito de reproduzir tecidos e órgão bioassimilares e biocompatíveis. Para isso utiliza-se biotintas (hidrogéis carregados com células), tornando atraente seu uso, pois tem propriedades que podem ser modificadas e capazes de mimetizarem o microambiente celular [1], [2].

Um dos materiais usados para formulações de biotintas é o alginato (Alg) [1], por conta da sua rápida gelificação iônica com íons divalentes, porém, o seu uso isolado não fornece uma adesão celular eficiente, por apresentar uma fraca interação célula-material, além, de uma degradação não controlável. Tais limitações podem ser recompensadas com a inserção da gelatina (Gel) e com a reticulação do Alg com cátions divalentes [3].

Gel é um polímero natural, de baixo custo, similar a matriz extracelular e possui um caráter termorresponsivo, com a capacidade de garantir a preservação das células viáveis em meio de estruturas estáveis em menores temperaturas. Portanto a sua adição em hidrogéis podem proporcionar a facilitação, a propagação, a adesão e a proliferação celular, além de proporcionarem a regeneração de novos tecidos ou órgãos [4], [5].

Polímeros inteligentes, 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 são estimulados através da temperatura, esses materiais são chamados de termossensíveis. 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 [6], [7].

Desta forma, o intuito desta pesquisa é analisar o caráter inteligente promovido pela Gel as tintas de Alg reticuladas com diferentes íons (cálcio (Ca^{2+}), cobalto (Co^{2+}) e zinco (Zn^{2+})), por meio de análises de espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) para

verificar o seu comportamento termorresponsivo em diferentes temperaturas e avaliar a interação da Gel e da reticulação com a mistura de íons por meio do espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

2. Objetivos

2.1 Objetivo principal

O objetivo da pesquisa é desenvolver géis a base de Alg/Gel reticulado com íons divalentes.

2.2. Objetivo secundário

- Determinar as interações da Gel e dos íons divalentes (Ca^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+}) com o Alg através do FTIR.
- Avaliar se a Gel conferiu aos hidrogéis o comportamento termorresponsivo por meio do UV-Vis.

3. Metodologia

Método de preparo dos géis

Foram preparadas três composições de hidrogéis com diferentes misturas de cátions 0.16 M , na proporção 1:1. Cada hidrogél com 10 mL no total, sendo composto por Alg à 4% (m/v) e a Gel à 10% (m/v).

Tabela 1. Formulações dos hidrogéis.

Componentes	AlgGel-CaCo	AlgGel-CaZn	AlgGel-ZnCo
Alginato	0,4 g	0,4 g	0,4 g
Água deionizada	8 mL	8 mL	8 mL
Gelatina 10% (m/v)	1ml	1ml	1ml
Íons (Ca ²⁺ , Co ²⁺ e Zn ²⁺)	0,5 mL Ca ²⁺ 0,5 mL Co ²⁺	0,5 mL Ca ²⁺ 0,5 mL Zn ²⁺	0,5 mL Co ²⁺ 0,5 mL Zn ²⁺

De início, foi pesado 0,4 g de Alg, adicionado 8 mL de água deionizada e 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 (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.

Em seguida foi preparada a solução de gelatina, foi pesado 1g de gelatina e solubilizada em 10 mL de água deionizada e agitou-se por 10 minutos a 40 °C, para obter uma solução 10% (m/v). Em seguida foi adicionado ao alginato reticulado, 1mL da solução de gelatina e foi homogeneizada.

Análise dos grupos funcionais

A identificação dos grupos funcionais nas amostras foi realizada utilizando a análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no Perkin Elmer Infrared Spectrometer Spectrum 100. As varreduras do FTIR cobriram uma faixa de número de onda de 400 - 4000 cm⁻¹, e uma média de 16 varreduras registradas com uma resolução espectral de 4 cm⁻¹, usando o modo de refletância total atenuada (ATR). Com o método foi possível a identificação precisa dos grupos funcionais presentes nas amostras.

Determinação do caráter inteligente dos hidrogéis pré-reticulados através de Espectroscopia UV-Vis

Devido à presença de uma fase dispersa de Gel nas formulações dos hidrogéis de Alg, foi necessário determinar se a quantidade do polímero inteligente era suficiente para conferir seu comportamento termossensível. Para isso, as amostras foram analisadas no Duetta-Fluorescence and Absorbance Spectrometer e foram registradas a sua transmitância medida no comprimento de onda 233 nm nas temperaturas 4 °C até 25 °C. Para o controle, foi analisada uma solução de gelatina 1% (m/v).

4. Resultados e Discussão

Análise dos grupos funcionais

Os espectros FTIR da Gel, do Alg e os hidrogéis são apresentados na Figura 1. O alginato apresentou bandas de absorção em 3380, 2930, 1600, 1415 cm^{-1} . As bandas de absorção em 1600 e 1415 cm^{-1} no espectro, atribui-se ao alongamento assimétrico e simétrico e as vibrações do grupo $-\text{COO}$ [8]. O espectro de absorção da gelatina apresentou bandas em 3281, 1631, 1529, 1443, 1230 e 1080 cm^{-1} . A banda em 3281 cm^{-1} caracteriza-se o estiramento O–H, a banda em 1631 cm^{-1} demonstra a vibração do C=O da amida I, apresentou a vibração da amida II no plano C–N e N–H na banda de 1443 cm^{-1} , já na banda em 1230 cm^{-1} apresentou a vibração da amida III e na banda em 1080 cm^{-1} uma deformação axial C–N e uma flexão no grupo N–H [3].

Já os espectros dos hidrogéis, observamos bandas de absorção em 1600 e 1415 cm^{-1} que correspondem as bandas do grupo $-\text{COO}-$ do alginato e da banda amida I referente a gelatina. O alginato tem sua presença perceptível, com interações da gelatina já que as bandas ficaram mais intensas, mostrando que houve uma alteração na formação do gel. Como há uma maior intensidade nas bandas dos géis, que correspondem aos grupos funcionais C=O e N–H, é perceptível a formação de pontes de hidrogênio na gelatina, ainda sobreposta pelo alginato. Essas ligações fortes de hidrogênio acabam deslocando as banda no espectro, devido a densidade dos elétrons e a mudança no sítio de ligações de

hidrogênio, podendo considerar que há somente pontes fortes entre a gelatina e as cadeias de alginato [8], indicando que há uma interação química nos géis entre o alginato e a gelatina.

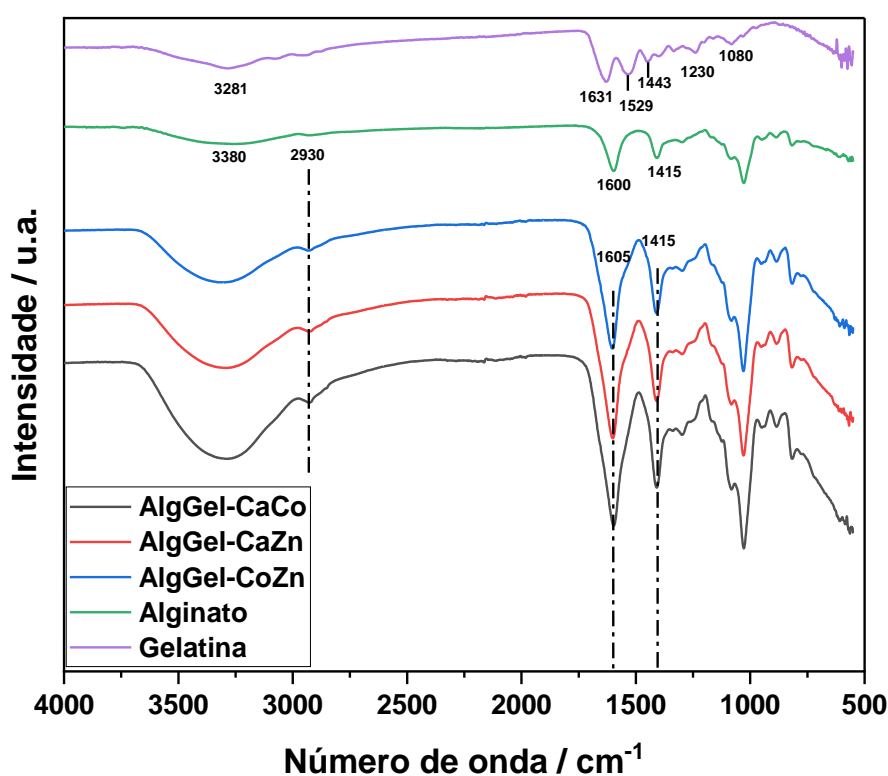


Figura 1. Espectros de alginato, gelatina e dos hidrogéis de Alg/Gel reticulados com íons divalentes.

Determinação do caráter inteligente dos hidrogéis pré-reticulados através de Espectroscopia UV-Vis

A Figura 2 mostra a absorvância do hidrogel a base de alginato e gelatina reticulado com os íons Ca²⁺ e Zn²⁺ em comparação com a absorvância da gelatina. É possível ver o

aumento da absorbância conforme o aumento da temperatura, tanto do hidrogel quanto da gelatina. Quando a temperatura da amostra AlgGel-CaZn está alta, o hidrogel tem uma aparência turva, tendo um comportamento hidrofóbico (polímero-polímero) [9], onde sua absorbância é maior já que a concentração da gelatina é maior, e em baixas temperaturas, o hidrogel tem comportamento hidrofílico (polímero-solvente) [9], onde a gelatina está dispersa e sua concentração é menor, tendo uma absorbância menor. O caráter responsivo só pode ser visto na amostra mostrada na figura, no restante não foi possível constatar o aumento da absorção conforme o aumento da temperatura com as mesmas características vistas no hidrogel AlgGel-CaZn e da gelatina em si.

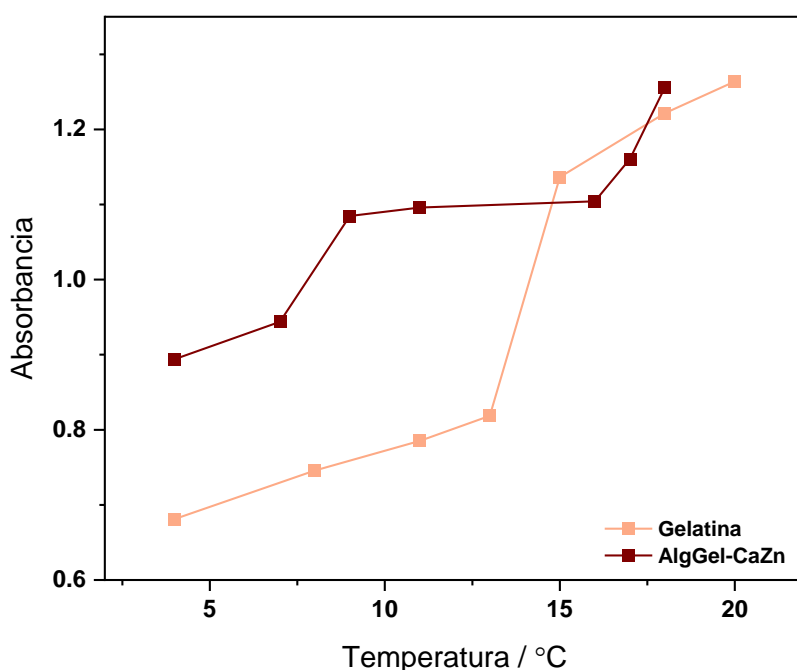


Figura 2. Gráfico da Absorbância versus temperatura do da gelatina e do alginato/gelatina, reticulado com íons Ca^{2+} e Zn^{2+} .

5. Conclusão

Ao realizar a pesquisa, foi possível adquirir maiores conhecimentos sobre a química dos materiais, realizando a reticulação do alginato com íons divalentes, foi observado que o hidrogel com a melhor reticulação foi a amostra que continha a mistura dos íons de cálcio e de cobalto. De acordo com os resultados obtidos por FTIR, foi possível constatar que houve uma interação química entre o alginato e a gelatina.

Através do UV-Vis foi possível constatar o aumento da absorção com o aumento da temperatura, indicando o caráter responsivo quando submetida a variações da temperatura, porém, esse efeito só foi possível observar no hidrogel reticulado com a mistura dos íons de cálcio e zinco, indicando que se faz necessário aprimorar a análise das outras composições de hidrogéis com a mistura de íons cálcio e cobalto e zinco, e assim, constatar qual ou quais composições poderão ser candidatas ou candidatas para a bioimpressão 3D e sua posterior aplicação na engenharia de tecidos e na biomédica.

6. Referências

- [1] TREVIZAN, Lucas Noboru Fatori et al.,” Prospecção tecnológica: polímeros aplicados ao desenvolvimento de biotintas para bioimpressão 3d / technological prospection”. Brazilian Journal Of Development, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 42163-42181, 30 maio 2022. South Florida Publishing LLC.doi: 10.34117/bjdv8n5-612.
- [2] H. Cui, M. Nowicki, J. P. Fisher, and L. G. Zhang, “3D Bioprinting for Organ Regeneration,” Adv Healthc Mater, vol. 6, no. 1, p. 1601118, Jan. 2017, doi: 10.1002/adhm.201601118.

- [3] 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,
- [4] HUANG, Xing et al., “Highly efficient alginate-based macromolecular photoinitiator for crosslinking and toughening gelatin hydrogels”, Journal Of Polymer Science, [S.L.], v. 58, n. 10, p. 1439-1449, 9 abr. 2020, doi:10.1002/pol.20200138
- [5] Y. S. Kim et al., “Evaluation of tissue integration of injectable, cell-laden hydrogels of cocultures of mesenchymal stem cells and articular chondrocytes with an ex vivo cartilage explant model,” Biotechnol Bioeng, vol. 118, no. 8, pp. 2958–2966, Aug. 2021, doi: 10.1002/bit.27804.
- [6] 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. Holton, M. and Alexander, S. (1995) “Soft Cellular Modeling: A Technique for the Simulation of Non-rigid Materials”, Computer Graphics: Developments in Virtual Environments, R. A. Earnshaw and J. A. Vince, England, Academic Press Ltd., p. 449-460.
- [7] 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, [S.L.], v. 2, n. 11, p. 1470, 2014. Royal Society of Chemistry (RSC). doi:10.1039/c3tb21509a.
- [8] Svetlana R. Derkach et al “Interactions between gelatin and sodium alginate” (2019) UV and FTIR studies, Journal of Dispersion Science and Technology, DOI: 10.1080/01932691.2019.1611437
- [9] Montero FE, Rezende RA, da Silva JVL and Sabino MA (2019) Development of a Smart Bioink for Bioprinting Applications. Front. Mech. Eng. 5:56. doi: 10.3389/fmech.2019.00056