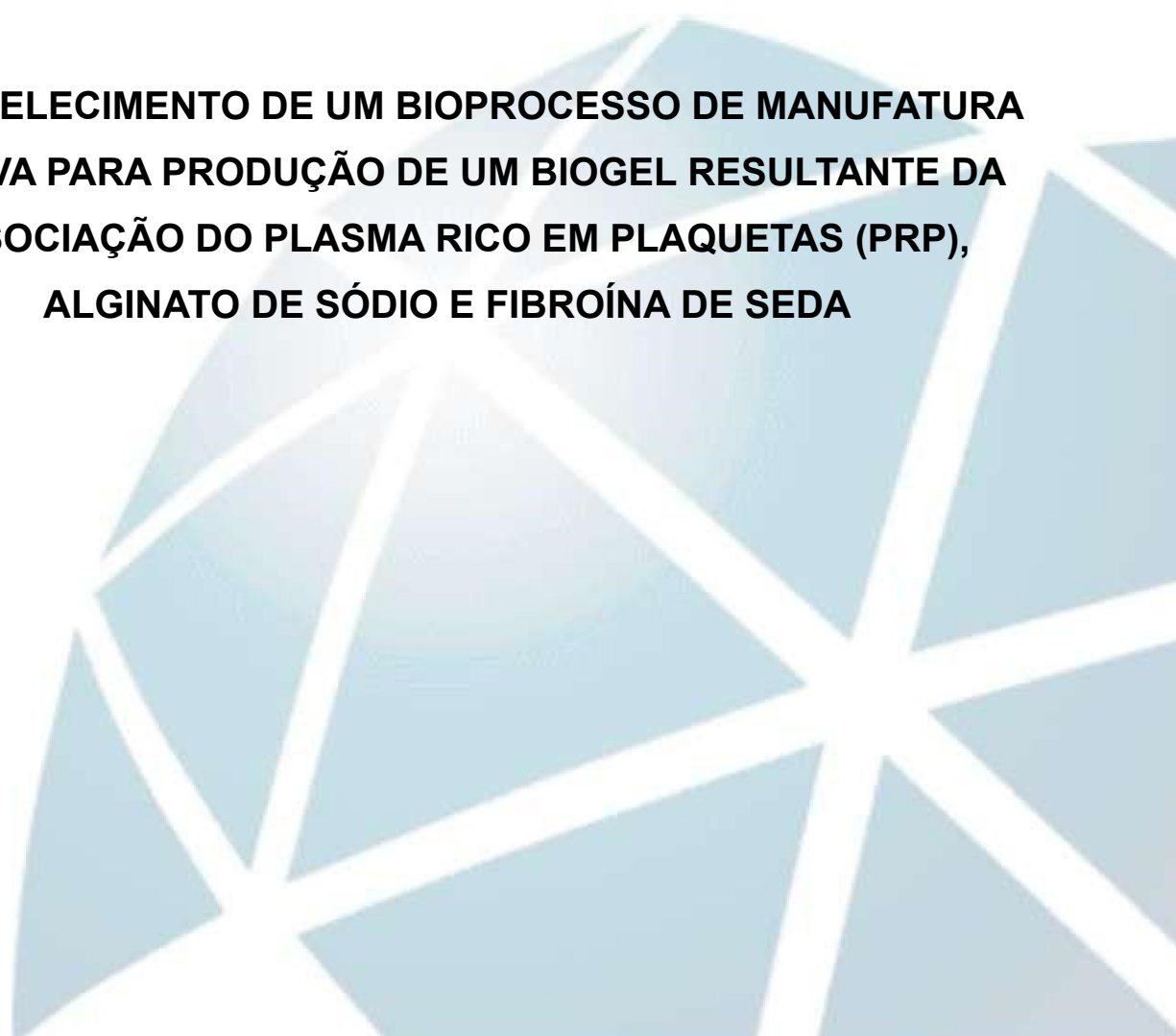


THAÍS AMARAL FRANÇA

**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

**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**

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro-Paes

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – Câmpus de Assis, para
obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia Biotecnológica.

**Assis
2022**

AGRADECIMENTOS

A meus pais, João e Vilma, que me ensinaram o valor da educação e tornaram possível o início da minha jornada, me apoiando e incentivando, mesmo nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Ao meu irmão, Diego, que acompanhou meu crescimento pessoal e profissional mesmo de longe.

Ao meu orientador, Dr. João Tadeu, pelos ensinamentos que me permitiram um melhor desempenho no processo de formação profissional.

A minha co-orientadora Dra. Juliana Daguano e ao Dr. Jorge Vicente, pela oportunidade de desenvolver minha pesquisa em colaboração com o Centro de Tecnologia da Informação (CTI – Renato Archer - Campinas).

Aos professores parceiros da Universidade Estadual de Londrina, Dr. Henrique de Santana, Dr. Sandra Lepri e MSc. Ana Lucia Felicio, sem os quais não seria possível a realização desse projeto.

Aos meus colegas do laboratório GenTe Cel, em especial a Maria Malagutti e a Julia Fracasso, que sempre me ajudaram quando não era possível prosseguir sozinha.

A Dra. Janaina Dernowsek e Carlos Marques, colaboradores da BioEdTech, pelo apoio técnico e pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos sobre a bioimpressão 3D.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de PIBIC (Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica), que possibilitou o desenvolvimento dessa pesquisa.

E a todas as pessoas que conheci durante minha jornada na graduação, pois eles ajudaram a construir a pessoa que sou hoje.

"Fiz meu próprio caminho e meu caminho me fez"

(Emicida)

RESUMO

A medicina regenerativa (RM) é uma nova área de conhecimento que, associado a engenharia de tecidos (TE), tem permitido otimizar o desenvolvimento de biomateriais para aplicações biomédicas. Dois dos biomateriais estudados pela TE é a fibroína de seda e o alginato de sódio, dois polímeros naturais amplamente utilizados em aplicações biológicas por apresentarem diferentes conformações e não induzirem citotoxicidade. O PRP, uma fração derivada do sangue contendo altas concentrações de plaquetas, também é muito utilizado na RM por secretar citocinas e fatores de crescimento celular. Sendo assim, a impressão 3D de uma combinação de hidrogel de fibroína com PRP, pode ser capaz de alcançar não apenas a entrega localizada e a liberação sustentada de fatores de crescimento, como também a melhora da capacidade regenerativa da pele. Neste estudo foi realizada a padronização do biogel resultante da associação de alginato de sódio, PRP e fibroína de seda, para a metodologia de impressão 3D por extrusão. Foram testadas diversas concentrações de alginato de sódio, bem como três diferentes soluções reticulantes: cloreto de cálcio 2%, cloreto de cálcio 10% e gluconato de cálcio 10%. Também foi realizada a análise de dissolução do biogel e espectroscopia por infravermelho. Os biogéis compostos por 8% e 10% de alginato de sódio apresentaram características compatíveis com a impressão 3D por extrusão. Sendo que, o biogel com 10% de alginato de sódio e reticulado com gluconato de cálcio apresentou melhor resultado no teste de dissolução. Portanto, os resultados apontam que o biogel resultante desta associação pode fundamentar a criação de uma nova abordagem terapêutica no tratamento de feridas cutâneas de difícil cicatrização.

Palavras-chave: Medicina regenerativa, Impressão 3D, Biogel, Engenharia de tecidos.

ABSTRACT

Regenerative medicine (RM) is a new area of knowledge that, associated with tissue engineering (TE), has allowed optimizing the development of biomaterials for biomedical applications. Two of the biomaterials studied by TE are silk fibroin and sodium alginate, two natural polymers widely used in biological applications because they have different conformations and do not induce cytotoxicity. PRP, a blood-derived fraction containing high concentrations of platelets, is also widely used in RM for secreting cytokines and cell growth factors. Therefore, 3D printing of a combination of fibroin hydrogel with PRP 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 standardization of the biogel resulting from the association of sodium alginate, PRP and silk fibroin was performed for the extrusion 3D printing methodology. Different concentrations of sodium alginate were tested, as well as three different crosslinking solutions: 2% calcium chloride, 10% calcium chloride and 10% calcium gluconate. Biogel dissolution analysis and infrared spectroscopy were also performed. The biogels composed of 8% and 10% sodium alginate showed characteristics compatible with extrusion 3D printing. The biogel with 10% sodium alginate and cross-linked with calcium gluconate showed better results in the dissolution test. Therefore, the results indicate that the biogel resulting from this association can support the creation of a new therapeutic approach in the treatment of skin wounds that are difficult to heal.

Keywords: Regenerative medicine, 3D printing, Biogel, Tissue engineering.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sangue após a primeira centrifugação	15
Figura 2 - Plasma sanguíneo após a segunda centrifugação	15
Figura 3 - Plasma rico em plaquetas (PRP)	15
Figura 4 - Fibroína de seda (SF)	16
Figura 5 - Associação da fibroína de seda com plasma rico em plaquetas	16
Figura 6 - Solução de alginato de sódio	17
Figura 7 - Teste de auto-sustentação do biogel	17
Figura 8 - Impressão 3D do biogel	18
Figura 9 - Biogel AG+SF+PRP após reticulação com solução de cloreto de cálcio	18
Figura 10 - Biogel AG+SF+PRP após reticulação com cloreto de cálcio 2% e 10%	19
Figura 11 - Biogel AG+SF+PRP após reticulação com gluconato de cálcio 10%	19
Figura 12 - Ensaio de degradação após 60 minutos	21
Figura 13 - Ensaio de degradação após 120 minutos	22

LISTA DE ABREVIATURAS

3D	Tridimensional
RM	Medicina Regenerativa
TE	Engenharia Tecidual
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
SF	Fibroína de Seda
AG	Alginato de sódio
PBS	Tampão Fosfato Salino
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS	12
Objetivo Geral	12
Objetivos Específicos	12
MATERIAIS E MÉTODOS	12
Obtenção do plasma rico em plaquetas	12
Associação e impressão 3D do biogel de Alginato de sódio+PRP+fibrina	13
Ensaio de degradação	13
Aspectos éticos	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	14
Impressão 3D de um biogel resultante da associação do plasma rico em plaquetas (PRP), alginato de sódio e fibrina de seda.	15
Teste de degradação	18
CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20

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 (Nii and Katayama, 2021). 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 tecidual (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 tipo de moléculas (citocinas, fatores de diferenciação, antibióticos, etc...) que poderão concorrer para a reparação e/ou 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 (Mishra and Srivastava, 2021). Entre os biomateriais que apresentam tais propriedades e têm sido mais comumente empregados, vale citar quitosana, colágeno, polietileno, ácido hialurônico, alginato e fibroína (Benwood et al., 2021).

Mais recentemente, a fibroína da seda vem sendo estudada como um biomaterial promissor para novas aplicações na engenharia de tecidos por não induzir resposta inflamatória, além de apresentar biocompatibilidade e biodegradabilidade (Debari et al., 2020). Devido sua capacidade de ser empregada em diferentes conformações como membrana, fibra, hidrogel e filme, a fibroína também apresenta muitas vantagens físico-químicas (Gupta et al, 2020).

A fibroína é um polímero natural derivado da seda, principalmente dos casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), composto por H-chain (cadeias pesadas) e L-chain (cadeias leves). Essas cadeias interagem através de uma ponte de dissulfeto, formando o complexo H-L. 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 (Wang et al., 2022).

Para a engenharia de tecido, a sericina não apresenta propriedades interessantes, pois sua utilização reduz a força mecânica da fibra de seda, além de induzir respostas inflamatórias indesejáveis. Por essa razão é feito o processo de degomagem da seda para remoção da sericina. 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 (Zheng and Zuo, 2021).

Outro biomaterial comumente empregado na engenharia de tecidos é o alginato de sódio, um co-polímero de ácido alfa-L-gulurônico e ácido beta-D-manurônico produzido por algas marrons e bactérias, muito utilizado em indústrias alimentícias e farmacêuticas para aumentar a viscosidade de produtos (Jadach et al., 2022). Devido sua estrutura molecular similar a um polissacarídeo, o alginato é um composto muito utilizado na engenharia biomédica. Além de ser facilmente transformado em gel na adição de íons de cálcio ou ferro, esse gel tem a capacidade de incorporar células e moléculas bioativas, sendo utilizado em entrega

de células (cell delivery), medicamentos (drug delivery), tratamento de tecidos danificados e estudos *in vitro* (Nii and Katayama, 2021).

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. O ramo que utiliza a tecnologia de manufatura aditiva para aplicações biológicas é conhecido como Bioimpressão 3D, um conceito que utiliza biomateriais associado à células e moléculas bioativas para construir novos dispositivos biológicos (Fu et al., 2022).

Verifica-se na literatura um expressivo número de artigos relativos à associação de diversos biomateriais e plasma rico em plaquetas (PRP), no entanto, há um número muito restrito de publicações sobre a associação de PRP com fibroína e alginato de sódio. 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 (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, alginato de sódio e PRP poderá resultar num efeito aditivo ou sinérgico na regeneração tecidual em úlceras cutâneas.

Diante deste contexto, busca-se, com este projeto, estabelecer um bioprocesso exequível e reprodutível resultante da associação de PRP, alginato de sódio e fibroína de seda por meio de manufatura aditiva (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. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer um processo de manufatura aditiva (impressão 3D) para a produção de um biogel resultante da associação de alginato de sódio, plasma rico em plaquetas e fibroína de seda.

2.2. Objetivos Específicos

- Testar diferentes combinações e concentrações de PRP, alginato de sódio e fibroína de seda para produção de um biogel estável;
- Padronizar um processo biotecnológico para impressão 3D do biogel;
- Realizar o teste de dissolução.
- Analisar características físico-químicas resultantes da associação do biogel PRP, alginato de sódio e fibroína de seda;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. 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.

3.2. 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, Brasília) foi elaborado a partir da dissolução em tampão fosfato - PBS (LGC Biotecnologia, Brasil) à 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 resultantes das associações 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).

3.3. Ensaio de degradação

Os biogéis, após impressos 3D, foram divididos em dois grupos. O grupo 1 foi pulverizado com solução de cloreto de cálcio a 2%, o grupo 2 foi pulverizado com cloreto de cálcio a 10% (Injec Center, Brasil) e o grupo 3 foi pulverizado com solução de gluconato de cálcio a 10% (Injec Center, Brasil). Os dois grupos foram dispostos em placas de petri e adicionado tampão PBS por 20 dias. Foram avaliados suas morfologias conforme os dias.

3.4. Ensaio de dissolução

Os biogéis 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 impresso 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.

3.5. Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da faculdade local 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).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. 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.

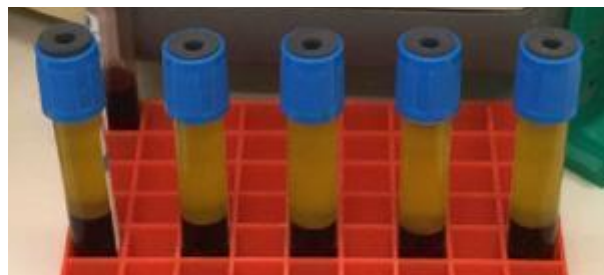


Figura 1. Sangue após a primeira centrifugação.

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, como apresentado na Figura 2.



Figura 2. Plasma sanguíneo após a segunda centrifugação.

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 3. Plasma rico em plaquetas (PRP)

4.2. 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.

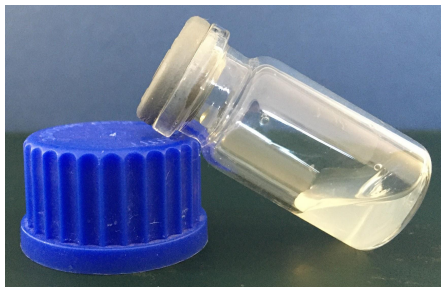


Figura 4. Fibroína de seda (SF).

Segundo 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 5.



Figura 5. 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). Assim, 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 6. Foi possível visualizar a mudança de viscosidade do hidrogel, devido a presença de íons cálcio no PRP que proporcionou uma reticulação interna do alginato de sódio.

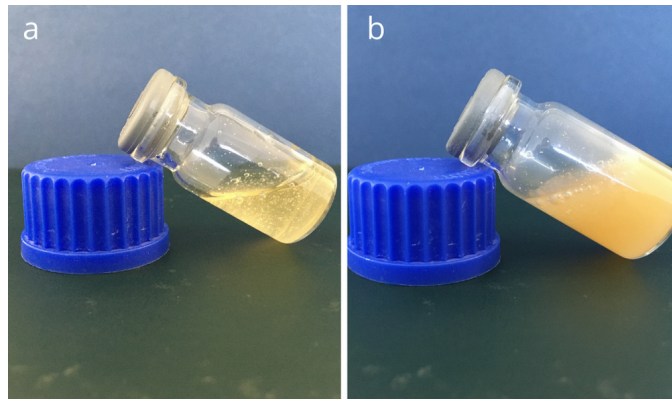


Figura 6. Solução de alginato de sódio **a)** Solução de alginato de sódio a 8%; **b)** Alginato de sódio associado ao SF+PRP.

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 7). Assim, os biogéis 8% e 10% de alginato foram selecionados para o processo de impressão 3D.

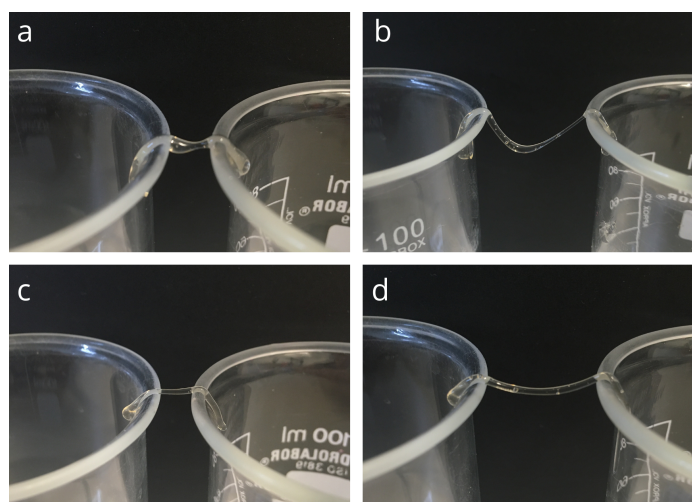


Figura 7. Teste de auto-sustentação do biogel **a)** Hidrogel AG 6% +SF+PRP; **b)** Hidrogel AG 6% +SF+PRP; **c)** Hidrogel AG 8% +SF+PRP; **d)** Hidrogel AG 8% +SF+PRP.

Antes de iniciar o processo de impressão 3D, foi feita uma modelagem digital no software PrusaSlicer seguindo as diretrizes apresentadas na Figura 8. 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).

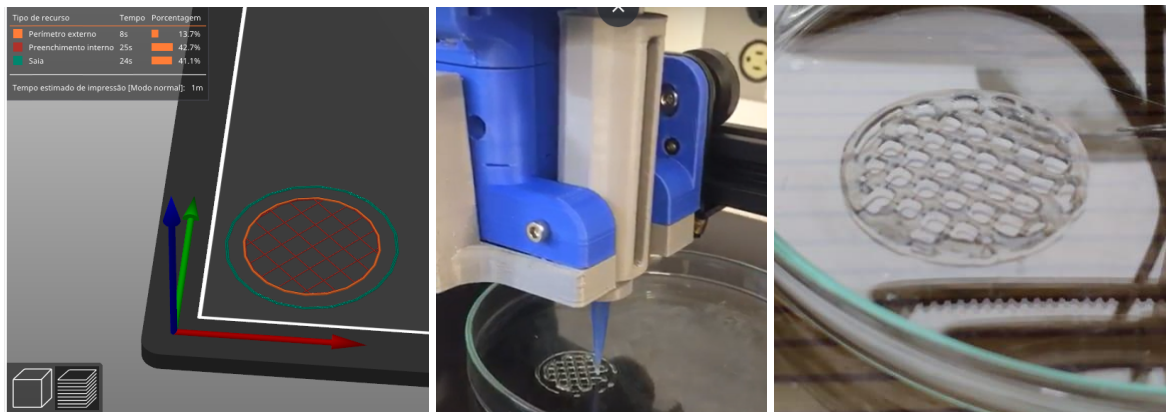


Figura 8. Impressão 3D do biogel **a)** Modelagem digital; **b)** Impressão 3D do biogel AG+SF+PRP; **c)** Biogel após impressão 3D.

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 9.

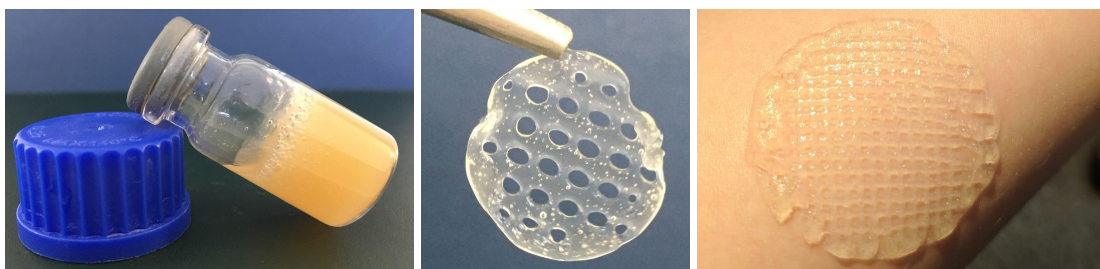


Figura 9. Biogel AG+SF+PRP após reticulação com solução de cloreto de cálcio.

4.3. Teste de degradação

Após o biogel ser impresso 3D, o grupo 1 foi pulverizado com cloreto de cálcio a 2%, o grupo 2 foi pulverizado com cloreto de cálcio a 10% (Figura 10) e o grupo 3 foi pulverizado com gluconato de cálcio a 10% (Figura 11), sendo disposto em placa de Petri com solução tampão PBS e observados por 20 dias.

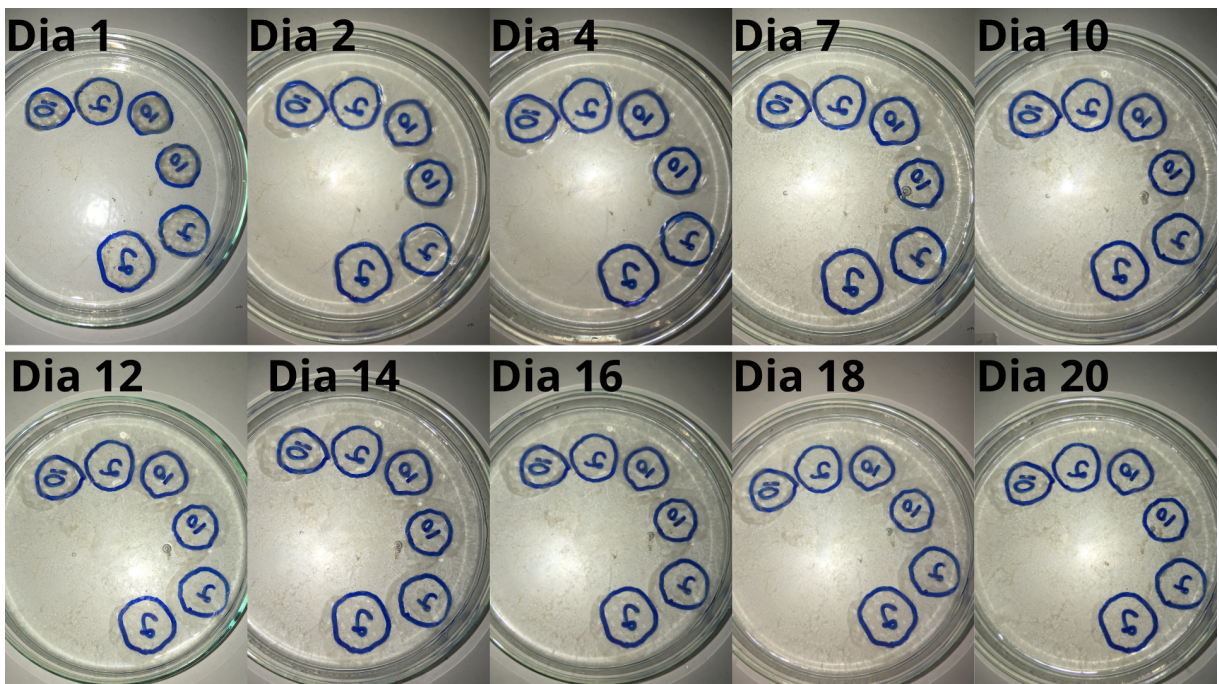


Figura 10. Biogel AG+SF+PRP após reticulação com cloreto de cálcio 2% e 10%, disposto em placa de petri com tampão PBS.

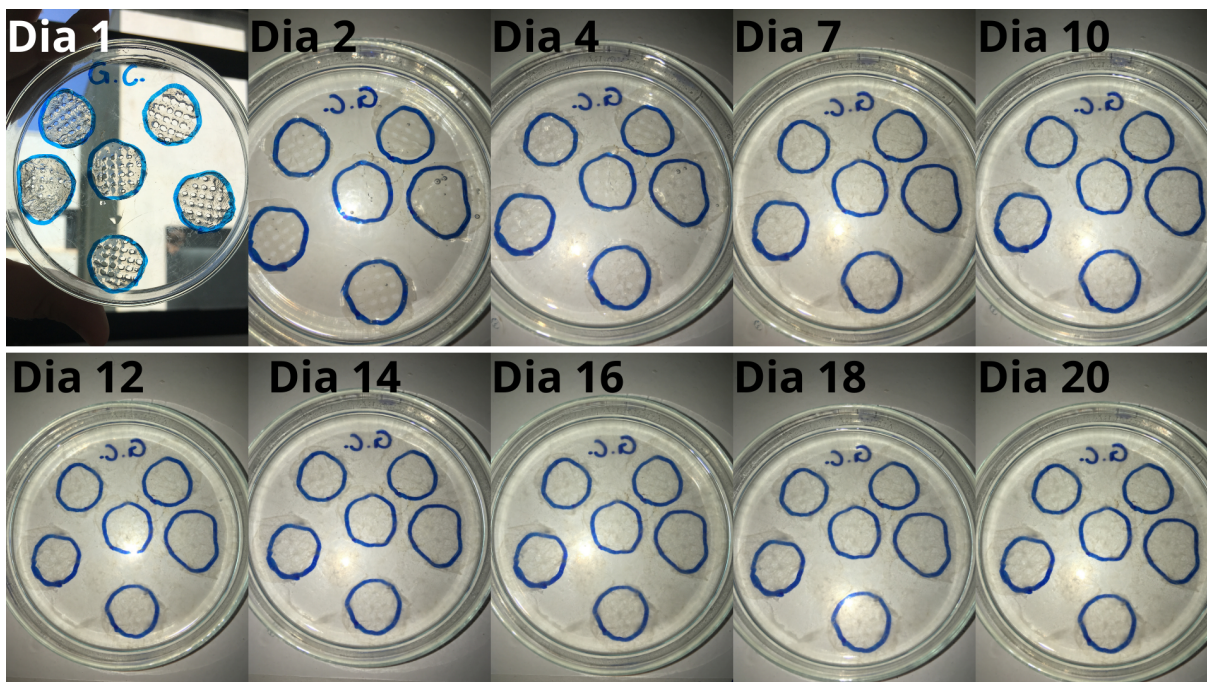


Figura 11. Biogel AG+SF+PRP após reticulação com gluconato de cálcio 10%.

Após 20 dias de observação, foi possível constatar por meio do aumento de área dos biogéis que, nos primeiros dias, os 3 grupos houve absorção de água antes do início da degradação. Os biogéis do grupo 3, reticulados com gluconato de cálcio 10%, sofreram um processo de degradação acelerado comparado aos grupos 1 e 2. Após 24 horas da impressão 3D, nota-se o maior grau de intumescimento dos biogéis, e, após 7 dias da impressão 3D, os biogéis reticulados com gluconato de cálcio já apresentam sinais de degradação, com perda da morfologia inicial.

Os grupos 1 e 2 apresentam o pico de intumescimento no sétimo dia de ensaio. No décimo segundo dia, é possível notar o início do processo de dissolução. Nota-se, também, que o grupo 2, reticulado com solução de cloreto de cálcio a 10%, ainda apresentava uma morfologia semelhante ao biogel inicial após os 20 dias de experimento, diferentemente do padrão morfológico apresentado pelo grupo 1.

Muitos estudos já demonstraram que o aumento na concentração de cálcio na solução reticulante diminui o grau de intumescimento do hidrogel de alginato, devido ao aumento da densidade da rede polimérica (Davidovich-Pinhas & Bianco-Peled, 2010). Os resultados apresentados no teste de degradação concordam com o que

foi observado no estudo de Davidovich-Pinhas & Bianco-Peled. O biogel reticulado com cloreto de cálcio a 10% apresentou poucos sinais de degradação entre os dias 10 e 20 do ensaio, pois, devido a maior concentração de íons cálcio na solução reticulante, formou-se uma rede polimérica mais densa e resistente à degradação em PBS.

4.4. 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 12). Foi possível visualizar que, as amostras reticuladas com cloreto de cálcio 2%, apresentou maior dissolução comparada à outras amostras.

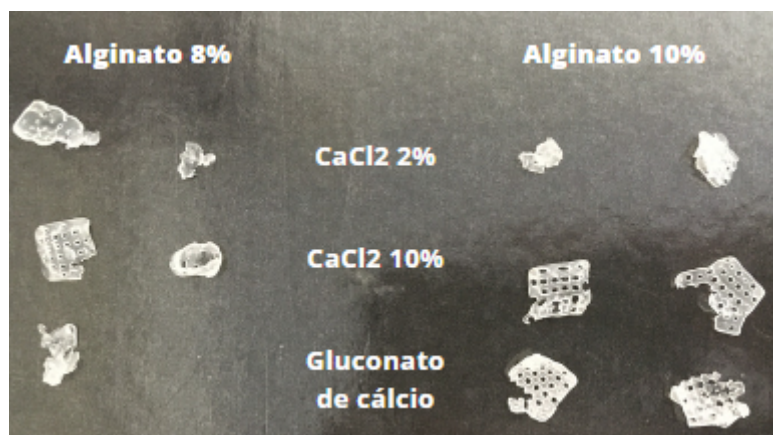


Figura 12. Ensaio de degradação após 60 minutos.

Após 120 minutos as amostras foram analisadas, apresentando maior atividade de dissolução, comparado ao resultado de 60 minutos (Figura 13). 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.

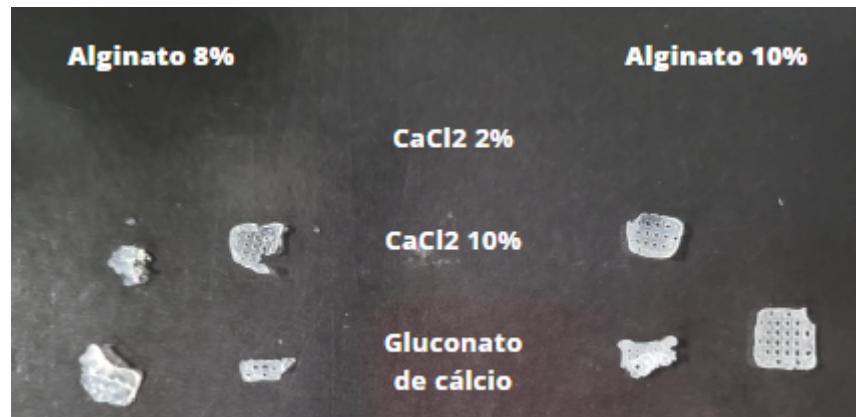


Figura 13. Ensaio de degradação após 120 minutos.

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 reprodutíveis para impressão 3D por extrusão. Pode-se afirmar, portanto, com base nos resultados obtidos que a metodologia proposta neste estudo representa método eficiente, exequível e reprodutível. Ademais, os resultados obtidos, 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 bioprocessos para terapia em pacientes humanos, sobretudo em pacientes com úlceras cutâneas de difícil cicatrização.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD RAUS, R., WAN NAWAWI, W. M. F., & NASARUDDIN, R. R. Alginate and alginate composites for biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 16, 280–306, 2021.

ARAUJO, L. C. P.; OLIVEIRA JUNIOR, J. M.; ARANHA, N. Síntese e caracterização de scaffolds de fibroína. **Rev. Matéria (Rio J.)**. 23 (4): 12212, 2018.

BELLINI, M.Z., PIRES, A.L.R., VASCONCELOS, M.O., MORAES, A.M., 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, 2012.

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

DAVIDOVICH-PINHAS, M., & BIANCO-PELED, H. A quantitative analysis of alginate swelling. **Carbohydrate Polymers**, 79(4), 1020–1027, 2010.

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

DIECKMANN, C., RENNER, R., MILKOVA, L., SIMON, JC. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. **Experimental Dermatology**, 19 (8): 697–706, 2010.

FISHER M.B., MAUCK R.L. Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. **Tissue Eng Part B Rev**, 19:1, 1-13, 2013.

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

FU, Z., OUYANG, L., XU, R., YANG, Y., & SUN, W. Responsive biomaterials for 3D bioprinting: A review. **Materials Today**, 52, 112–132, 2022.

HERNANDEZ, E. D. D., & REYES-ROMERO, J. R. Characteristics of polymeric materials used in medicine. In **Materials for Biomedical Engineering**, 479-506, Elsevier, 2019.

JADACH, B., ŚWIETLIK, W., & FROELICH, A. Sodium Alginate as a Pharmaceutical Excipient: Novel Applications of a Well-known Polymer. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 111, 1250–1261, 2022

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

KWOK SCH, WANG J, CHU PK. Surface energy, wettability, and blood compatibility phosphorus doped diamond-like carbon films. **Diamond & Related Material**, 14 (1), 78–85, 2015.

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

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

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

MIR, M., ALI, M.N., BARAKULLAH, A. et al. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. **Prog Biomater**, 7: 1–21, 2018.

MISHRA A, SRIVASTAVA V. Biomaterials and 3D printing techniques used in the medical field. *J Med Eng Technol*. Abril, 30:1-13, 2021.

O'BRIEN, J. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, 267 (17): 5421–5426, 2000.

REES, H. M. & ECKER, E. E. An improved method of counting blood platelets. **J. Amer. Med. Ass.**, 80 (9), 621-622, 1923.

SANTOS, N.C.D., Gel de plasma rico em plaquetas (PRP) e associação de gel de PRP com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano: caracterização físico-química, morfológica e de análise de viabilidade celular. Dissertação (Mestrado em Biociências)–Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Assis, 2017.

SHIMOJO, AAM., Stabilization of porous chitosan improves the performance of its association with platelet-rich plasma as a composite scaffold. **Mater. Sci. Eng. C**, 60: 538-546, 2016.

STESSUK, T. et al. 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, 2016.

STESSUK, T. et al. 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, 2020.

WANG, K., MA, Q., ZHOU, H. T., ZHAO, J. M., CAO, M., & WANG, S. D. Review on Fabrication and Application of Regenerated Bombyx Mori Silk Fibroin Materials. **Autex Research Journal**, 2022.

WILLIAMS, DF. Sobre a natureza dos biomateriais. **Biomaterials**, 30: 5897-5909, 2009

ZHANG, H., CHENG, J., & AO, Q. Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine. **Marine Drugs**, 19, 2021.