

Trabalho

Título em Português:	APLICAÇÃO TÉCNICA DE BIOIMPRESSÃO 3D PARA CONSTRUÇÃO DE UM SUBSTITUINTE BIOLÓGICO DO TECIDO DERMAL ADAPTATIVO À PELE SEVERAMENTE LESIONADA POR QUEIMADURAS
Título em Inglês:	technical application of 3d bioprinting for the construction of a biological substitute of adaptive dermal tissue for severely burned skin
Autor:	Ana Julia Gonzalez Tendulini
Instituição:	Universidade de São Paulo
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Jarbas Caiado de Castro Neto
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Biotecnologia
Agência Financiadora:	CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior



APLICAÇÃO TÉCNICA DE BIOIMPRESSÃO 3D PARA CONSTRUÇÃO DE UM SUBSTITUINTE BIOLÓGICO DO TECIDO DERMAL ADAPTATIVO À PELE SEVERAMENTE LESIONADA POR QUEIMADURAS

Ana Julia Gonzalez Tendulini

Jarbas Caiado de Castro Neto

Universidade de São Paulo

anajulia.gonzalez@usp.br

Objetivos

Síntese e caracterização de tintas de biomateriais gelatina-alginato em diferentes proporções embebidas posteriormente em quitosana de baixo peso molecular visando a contribuição para o desenvolvimento de um tratamento complementar e alternativo para pacientes acometidos por queimaduras utilizando a impressão 3D como método de processamento.

Métodos e Procedimentos

Gelatina foi dissolvida em água destilada a 40°C por 30 minutos com agitação magnética. Alginato foi adicionado e misturado a 50°C por 2 horas para homogeneização. As soluções foram deixadas em repouso à temperatura ambiente (24-25°C) antes da impressão. A mistura foi tratada com ultrassom e centrifuga para remover bolhas. Uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂), ácido acético glacial e quitosana foi preparada sob agitação constante.

As análises reológicas foram feitas com um reômetro AR1500 EX (TA Instruments) usando geometria placa-placa. As medidas incluíram testes de amplitude para determinar a região de viscoelasticidade linear (LVE), testes de

varredura de frequência e medição dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') a 1Hz. Ensaios de tixotropia foram realizados para medir a viscosidade em diferentes intervalos de cisalhamento.

A tecnologia de impressão 3D utilizada foi baseada em extrusão movida por pistão, usando a Impressora 3D Bioender-BioEdTech com um sistema Peltier para controlar a temperatura da cama entre 8-11°C. A seringa foi fixada no eixo Z do braço robótico, que controlava o movimento nas direções X, Y e Z. Corpos de prova de dez camadas foram desenhados com os softwares Fusion360 e Cura, com dimensões finais de 15x15x2,5 mm³ e preenchimento Grid 25%. Após a impressão, os curativos foram imersos na solução reticulante por 10 minutos, cobertos com PBS pH 10 e lavados com PBS a pH 7.

Os testes de extrusão avaliaram a capacidade de formar filamentos contínuos variando o diâmetro das pontas. O "índice de printabilidade" Pr foi utilizado para avaliar a fidelidade de impressão, selecionando combinações de condições e formulações com $0,9 < Pr < 1,1$ para comparações de geometria e dimensões.

Resultados

Após vários testes utilizando apenas a centrífuga a diferentes rpm e tempos, foi observado que para remover bolhas menores era necessário inserir a formulação no ultrassom por 1 hora à temperatura ambiente antes de passar pela centrífuga. A melhor sequência e duração dos procedimentos foram determinadas. A altura de camada ideal foi testada para as concentrações A7G3 e A5G4, concluindo-se que 0,4 mm deveria ser constante para todos os testes. A impressão foi realizada à temperatura ambiente, embora testes com temperaturas variáveis possam reduzir a pressão de impressão necessária. Materiais viscoelásticos têm características complexas em relação ao módulo de cisalhamento, com módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') indicando comportamento elástico e viscoso, respectivamente. A tixotropia, ou variação da viscosidade ao longo do tempo, é crucial para uma impressão precisa, pois descreve a recuperação da viscosidade após a deposição. Análises reológicas mostraram mudanças nas propriedades viscoelásticas após a adição de gelatina ao alginato. As misturas exibiram comportamento pseudoplástico conforme o modelo de Ostwald-de Waele, com viscosidade diminuindo como uma função da taxa de cisalhamento. Parâmetros como coeficiente de consistência (m) e índice de comportamento de fluxo (n) foram determinados para cada formulação. A mistura A5G4 mostrou a maior viscosidade inerente, enquanto A7G3 apresentou a menor.

Foi observado que a gelatina aumentou tanto G' quanto G'' e a viscosidade geral, resultando em maior pressão na seringa e comportamento mais sólido. Para que a formulação seja considerada um hidrogel, deve haver predominância do comportamento elástico sobre o viscoso. As formulações A7G4, A5G4, A6G3 e A5,5G4 atenderam a esse critério.

A extrusão de filamentos depende das propriedades reológicas do material, sendo crucial para uma impressão precisa. A geometria cilíndrica das ponteiros não foi adequada devido ao entupimento. A mistura

A5,5G4 foi impressa a diferentes velocidades, otimizando-se a velocidade de impressão com base na uniformidade dos filamentos. Parâmetros como fluxo e velocidade foram ajustados para obter melhores resultados. Inicialmente, as misturas A5G4 e A5,5G4 apresentaram excesso de material a 5 mm/s, resultando em poros arredondados e filamentos não retilíneos. Aumentando a velocidade e controlando o fluxo, obteve-se melhorias. A formulação A5G4 foi comparada geometricamente com o projeto original, avaliando-se visualmente a fidelidade de formato.

Diferenças de altura e largura foram observadas, com a condição de impressão A7G3-30-05, A6G3-20-20 e A6G3-30-05 sendo as mais adequadas para impressão 3D dos hidrogéis.

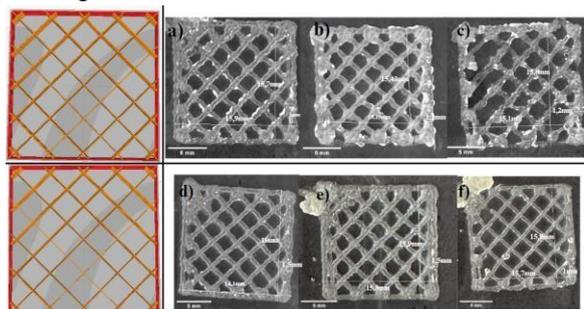


Figura 1: Registro de dimensões dos impressos realizados com os parâmetros a) A6G3-30-05; b) A7G3-30-05; c) A7G4 30-20; d) A6G3- 20-05; e) A6G3-20-10; f) A6G3- 20-20 com os corpos de prova ao lado dos respectivos desenhos originais com o fluxo de 30 e 20 (apenas para viés comparativo, não se apresenta em escala representada).

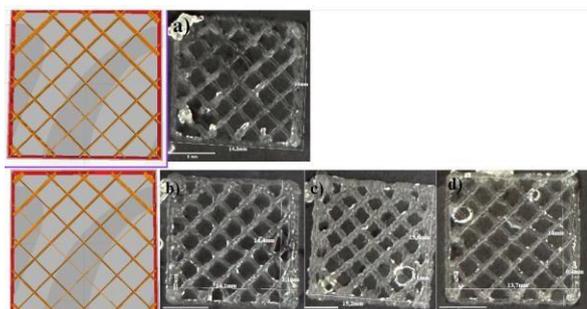


Figura 2: Registro de dimensões dos impressos realizados com os parâmetros a) 30-05; b) 20-05; c) 20-10; d) 20-20 com a formulação A5G4 ao lado do desenho original com o fluxo de 30 e 20 (apenas para viés comparativo não se apresenta em escala representada).

Conclusões

Os resultados para A5,5G4, e a maioria de A7G3 e A7G4, mostraram valores de Pr insatisfatórios, indicando a impossibilidade de impressão em diversas condições. No entanto, A5G4 apresentou bons resultados. Inicialmente, a uma velocidade de 5 mm/s e fluxo de 100, houve sinais de excesso de deposição de material. Ao aumentar a velocidade e regular o parâmetro de fluxo, concluiu-se que as melhores condições de impressão para essa concentração foram: fluxo 20 e velocidades de 10 e 20 mm/s. Ao testar A7G3, A6G3 e A7G4, foi observado que o comportamento reológico de A7G4 restringiu severamente sua impressão. As configurações A7G3-30-05, A6G3-20-20 e A6G3-30-05 mostraram-se mais adequadas. No futuro, o trabalho pretende confirmar a modificação da superfície realizada pela quitosana, em conjunto com a solução de reticulação, e realizar testes básicos para verificar a liberação controlada de um fármaco hidrossolúvel.

Agradecimentos

Agradecimentos ao programa CNPQ/PIBIC pela bolsa IC, a IFSC/USP pela infraestrutura de desenvolvimento, ao LIO2A/Grupo de Óptica pelo apoio laboratorial de pesquisa científica e ao Grupo de Pesquisa em Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat/UNIARA) pela infraestrutura de desenvolvimento.

Referências

DATTA, P. et al. Essential steps in bioprinting: From pre- to post-bioprinting. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 5, p. 1481–1504, set. 2018.

RIBEIRO, A. et al. Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. *Biofabrication*, v. 10, n. 1, p. 014102, 30 nov. 2017. FU, Z. et al. Printability in extrusion bioprinting. *Biofabrication*, v. 13, n. 3, p. 033001, 8 abr. 2021.

PAXTON, N. et al. Proposal to assess printability of bioprinting bioinks for extrusion-based and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, v. 9, n. 4, p. 044107, 14 nov. 2017.

LIN, H.-Y.; CHANG, T.-W.; PENG, T.-K. Three dimensional plotted alginate fibers embedded with diclofenac and bone cells coated with chitosan for bone regeneration during inflammation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 106, n. 6, p. 1511–1521, 13 fev. 2018.

FAYYABAKHSH, F.; J. KHAYAT, M.; C. LEU, M. 3D-Printed Gelatin-Alginate Hydrogel Dressings for Burn Wound Healing: A Comprehensive Study. *International Journal of Bioprinting*, v. 8, n. 4, 19 set. 2022.

TECHNICAL APPLICATION OF 3D BIOPRINTING FOR THE CONSTRUCTION OF A BIOLOGICAL SUBSTITUTE FOR DERMAL TISSUE ADAPTED TO SEVERELY BURN-INJURED SKIN

Ana Julia Gonzalez Tendulini

Jarbas Caiado de Castro Neto

University of São Paulo

Anajulia.gonzalez@usp.br

Objectives

Synthesis and characterization of gelatin-alginate biomaterial inks in different proportions, later soaked in low molecular weight chitosan, aiming to contribute to the development of a complementary and alternative treatment for burn patients using 3D printing as a processing method.

Materials and Methods

Gelatin was dissolved in distilled water at 40°C for 30 minutes with magnetic stirring. Alginate was added and mixed at 50°C for two hours to ensure homogenization. The solutions were left to rest at room temperature (24-25°C) before printing. The mixture was treated with ultrasound and centrifugation to remove bubbles. A solution of calcium chloride (CaCl₂), glacial acetic acid, and chitosan was prepared under constant stirring.

Rheological analyses were performed using an AR1500 EX rheometer (TA Instruments) with a plate-plate geometry. The measurements included amplitude tests to determine the linear viscoelastic (LVE) region, frequency sweep tests, and the measurement of elastic (G') and viscous (G'') moduli at 1 Hz. Thixotropy tests were conducted to measure viscosity at different shear rates.

The 3D printing technology used was based on piston-driven extrusion, utilizing the Bioender-

BioEdTech 3D Printer with a Peltier system to control the bed temperature between 8-11°C. The syringe was fixed on the z-axis of the robotic arm, which controlled movement in the x, y, and z directions. Ten-layer test specimens were designed using Fusion360 and Cura software, with final dimensions of 15x15x2.5 mm³ and a 25% Grid infill. After printing, the dressings were immersed in the crosslinking solution for 10 minutes, covered with PBS at pH 10, and then washed with PBS at pH 7.

Extrusion tests assessed the ability to form continuous filaments by varying the diameter of the nozzles. The "printability index" (Pr) was used to evaluate print fidelity, selecting combinations of conditions and formulations with $0.9 < Pr < 1.1$ for comparisons of geometry and dimensions.

Results

After several tests using only the centrifuge at various rpm and durations, it was found that to effectively remove smaller bubbles, the formulation needed to be subjected to ultrasound for 1 hour at room temperature prior to centrifugation. The optimal sequence and duration of these procedures were determined. The ideal layer height was evaluated for concentrations A7G3 and A5G4, concluding that 0.4 mm should be maintained consistently across all tests. Printing was performed at room temperature, although tests at varying temperatures could potentially reduce the required printing pressure.

Viscoelastic materials exhibit complex characteristics concerning the shear modulus, with storage modulus (G') and loss modulus (G'') indicating elastic and viscous behaviors, respectively. Thixotropy, or the variation in viscosity over time, is critical for precise printing, as it describes the recovery of viscosity following deposition.

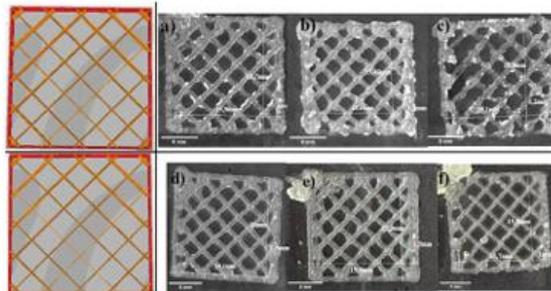
Rheological analyses demonstrated changes in viscoelastic properties following the addition of gelatin to alginate. The mixtures displayed pseudoplastic behavior according to the Ostwald-de Waele model, with viscosity decreasing as a function of shear rate. Parameters such as the consistency coefficient (m) and the flow behavior index (n) were determined for each formulation. The A5G4 mixture exhibited the highest inherent viscosity, while A7G3 had the lowest.

It was observed that the addition of gelatin increased both G' and G'' as well as overall viscosity, leading to higher syringe pressure and a more solid-like behavior. For a formulation to be considered a hydrogel, elastic behavior must predominate over viscous behavior. The formulations A7G4, A5G4, A6G3, and A5.5G4 met this criterion.

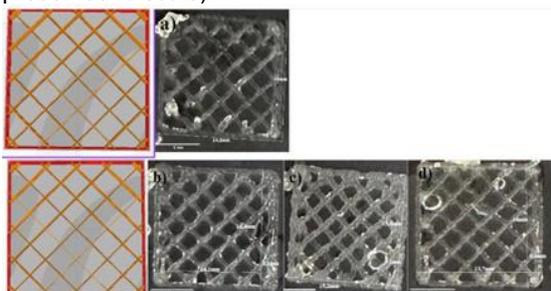
The extrusion of filaments depends on the rheological properties of the material, which is crucial for accurate printing. The cylindrical geometry of the nozzles proved inadequate due to clogging. The A5.5G4 mixture was printed at different speeds, optimizing the printing speed based on filament uniformity. Parameters such as flow and speed were adjusted to achieve optimal results.

Initially, the A5G4 and A5.5G4 mixtures exhibited excess material at a speed of 5 mm/s, resulting in rounded pores and non-linear filaments.

By increasing the speed and controlling the flow, improvements were achieved. The A5G4 formulation was geometrically compared to the original design, with visual assessments made to evaluate shape fidelity. Variations in height and width were observed, indicating that the printing conditions A7G3-30-05, A6G3-20-20, and A6G3-30-05 were the most suitable for the 3D printing of hydrogels.



Picture 1: illustrates the recorded dimensions of the printed samples produced using parameters a) A6G3-30-05; b) A7G3-30-05; c) A7G4-30-20; d) A6G3-20-05; e) A6G3-20-10; and f) A6G3-20-20. The printed specimens are shown alongside their respective original designs, with a flow rate of 30 and 20 used for comparative purposes only (not presented to scale).



Picture 2: Dimensional record of the printed samples produced with the parameters a) 30-05; b) 20-05; c) 20-10; d) 20-20 using the A5G4 formulation, alongside the original design with flow rates of 30 and 20 (for comparative bias only, not shown to scale).

Conclusions

The results for A5.5G4, and most of A7G3 and A7G4, demonstrated unsatisfactory Pr values, indicating the impracticality of printing under various conditions. However, A5G4 exhibited favorable outcomes. Initially, at a speed of 5 mm/s and a flow rate of 100, there were signs of excess material deposition. By increasing the speed and adjusting the flow rate, it was determined that the optimal printing conditions for this concentration were a flow rate of 20 and speeds of 10 and 20 mm/s.

Upon testing A7G3, A6G3, and A7G4, it was observed that the rheological behavior of A7G4

severely limited its printability. The configurations A7G3-30-05, A6G3-20-20, and A6G3-30-05 were found to be the most suitable. Future work aims to confirm the surface modification achieved by chitosan, in conjunction with the crosslinking solution, and to conduct preliminary tests to verify the controlled release of a water-soluble drug.

Acknowledgements

Acknowledgments are extended to the CNPQ/PIBIC program for the IC scholarship, the Institute of Physics of São Carlos (IFSC/USP) for providing the development infrastructure, the LIO2A/Optics Group for their support in the scientific research laboratory, and the Research Group on Biopolymers and Biomaterials (BioPolMat/UNIARA) for the development infrastructure.

References

DATTA, P. et al. Essential steps in bioprinting: From pre- to post-bioprinting. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 5, p. 1481–1504, set. 2018.

RIBEIRO, A. et al. Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. *Biofabrication*, v. 10, n. 1, p. 014102, 30 nov. 2017.

FU, Z. et al. Printability in extrusion bioprinting. *Biofabrication*, v. 13, n. 3, p. 033001, 8 abr. 2021.

PAXTON, N. et al. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, v. 9, n. 4, p. 044107, 14 nov. 2017.

LIN, H.-Y.; CHANG, T.-W.; PENG, T.-K. Three-dimensional plotted alginate fibers embedded with diclofenac and bone cells coated with chitosan for bone regeneration during inflammation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 106, n. 6, p. 1511–1521, 13 fev. 2018.

FAYYABAKHSH, F.; J. KHAYAT, M.; C. LEU, M. 3D-Printed Gelatin-Alginate Hydrogel Dressings for Burn Wound Healing: A Comprehensive Study. *International Journal of Bioprinting*, v. 8, n. 4, 19 set. 2022.