

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

AIRTON PEREIRA BORGES

**Processamento e caracterização de hidrogéis de alginato-gelatina com
adição de PVA, glicerol e óxido de grafeno visando aplicação em impressão
3D**

São Carlos

2023

AIRTON PEREIRA BORGES

**Processamento e caracterização de hidrogeis de alginato-gelatina com
adição de PVA, glicerol e óxido de grafeno visando aplicação em impressão
3D**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Eliana Cristina da Silva Rigo

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

B732p	<p>Borges, Airton Pereira</p> <p>Processamento e caracterização de hidrogéis de alginato-gelatina com adição de PVA, glicerol e óxido de grafeno visando aplicação em impressão 3D / Airton Pereira Borges ; orientadora Eliana Cristina da Silva Rego. -- São Carlos, 2023.</p> <p>Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2023.</p> <p>1. Bioimpressão. 2. Biotinta. 3. Biomaterial. 4. Biologia. 5. Hidrogel. I. Título.</p>
-------	--



FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Airton Pereira Borges

Título: "Processamento e caracterização de hidrogéis de alginato-gelatina com adição de PVA, glicerol e óxido de grafeno visando aplicação em impressão 3D"

Data da defesa: 27/10/2023

Comissão Julgadora	Resultado
Prof(a). Dr(a). Eliana Cristina da Silva Rigo UFSCar - Orientadora	<u>Não Votante</u>
Prof(a). Dr(a). Andrés Vercik Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP	<u>APROVADO</u>
Prof(a). Dr(a). Juliana Marchi Universidade Federal do ABC - UFABC	<u>pl aprovado</u>
Prof(a). Dr(a). Ernane José Xavier da Costa Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP	<u>A PROVADO</u>

Profa. Dra. Eliana Cristina da Silva Rigo - Orientadora

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Dr. Adair Roberto Aguiar

Dedico este trabalho a minha
família que sempre foi meu
principal alicerce

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades, desafios e força para superar as dificuldades.

Agradeço a todos os acontecimentos da minha vida que me levaram a estar onde estou hoje.

Aos meus pais Alberto e Margarida, minha irmã Roberta por toda a atenção, amor e carinho, por me proporcionarem segurança, sabedoria e disciplina, vocês me ensinaram a ser a pessoa que sou hoje.

A Prof^ª. Dr^ª. Eliana Rigo, pela oportunidade, orientação, paciência, apoio, ajuda, conselhos, ensinamentos repassados e amizade ao longo desse mestrado. Foi um privilégio tê-la como orientadora, certamente o exemplo e os conselhos dados servirão como referência na minha vida profissional.

Aos Profs. Dr. Tito Dias e Dr. Benício Lacerda, meu sincero agradecimento por me recomendarem, pelo apoio e incentivo que me deram para aplicar ao programa de mestrado. Sou grato por sua orientação e confiança em meu potencial.

Ao Prof. Dr. Adair Aguiar e todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC-USP.

Ao Prof. Dr. Andrés Vercik, pela amizade, dicas e contribuições dadas ao longo desse mestrado.

A especialista de laboratório Luci Cristina que garantiu que essa experiência pudesse ser a melhor possível, pela amizade, atenção e carinho.

Aos técnicos de laboratório da USP de Pirassununga, Silvana e Marcio, pela amizade, paciência, ajuda e toda atenção prestada.

A secretária da Bioengenharia Marcia Maria por sua atenção, ajuda, carinho e por sempre ser simpática e competente sempre que solicitada.

Aos meus amigos, que tornam a jornada da vida mais leve e divertida.

Ao órgão de fomento CAPES, pelo auxílio financeiro para execução deste trabalho que possibilitou a minha jornada acadêmica.

E a todos que contribuíram direta e/ou indiretamente para o cumprimento de mais uma etapa em minha vida.

RESUMO

BORGES, A. P. **Processamento e caracterização de hidrogéis de alginato-gelatina com adição de PVA, glicerol e óxido de grafeno visando aplicação em impressão 3D.** 2023. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

O objetivo central deste estudo foi o desenvolvimento e a caracterização de hidrogéis à base de polímeros naturais, alginato e gelatina, incluindo plastificantes, como álcool polivinílico (PVA) e glicerol, e investigar suas propriedades físico-químicas e biológicas ao serem incorporados com óxido de grafeno. Os hidrogéis foram formulados a partir de uma solução de fosfato de sódio com pH 7,4, com as formulações alginato e gelatina (AG), alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG), alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA), alginato, gelatina e glicerol (AGGL), alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG). Utilizando um reômetro rotacional para analisar a curva de fluxo, todas as amostras apresentaram comportamento pseudoplástico, com redução da viscosidade à medida que a taxa de cisalhamento aumentou. Observou-se que a adição de glicerol não teve um impacto significativo na viscosidade aparente dos hidrogéis AG e AGGL. Além disso, os hidrogéis mostraram alto índice de injetabilidade, tornando-os promissores para impressão 3D. No ensaio de intumescimento, todas as amostras exibiram absorção inicial acentuada e contínua, sem atingir um limite de saturação, especialmente na presença de PVA ou glicerol. A análise por espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR) não indicou mudanças significativas nas bandas de absorção após a incorporação dos materiais. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se que as amostras contendo PVA apresentaram superfícies menos porosas, enquanto as amostras AGPVAOG e AGGLOG mostraram estruturas altamente porosas. Quanto à citotoxicidade, a maioria das formulações foi considerada não citotóxica, com exceção do hidrogel AGOG, que continha uma concentração maior de óxido de grafeno sem a presença de PVA ou glicerol. Esses resultados apontam que os hidrogéis têm um potencial promissor para diversas aplicações, como na medicina e engenharia de tecidos. No entanto, é fundamental conduzir estudos adicionais para uma compreensão mais completa de suas propriedades específicas antes de sua aplicação em larga escala.

Palavras-chave: Bioimpressão. Biotinta. Biomaterial. Biologia. Hidrogel.

ABSTRACT

BORGES, A. P. **Processing and characterization of alginate-gelatin hydrogels with addition of PVA, glycerol, and graphene oxide for 3D printing application..** 2023. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

The main objective of this study was the development and characterization of hydrogels based on natural polymers, alginate and gelatin, added with plasticizers such as polyvinyl alcohol (PVA) and glycerol, and to investigate their physicochemical and biological properties when combined with graphene oxide. The hydrogels were formulated from a sodium phosphate solution at pH 7.4, with formulations of alginate and gelatin (AG), alginate, gelatin, and graphene oxide (AGOG), alginate, gelatin, and polyvinyl alcohol (AGPVA), alginate, gelatin, and glycerol (AGGL), alginate, gelatin, polyvinyl alcohol, and graphene oxide (AGPVAOG), and alginate, gelatin, glycerol, and graphene oxide (AGGLOG). Using a rotational rheometer to analyze the flow curve, all samples exhibited pseudoplastic behavior, with reduced viscosity as the shear rate increased. It was observed that the addition of glycerol had no significant impact on the apparent viscosity of AG and AGGL hydrogels. Additionally, the hydrogels showed a high injectability index, making them promising for 3D printing applications. In the swelling test, all samples exhibited pronounced and continuous initial absorption without reaching a saturation limit, especially in the presence of PVA or glycerol. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis did not indicate significant changes in absorption bands after the incorporation of materials. Through scanning electron microscopy (SEM), it was observed that samples containing PVA had less permeable surfaces, while AGPVAOG and AGGLOG samples showed highly porous structures. Regarding cytotoxicity, most formulations were considered non-cytotoxic, except for the AGOG hydrogel, which contained a higher concentration of graphene oxide without the presence of PVA or glycerol. These results suggest that hydrogels have promising potential for various applications, such as in medicine and tissue engineering. However, further studies are needed for a more comprehensive understanding of their specific characteristics before practical-scale applications.

Keyword: Bioprinting. Bioink. Biomaterial. Biology. Hydrogel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Bioimpressão por extrusão.....	24
Figura 2: Fluxograma representando as etapas do desenvolvimento experimental do trabalho	35
Figura 3: Seringa descartável	38
Figura 4: Hidrogel AG após extrusão pela seringa.....	39
Figura 5: Ambiente com temperatura de 7°C.....	39
Figura 6: Ensaio de curva de fluxo com reômetro rotacional.....	40
Figura 7: Representação esquemática do aparato para teste de injetabilidade	41
Figura 8: Viscosidade versus taxa de cisalhamento	48
Figura 9: Curva de fluxo das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA); alginato, gelatina e glicerol (AGGL), alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG).....	49
Figura 10: Curva de fluxo das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina e glicerol (AGGL),	50
Figura 11: Curva de fluxo das amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG).	51
Figura 12: Análise de injetabilidade no Texture Analyser TA-TXplus	53
Figura 13: Ensaio de injetabilidade das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA); alginato, gelatina e glicerol (AGGL), alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG).....	54
Figura 14: Curva representativa força x tempo das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA); alginato, gelatina e glicerol (AGGL), alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG).....	55
Figura 15: Análise do Grau de Intumescimento (Q) das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico	

(AGPVA); alginato, gelatina e glicerol (AGGL); alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG).....	57
Figura 16: Análise do Grau de Intumescimento (Q) para as amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG).....	58
Figura 17: Análise do Grau de Intumescimento (Q) para as amostras alginato e gelatina (AG), alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina e glicerol (AGGL).....	59
Figura 18: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina e glicerol (AGGL).....	60
Figura 19: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) e alginato, gelatina, óxido de grafeno e glicerol (AGGLOG).....	60
Figura 20: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina, óxido de grafeno e álcool polivinílico (AGPVAOG) e alginato, gelatina, óxido de grafeno e glicerol (AGGLOG).....	61
Figura 21: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina, óxido de grafeno e álcool polivinílico (AGPVAOG).....	61
Figura 22: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato e gelatina (AG) a) superfície e b) volume; alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) c) superfície e d) volume e alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e) superfície e f) volume.....	63
Figura 23: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato, gelatina e glicerol (AGGL) a) superfície e b) volume; alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) c) superfície e d) volume e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG) e) superfície e f) volume.....	64
Figura 24: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato e gelatina (AG) a) superfície; alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) b) superfície; alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) c) superfície e alginato, gelatina e glicerol (AGGL) d) superfície (x100).....	65
Figura 25: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato e gelatina (AG) a) superfície; alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) b) superfície; alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) c) superfície e alginato, gelatina e glicerol (AGGL) d) superfície (x500).....	66

Figura 26: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) a) volume; alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) b) volume e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG) c) volume	67
Figura 27: Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) a) volume (x100); b) volume (x200); c) volume (x500) e d) volume (x500).....	68
Figura 28: Curva de viabilidade celular para as amostras alginato e gelatina (AG), alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina e glicerol (AGGL) e controle negativo (alumina) e positivo (fenol) pela incorporação de VN, utilizando linhagem celular CHO-K1 (ovário de Hamster chinês)	70
Figura 29: Curva de viabilidade celular para as amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG), alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG) e controle negativo (alumina) e positivo (fenol) pela incorporação de VN, utilizando linhagem celular CHO-K1 (ovário de Hamster chinês).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4D	Quadridimensional
3D	Tridimensional
ADSC	Células Tronco Adiposas Humanas
ATR	Reflectância Total Atenuada
Biopolítec	Laboratório de Tecnologia de Biopolímeros
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CAD	<i>Computer Aided Design</i>
CEMFUM	Centro Multiusuário de Funcionalidade de Macromoléculas
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
FDM	Modelagem por Deposição Fundida
GeLMA	Gelatina Metacrilada
GMAT	Laboratório de Biomateriais do Grupo de Materiais
G'	Módulo de Armazenamento
G''	Módulo de Perda
GO	Óxido de Grafeno
Hz	Hertz
HP	<i>Hewlett-Packard</i>
MA	Manufatura Aditiva
MCS	Meio de Cultura Suplementado
mL	Mililitro
mM	Milimoles
M _t	Massa do Hidrogel Intumescido
M _s	Massa do Hidrogel Seco
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCL	Policaprolactona
PEG	Glicol de Polietileno
pL	Picolitro
PLA	Ácido Polilático
pm	Picômetro
PR	Prototipagem Rápida
PRM	Prototipagem Rápida Médica
PVA	Álcool polivinílico

PVAc	Poli(acetato de vinila)
Q	Grau de Intumescimento
Q _{máx}	Grau Máximo de Intumescimento
RVL	Região Viscoelástica Linear
STL	<i>Surface Tessellation Language</i>
TC	Tomografia Computadorizada
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
W	Cálculo do Percentual de Água Absorvida
ZAB	Departamento de Ciências Básicas
ZAZ	Departamento de Zootecnia
ZEB	Departamento de Engenharia de Biosistemas

LISTA DE SÍMBOLOS

τ	Força de Cisalhamento
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μs	Microsegundo
γ	Taxa de Cisalhamento
η	Viscosidade
ω	Peso Final
ω_0	Peso Inicial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Impressão 3D	19
3.1.1 Contextualização Histórica	19
3.1.2 Etapas da Manufatura Aditiva	19
3.1.3 Adição de Célula na Impressão 3D	20
3.2 Bioimpressão	20
3.2.1 Evolução de Imagens 2D para o CAD 3D	22
3.2.2 Método de Extrusão para Bioimpressão 3D	22
3.3 Biotinta	25
3.3.1 <i>Scaffold free</i> e <i>scaffold based</i>	25
3.4 Hidrogeis	26
3.4.1 Polímeros Naturais	27
3.4.2 Plastificantes	30
3.5 Óxido de Grafeno (OG)	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Materiais	35
4.2 Fluxograma	35
4.3 Preparação dos hidrogeis	36
4.3.1 Formulação contendo alginato de sódio e gelatina (AG)	36
4.3.2 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina e óxido de grafeno (AGOG)	37
4.3.3 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA)	37
4.3.4 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina e glicerol (AGGL)	37
4.3.5 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG)	37
4.3.6 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG)	38
4.4 Etapa de extrusão das formulações utilizando seringa descartável	38
4.5 Ensaio de curva de fluxo com reômetro rotacional	40

4.6 Ensaio de Injetabilidade.....	41
4.7 Ensaio do Grau de Intumescimento.....	42
4.8 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	42
4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	43
4.10 Citotoxicidade.....	43
4.10.1 Cultura de células	43
4.10.2 Viabilidade celular – método de incorporação do vermelho neutro (VN)	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1 Ensaio de curva de fluxo com reômetro rotacional	47
5.2 Ensaio de Injetabilidade.....	52
5.3 Ensaio do Grau de Intumescimento.....	56
5.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	59
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	62
5.6 Citotoxicidade.....	69
6 CONCLUSÃO.....	73
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75

1 INTRODUÇÃO

Quando um órgão ou tecido é danificado, seja devido ao processo natural de envelhecimento ou a uma causa acidental, é necessário iniciar um processo de reparação ou substituição. Isso pode ser feito por meio de transplantes de partes doadas por outras pessoas ou pelo uso de materiais sintéticos ou naturais, conhecidos como biomateriais. No entanto, a escassez de doadores e a baixa taxa de biocompatibilidade tornam difícil encontrar materiais que possam substituir com sucesso os órgãos e tecidos danificados. Uma solução para essa questão pode surgir através da utilização de células retiradas do próprio paciente, fornecendo os nutrientes necessários para o crescimento adequado, juntamente com *scaffolds* – estruturas tridimensionais que servem como suporte para o crescimento das células. Esse método permite o cultivo de tecidos *in vitro*, permitindo a criação de modelos tridimensionais (3D) que podem ser impressos e aplicados na área médica. Essa abordagem pode reduzir a necessidade de transplantes de órgãos e tecidos, diminuindo assim as doenças relacionadas a esses procedimentos (CHOPRA; KUMAR; SINGH, 2020).

As aplicações médicas da impressão 3D estão em constante expansão e têm o potencial de revolucionar os cuidados de saúde, alterando significativamente a maneira como os pacientes são tratados em diversas condições (SCHUBERT; VAN LANGEVELD; DONOSO, 2014). Como uma tecnologia emergente que surge como uma extensão da impressão de materiais em 3D, a bioimpressão 3D, que é aplicada na área médica, utiliza componentes biocompatíveis ou celulares para construir estruturas que possam eventualmente formar tecidos (STANTON; SAMITIER; SÁNCHEZ, 2015). Inicialmente, a impressão 3D foi usada na odontologia e desde então tem avançado para vários campos, incluindo a produção de ossos, orelhas, exoesqueletos, traqueias, ossos da mandíbula, entre outros (MARRO; BANDUKWALA; MAK, 2016), a recriação de um microambiente tumoral (WANG *et al.*, 2014^a) e modelos de tecidos (HORVATH *et al.*, 2015).

A bioimpressão é uma tecnologia que utiliza componentes celulares ou um gel de biopolímero transportador adicional para compor as biotintas. Essas tintas são essenciais na bioimpressão, pois protegem as células da agregação e dos danos mecânicos que podem ocorrer durante o processo. A seleção adequada de biotintas, em termos de composição e propriedade mecânica, é crucial para o desenvolvimento de substitutos viáveis (ANTICH; DE VICENTE; JIMÉNEZ, 2020). As biotintas para bioimpressão 3D podem conter diferentes elementos, como hidrogéis, precursores de hidrogel, matrizes descelularizadas, células separadas,

microtransportadores de células, esferoides de células/tecidos, organoides ou moléculas bioativas (FONTES; MARCOMINI, 2020). Sendo importante ressaltar que a escolha da biotinta ideal depende do tipo de tecido que está sendo impresso e das suas características específicas.

Os hidrogéis são amplamente utilizados como biomateriais para a composição de biotintas na bioimpressão 3D devido às suas propriedades ajustáveis e capacidade de fornecer um ambiente extracelular favorável para várias funções celulares (LI *et al*, 2020). Os hidrogéis modificados são matrizes 3D com alta capacidade de reter água e que respondem a vários estímulos externos, como pH, força iônica, temperatura, luz, campo elétrico e magnético, tornando-se uma opção atraente para aplicações biomédicas (KUNDU; KUNDU, 2012; RUSTAD *et al*, 2012; WANG *et al*, 2015). Eles imitam o ambiente natural do tecido humano, proporcionando maior eficiência no transporte de massa, além de possuírem características únicas, como transição sol-gel controlável e memória de forma, que os diferenciam dos hidrogéis convencionais (CHANG *et al*, 2010; HOFFMAN, 2013).

Nas últimas décadas, vários hidrogéis sintéticos com excelentes propriedades mecânicas foram desenvolvidos graças à introdução de diferentes mecanismos de dissipação de energia (DUAN; ZHANG, 2017). Exemplos incluem hidrogéis de álcool polivinílico (PVA), (HASSAN; PEPPAS, 2000), hidrogéis com estrutura homogênea de macromônmeros do tipo tetraedro (SAKAI *et al*, 2008), nanocompósitos de hidrogéis da mistura de polímero e nanoargila (HARAGUCHI; TAKEHISA, 2002) e hidrogéis reforçados com microgel (HU *et al*, 2012).

Nos últimos anos, tem surgido interesse crescente pelos hidrogéis naturais, apesar das amplas capacidades dos polímeros sintéticos. Embora o desempenho mecânico limitado dos hidrogéis baseados em polímeros naturais ainda seja uma restrição significativa para suas aplicações médicas, novas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de hidrogéis de polímeros naturais com excelentes propriedades mecânicas e capacidade de resposta a estímulos, ampliando assim suas possibilidades de uso (ZHENG *et al.*, 2015). A utilização de polímeros naturais na fabricação de hidrogéis oferece várias vantagens, tais como a redução do impacto ambiental em comparação com polímeros sintéticos, a disponibilidade abundante de matérias-primas e a capacidade de promover interações biológicas favoráveis com tecidos e células. No entanto, é importante ressaltar que a seleção adequada do polímero natural e o desenvolvimento de métodos de processamento eficientes são desafios que devem ser enfrentados para otimizar as propriedades dos hidrogéis naturais e expandir suas aplicações na área biomédica.

A gelatina, conhecida por sua capacidade de gelificar sob determinadas condições de temperatura, é fundamental na formulação de hidrogeis, uma vez que a gelificação da gelatina pode ser controlada e ajustada para criar uma estrutura de rede tridimensional dentro do hidrogel, o que contribui para suas propriedades físicas e mecânicas, tornando-a adequada para diversas aplicações biomédicas. Por outro lado, o alginato é notável por sua característica de reticular, o que significa que ele é capaz de formar ligações iônicas com íons metálicos divalentes, como o cálcio. Essa propriedade é fundamental na fabricação de hidrogeis à base de alginato, pois a formação de ligações cálcio-alginato cria uma estrutura coesa que mantém a integridade do hidrogel (PARK *et al.*, 2020).

Tanto o PVA quanto o glicerol são substâncias comumente adicionadas aos hidrogeis. Eles ajudam a deixar o material mais flexível e resistente, melhorando suas propriedades mecânicas (SHI *et al.*, 2017). O PVA é um material com característica de elasticidade que atribui esse aspecto ao hidrogel devido à sua capacidade de formar redes tridimensionais estáveis, além da capacidade de retenção de água do hidrogel, o que é importante para aplicações biomédicas. Por outro lado, o glicerol é um líquido viscoso que aumenta a maleabilidade do material, tornando-se mais flexível e adaptável, e também pode apresentar capacidade de retenção de água do hidrogel. Esses aditivos podem ser importantes para garantir que o hidrogel tenha as características necessárias para sua aplicação.

Apesar das propriedades únicas do óxido de grafeno (OG), como sua alta área superficial e estabilidade química, que o tornam um material promissor para diversas aplicações, incluindo hidrogeis, existem desafios a serem superados. Esses desafios incluem a necessidade de melhorar a estabilidade do OG no ambiente biológico, além de avaliar e mitigar sua potencial toxicidade (LAZĂR *et al.*, 2023).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver e caracterizar hidrogéis de polímeros naturais, o alginato e a gelatina, adicionados de plastificantes como álcool polivinílico e glicerol, e investigar as características físico químicas e biológicas desses hidrogéis quando combinados com óxido de grafeno.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter hidrogéis de alginato e gelatina com características de injetabilidade;
- Obter hidrogéis de alginato e gelatina com adição dos plastificantes, álcool polivinílico e glicerol com características de injetabilidade;
- Obter hidrogéis de alginato e gelatina com adição do óxido de grafeno com características de injetabilidade;
- Definir o fluxo de viscosidade do material, através de um reômetro rotacional;
- Realizar testes de printabilidade para definição dos parâmetros dos hidrogéis para ajustar os parâmetros da impressora, através de um texturômetro;
- Analisar a hidrofiliabilidade dos hidrogéis por meio do grau de intumescimento e absorção da água;
- Caracterizar quimicamente e morfológicamente os hidrogéis empregando as técnicas de espectroscopia de infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar os efeitos adversos provocados pelo hidrogel nas células vivas por meio do ensaio de citotoxicidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Impressão 3D

3.1.1 Contextualização Histórica

Desde sua invenção na década de 80, a tecnologia da impressão tridimensional vem progredindo em um ritmo acelerado, impactando significativamente o mundo industrial e comercial com a proposta de produzir objetos a partir de modelos digitais criados em três dimensões através de impressoras 3D (SU; AL'AREF, 2018).

Os primeiros equipamentos começaram a surgir a partir da década de 80 no Japão no Instituto de Pesquisa Industrial do Município de Nagoya, local onde Hideo Kodama desenvolveu uma técnica de prototipagem rápida (PR), que permite transformar projetos digitais em objetos sólidos tridimensionais para a produção de peças de máquinas, modelos e protótipos, e o principal, de maneira rápida e generalizada (KODAMA, 1981; ONUH; YUSUF, 1999). Além dos protótipos, outros materiais como cerâmicas, ligas metálicas, plásticos também ingressaram nesse processo por ter características como a redução do número de etapas e processos na fabricação de um objeto, além da economia de material, uma vez que o material é produzido camada por camada, não havendo desperdício (RODRIGUES *et al*, 2017).

Empregando determinados critérios da prototipagem rápida, certas técnicas de fabricação podem ser classificadas como automatizadas, dando origem ao termo manufatura aditiva, que se trata de uma nova forma de fabricação, que é a produção de objetos tridimensionais pela adição de material, camada por camada, a partir de um modelo digital tridimensional, que normalmente é obtido através de um sistema *Computer Aided Design* (CAD) (RODRIGUES *et al*, 2017).

3.1.2 Etapas da Manufatura Aditiva

Algumas etapas são necessárias para a produção utilizando manufatura aditiva, entre elas está o CAD, que irá definir sua geometria por um modelo numérico através de um *software*, ferramenta que se baseia em um conjunto de mecanismos de pré-processamento que auxiliam o projetista na tomada de decisão, sendo capazes de realizar análises rápidas da geometria da peça, possibilitando a percepção de diferentes problemas e sua correção (ZHANG *et al*, 2019).

Em seguida, após a elaboração em CAD do modelo a ser trabalhado, o arquivo deve ser convertido para *Surface Tessellation Language* (STL), que é o formato aceito em equipamentos de manufatura aditiva, o padrão da indústria. Alguns *softwares* já fazem essa conversão automática no formato, exportando para a máquina o arquivo representando a peça (AHRENS *et al*, 2013).

Alguns parâmetros devem ser definidos para o correto funcionamento da máquina, quanto ao fatiamento do modelo a ser impresso, a espessura das camadas, diâmetro do bico, velocidade de impressão e a orientação da peça através do modelo numérico a ser utilizado, além da temperatura e pressão quanto ao processamento da impressão. Após isso, a produção é automatizada, necessitando de baixa supervisão humana, ocorrendo na garantia de suprimentos de materiais, descarga da máquina e para atuar em eventuais problemas. Ao fim da produção, a peça deve ser retirada, podendo ser requeridas atividades, como limpeza, pintura e tratamentos de superfícies, quando enfim, a peça estará pronta para ser usada em sua aplicação (PICANÇO RODRIGUES; DE SENZI ZANCUL; GONÇALVES MANÇANARES, 2017).

3.1.3 Adição de Célula na Impressão 3D

Em 2000, surge então a primeira tentativa de utilizar células em uma impressora. O professor Thomas Boland, na época professor assistente na Universidade de Clemson teve a ideia de modificar uma impressora *Hewlett-Packard* (HP), enchendo seu cartucho de tinta com colágeno e usando o material para estampar as suas iniciais em uma folha de silício (SCHMID, 2008).

A primeira empresa de bioimpressoras 3D é fundada em 2007, a Organovo, pelo laboratório do professor Gabor Forgacs da Universidade de Missouri, companhia com sede em San Diego. Em 2010, a Organovo fez um marco ao imprimir o primeiro vaso sanguíneo (VAIDYA, 2015). Foi nesse momento que a bioimpressão, termo utilizado para a impressão 3D combinada com a adição de células, começou a atrair a atenção do público em geral, com a promessa de utilizar conhecimento adquiridos em laboratório juntamente com técnicas de impressão 3D para desenvolver tecidos humanos *in vitro*. Tornando-se conhecida no mundo inteiro, foi vista com uma solução potencial para a escassez global de órgãos para transplante e também a redução de custos para a indústria farmacêutica. Diversas empresas a partir dali começaram o desenvolvimento com tecnologias similares aplicando em outros métodos.

3.2 Bioimpressão

Segundo Guillemot, Mironov e Nakamura (2010), a bioimpressão pode ser definida como a utilização de células e outros produtos biológicos na impressão por empilhamento para a montagem de tecidos a partir da deposição de camadas auxiliada por computador, podendo ser utilizada na medicina regenerativa, em estudos farmacocinéticos bem como em outros estudos biológicos.

Bioimpressões tridimensionais surgem com uma série de desafios na engenharia tecidual por se tratar de tecnologias não convencionais. O ramo da engenharia tecidual passou então a crescer significativamente, estudo que é uma ciência aplicada que utiliza os conhecimentos da biologia, química e física para desenvolver estruturas artificiais com o objetivo de replicar ou substituir tecidos ou órgãos humanos danificados, disfuncionais ou perdidos. Essas estruturas podem ser utilizadas para uma variedade de processos, como transplantes, testes de medicamentos, pesquisa científica e terapia personalizada (MATOZINHOS *et al*, 2017).

O objetivo da bioimpressão 3D é simular o ambiente de um determinado tecido biológico, direcionando as células a habitarem as estruturas designadas, regenerando o tecido ou órgão lesionado, e em um futuro não tão distante, a criação de órgãos completos. O biomaterial ideal para bioimpressão deve ser biocompatível, e biodegradável, com o intuito de criar espaço e ser substituído por tecido recém-sintetizado (YILMAZ *et al*, 2021). O material implantado deve fornecer ambiente biológico e funções biomecânicas próximas ao tecido ou órgão de origem do corpo.

Um termo que vem sendo utilizado e tem atraído cada vez mais atenção é o da bioimpressão 4D, que se acredita que seja a próxima geração de técnicas de biofabricação. A promessa é que seja capaz de fabricar estruturas biológicas 3D dinâmicas que podem ser estimuladas a mudar comportamentos usando materiais responsivos a estímulo, como luz, temperatura, pH e umidade por exemplo (ASHAMMAKHI; AHADIAN; ZENGJIE, 2018).

Como a bioimpressão é uma nova tecnologia que vem apresentando resultados promissores para a medicina regenerativa, sua capacidade de recriar substitutos de tecidos com as características adequadas e exclusivas depende da abordagem adotada e quando pertinente na escolha de um biomaterial ideal. Os biomateriais ideais usados em hidrogéis ou biotintas para a fabricação de tecidos vascularizados não devem apenas ser capazes de formar estruturas 3D com alta resolução, mas devem apresentar propriedade mecânica adequada e biodegradabilidade para atuar como uma estrutura de suporte, além de possuir boa biocompatibilidade e baixa citotoxicidade para facilitar o crescimento celular (CROOK, 2020).

3.2.1 Evolução de Imagens 2D para o CAD 3D

Similar ao processo da impressão 3D, a bioimpressão 3D também necessita de algumas etapas para a sua execução de acordo com o método a ser trabalhado, como a necessidade de transformar imagens de tecidos, órgãos em formato digital no modelo CAD para sua utilização, seja na leitura dos arquivos, apresentando uma informação mais detalhada em relação às morfologias das estruturas internas, e que tenha a finalidade de auxiliar no planejamento de cirurgias, como para a própria impressão.

A criação de modelos tridimensionais em formato digital leva à Prototipagem Rápida Médica (PRM), definida como a fabricação de modelos físicos tridimensionais precisos da anatomia humana, sendo derivados de dados de imagens médicas usando tecnologias de prototipagem rápida. A fonte de dados de imagem para modelagem 3D é principalmente a Tomografia Computadorizada (TC), embora a ressonância magnética e o ultrassom também sejam utilizados (WINDER; BIBB, 2005).

A PRM foi descrita originalmente por Mankovich, Cheeseman e Stoker (1990). O desenvolvimento da técnica foi facilitado por melhorias na tecnologia de imagens médicas, hardware de computador, software de processamento de imagens tridimensionais e transferência de tecnologia de métodos de engenharia no campo da cirurgia (THOMPSON; MASKERY; LEACH, 2016).

A criação de modelos médicos requer uma série de etapas: aquisição de dados de imagem volumétrica (3D) de alta qualidade da anatomia a ser modelada; processamento de imagem 3D para extrair a região de interesse dos tecidos circundantes; modelagem matemática das superfícies anatômicas, formatação de dados para prototipagem rápida; e a construção do modelo. Etapas que requerem especialização e conhecimento em imagens médicas, processamento de imagens médicas em 3D e software de design (WINDER; BIBB, 2005).

3.2.2 Método de Extrusão para Bioimpressão 3D

O processo de bioimpressão induz a níveis adicionais de complexidade, como a escolha de materiais, tipo de célula, fatores de crescimento e diferenciação e desafios técnicos relacionados às sensibilidades celulares. A característica em comum entre as tecnologias é que elas funcionam adicionando camadas de material, uma sob a outra, até formar o objeto final. O que diferencia são os aspectos físicos, quanto ao tipo de método e a matéria prima utilizada.

O método da extrusão está relacionado com a ação de forçar a passagem de um material através de um orifício por meio de pressão pneumática, como mostra a Figura 1, atribuindo forma e determinadas características como a capacidade de moldar diferentes formas e geometrias, incluindo tubos, fios, perfis e chapas, de acordo com o design desejado (PATI *et al*, 2015). De forma geral, o método de impressão 3D por extrusão é composto por um cabeçote extrusor, que se movimenta em dois eixos, é depositado o filamento de material termoplástico derretido sobre uma plataforma aquecida que se desloca para baixo, representando o terceiro eixo. O material vai aderindo em cima das camadas que já foram impressas, repetindo o processo até a finalização da peça (JIANG *et al*, 2019).

A bioimpressão 3D por extrusão é uma abordagem inovadora que combina a precisão da impressão 3D com a capacidade de incorporar células vivas durante o processo de extrusão. Assim, a bioimpressão 3D por extrusão permite a criação de estruturas tridimensionais complexas e personalizadas, onde as células são posicionadas de forma controlada, possibilitando a fabricação de tecidos e órgãos funcionais (YILMAZ; AL RASHID; MOU, 2021).

Alguns componentes são essenciais e desempenham funções importantes. O reservatório, local onde a biotinta será mantida até ser extrudada, conjunto de eixos móveis, o próprio mecanismo de extrusão, o orifício de extrusão, que pode ser de metal ou plástico, apresentando grande importância, pois possui grande impacto na resolução final da bioimpressão, podendo ter sua propriedade mecânica final alterada. Além da superfície da impressora 3D, onde o material será depositado, podendo ser de plástico, vidro ou silicone, dependendo da finalidade (PATI; JANG; LEE, 2015).

Dois mecanismos são usados para extrudar os materiais através do bico de impressão, o pneumático, que usa pressão de ar, como o gás comprimido e o mecânico, usando um pistão ou parafuso. A semelhança entre eles é que ambos consistem na aplicação de pressão contínua para extrudar o material, diferenciando em algumas características específicas para cada método que impactam na propriedade final. A capacidade de usar altas pressões com esse método, permite que os profissionais da área imprimam materiais altamente viscosos (KAČAREVIĆ *et al*, 2018).

e no controle de propriedades mecânicas e sobrevivência celular após extrusão (BOCIAGA; BARTNIAK; GRABARCZYK, 2019). Billiet, Gevaert e De Schryver (2014) utilizaram hepatócitos com hidrogel de gelatina metacrilada para projetar estruturas de tecido de fígado artificial, com viabilidade celular variando até 97%. Horvath (2015) demonstrou a bioimpressão de tecidos pulmonares análogos pela primeira vez.

3.3 Biotinta

A busca por materiais viáveis e adequados para atuar como *scaffolds*, bem como a necessidade de projetar as células durante o processo de bioimpressão, visando alcançar propriedades mecânicas e funcionais necessárias na construção do tecido, representa um desafio complexo e significativo. Surgindo assim a biotinta, material adequado para ser processado por uma tecnologia de bioimpressão (OVSIANIKOV; KHADEMHOSEINI; MIRONOV, 2018).

As biotintas, ou *bioinks*, são ferramentas importantes para a fabricação de estruturas de tecidos vivos capazes de imitar as propriedades de tecidos do corpo humano por meio de tecnologias de bioimpressão 3D. As biotintas devem fornecer um ambiente propício para que as células se mantenham viáveis e, ao mesmo tempo, garantir a estabilidade estrutural e conformacional do órgão ou tecido em potencial. Sendo necessário que tenham determinadas características como ser extrudada de forma controlada para gerar formas cilíndricas ou gotículas rápidas, apresentar propriedades de cisalhamento para fluir sob uma força, mas de manter a forma sem carga e a capacidade de fazer ligações cruzadas para evitar dissolução e manter sua forma quando estiver atuando em múltiplas camadas ou empilhadas (HOSPODIUK *et al*, 2017).

Classificadas em polímeros naturais ou sintéticos ou uma combinação que destaque as propriedades favoráveis de ambos os componentes, as biotintas podem ser compostas por células ou por um hidrogel de biopolímero transportador adicional que envolve as células, que se ligam ao hidrogel e podem crescer, se espalhar e proliferar (CHIMENE; KAUNAS; GAHARWAR, 2020).

3.3.1 *Scaffold free e scaffold based*

Algumas abordagens para as biotintas foram criadas na engenharia de tecidos, abrangendo novas oportunidades para o crescimento de célula em cultura e na criação de

modelos tridimensionais semelhantes a tecidos. Essas biotintas são classificadas como *scaffold free* e *scaffold based*.

As biotintas *scaffold free* apresentam um método alternativo, desenvolvido para combater alguns problemas como degradação, adaptação, resposta imunológica, toxicidade, e consiste na não utilização de *scaffolds*, as células são aderidas direto no microambiente na superfície do polímero termo-responsivo, consistindo na suspensão de células, camadas de célula, esferoides de célula e impressão de célula (HUSSAIN; PEI, 2021; TAN *et al*, 2014).

As biotintas *scaffold based* utilizam os *scaffolds* como uma estrutura de suporte em que as células irão crescer. São produzidas de biomateriais que vão, eventualmente se degradar e as células irão se desenvolver na cobertura e formar os tecidos, consistindo em membranas biológicas, *scaffolds* de nanofibra, camadas de células em *scaffold*, *scaffolds* híbridos, *scaffolds* bioimpressos e *scaffolds* de hidrogel (AHMAD; OLIVEIRA; MUMTAZ, 2020).

Os *scaffolds* de hidrogel são redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos reticulados, capazes de reter grande quantidade de água, capazes de desempenhar um comportamento elástico que é regido pela estrutura do polímero. Por apresentar uma quantidade baixa de polímero em relação à massa total do hidrogel, redes altamente porosas podem ser comuns, permitindo a difusão de nutrientes, oxigênio e biomoléculas, além da proliferação celular e conectividade, proporcionando um ótimo meio para crescimento de um tecido (SPICER, 2020).

3.4 Hidrogeis

Os hidrogeis, utilizados para obtenção de uma biotinta devem apresentar algumas características, como a capacidade de impressão, que está relacionada com a resolução, fidelidade de forma e viabilidade celular, fatores esses que são ajustados através das propriedades do material, como viscosidade, tensão superficial e mecanismo de reticulação. O material escolhido deve atender essas propriedades para ter atributos de printabilidade. Com o intuito de obter forma, rigidez, elasticidade e outras características, suas propriedades mecânicas devem ser levadas em consideração. Além disso, a capacidade de absorver água é uma propriedade importante que os hidrogeis possuem, pois o alto conteúdo de água reduz a probabilidade de ocorrer inflamação ou uma eventual rejeição de implantes de biomateriais.

A procura por hidrogeis baseados em polímeros de origem natural tem aumentado devido às potenciais vantagens, como biocompatibilidade com células, não-toxicidade e capacidade de biodegradação. Isso tem motivado os pesquisadores envolvidos na área da bioimpressão 3D a explorar diferentes soluções. Os hidrogeis podem ser preparados a partir de

uma variedade de biomateriais, como alginato, colágeno, quitosana, entre outros, o que oferece oportunidades para o desenvolvimento de hidrogéis com propriedades específicas, adaptadas às necessidades da engenharia tecidual e regeneração de órgãos.

3.4.1 Polímeros Naturais

Os compostos de polímeros naturais são frequentemente empregados em tecidos contendo colágeno, como cartilagem, osso e pele (HELARY *et al*, 2010). Os hidrogéis à base de fibrina são amplamente utilizados em aplicações cardiovasculares, já os de elastina, são empregados para a engenharia de cartilagem e tecido neural (ZHU *et al*, 2017).

Polímeros naturais como alginato, colágeno, fibrina, gelatina e quitosana chamam a atenção da comunidade científica por possuírem excelente biocompatibilidade, o que permite que sejam formulados com células para formar hidrogéis para biotinta. Além disso, eles são adequados pois oferecem um ambiente favorável para mimetizar o ambiente da matriz extracelular natural dos tecidos, levando a um crescimento e função celular eficazes, resultando então em uma regeneração de tecido eficaz. No entanto, eles não possuem propriedades mecânicas necessárias para manter a integridade estrutural dentro do microambiente *in vivo*, podendo ser imprevisíveis e instáveis, levando a dificuldades na bioimpressão, estruturas teciduais menos rígidas e menor suporte para as células no tecido (TANAN; PANICHPAKDEE; SAENGSUWAN, 2019).

3.4.1.1 Alginato

O alginato, também chamado de ácido algínico ou algina, é um polissacarídeo normalmente derivado de algas, material marinho de baixo custo e comumente obtido das paredes celulares de algas marrons. Hidrogéis à base de alginato tem sido amplamente utilizados na bioimpressão principalmente por conta de sua biocompatibilidade e porosidade, que permite a proliferação das células. Normalmente são utilizados para se degradar gradualmente *in vivo*, sendo substituídos pela matriz extracelular produzida pelas células (KULKARNI, 2012). Trata-se de um biopolímero não-tóxico e não-imunogênico, com capacidade de reticulação e taxa de degradação rápida, o alginato se torna uma das opções ideais para formulação de biotintas por ter a característica de prender, se necessário, a água e outras moléculas na sua matriz extracelular de alginato, sendo capaz de se difundir. A viscosidade de um hidrogel à base de alginato depende da concentração do material, o peso molecular utilizado

– comprimento das cadeias de alginato, a densidade celular e fenótipo das células (AXPE; OYEN, 2016).

Algumas aplicações de recentes avanços na bioimpressão 3D utilizam o alginato como um dos componentes da biotinta: vascularização de tecidos (GAO *et al*, 2015; YU *et al*, 2013; ZHANG *et al*, 2013), regeneração de tecidos osteocondrais (ARMSTRONG; BURKE; CARTER, 2016; SHIM *et al*, 2012; WANG *et al*, 2014) e regeneração de cartilagens (IZADIFAR *et al*, 2016; KUNDU *et al*, 2015; MARKSTEDT *et al*, 2015).

A bioimpressão apresenta alguns desafios como a construção de órgãos vascularizados tridimensionais, que é indispensável para apoiar a viabilidade celular no transporte de nutrientes e perfusão de oxigênio. Zhang *et al* (2013) apresenta uma nova abordagem para a fabricação de canais microfluídicos semelhantes a vasos com potencial para serem utilizados em tecidos espessos ou na própria fabricação de órgãos no futuro. Foi investigada a fabricação de canais microfluídicos imprimíveis que suportassem a integridade mecânica e permitissem o transporte de fluídos em 3D com diferentes combinações de alginato, como o alginato de sódio, que é o próprio sal de sódio do alginato amplamente utilizado em aplicações da engenharia tecidual.

O aprimoramento das bioimpressoras focando na regeneração de tecidos osteocondrais vem sendo realizado através do uso do biomaterial termoplástico policaprolactona (PCL) misturado com soluções de alginato. O estudo conduzido por Shim *et al* (2012) teve como objetivo construir uma bioimpressora contendo dois tipos de células diferentes para regeneração de tecido osteocondral. Similar ao processo de regeneração de tecidos osteocondrais, em que se utiliza PCL, estudos recentes contribuem para a possibilidade de utilizar hidrogéis de alginato encapsulado com células de condrócitos para regeneração de cartilagem (KUNDU *et al*, 2015).

O alginato comumente apresenta desafios em relação à viabilidade celular. No entanto, estudos tem explorado alternativas, como o uso de alginato modificado, que possibilita a impressão com baixa concentração do material (OOI *et al.*, 2018). Essa abordagem otimiza a deposição precisa das células e hidrogéis, resultando em maior viabilidade celular pós-bioimpressão. A modificação também pode aprimorar propriedades físicas e químicas, promovendo um ambiente mais favorável ao crescimento e diferenciação celular, contribuindo assim para avanços na engenharia de tecidos através da bioimpressão.

3.4.1.2 Gelatina

A gelatina é uma proteína que tem sido amplamente utilizada nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosmética devido à sua excelente biocompatibilidade, fácil

biodegradabilidade e baixa antigenicidade. A gelatina é obtida pela desnaturação térmica do colágeno de pele de animais, ossos e, raramente, escamas de peixe. As fontes de produção mais abundantes do material são de pele de porco, ossos de porco e bovinos e couros (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2009).

Sua composição é semelhante à do colágeno, sofrendo algumas alterações devido ao processo de fabricação. A diferença na estrutura do colágeno e da gelatina é por causa da organização parcial das hélices que, em relação ao colágeno, sofre mudança de conformação no aquecimento das suas fibras, que levam ao desenvolvimento de hélices que são recuperadas parcialmente no resfriamento (THAKUR *et al.*, 2017).

Se tratando de uma proteína que possui propriedades de formação de filme, por exemplo filmes comestíveis de vegetais e como agente encapsulante de substâncias bioativas, a gelatina pode ser candidata para a pele artificial. Pal, Banthia e Majumdar (2007) desenvolveram uma membrana de hidrogel por meio da esterificação do grupo hidroxila do poliálcool vinílico (PVA) com o grupo carboxila da gelatina. Os resultados indicaram completa esterificação dos grupos carboxílicos livres da gelatina, além de boa resistência mecânica e capacidade de absorção de água. As membranas mostraram-se hemocompatíveis, sugerindo sua utilização potencial como curativos e sistemas de liberação de medicamentos implantáveis. Esses resultados destacam a viabilidade dos hidrogeis de PVA-gelatina como materiais para diversas aplicações biomédicas (PAL; BANTHIA; MAJUMDAR, 2007).

Ao ser resfriada, a gelatina aquosa passa por uma transição sol-gel em cerca de 40°C, durante a qual suas cadeias enroladas se transformam em hélices triplas para formar um gel estabilizado por ligações de hidrogênio. O material sofre adsorção e dessorção para se ajustar à umidade relativa de seu ambiente, embora em períodos mais longos, o hidrogel pode sofrer vitrificação, tornando-se seco e quebradiço pela eliminação do solvente aquoso. As ligações cruzadas físicas formadas durante essa gelificação são termorreversíveis, mas ligações cruzadas enzimáticas adicionais podem ser induzidas usando transglutaminase para facilitar a formação de ligações peptídicas (BROUGHAM; JOHNSON, 1981; SANWLANI; KUMAR; BOHIDAR, 2011).

Saraiva *et al.* (2015) propuseram a caracterização de um hidrogel de quitosana e gelatina. Esses hidrogeis mostraram-se promissores para aplicações como agentes de preenchimento ou veículos de liberação de moléculas bioativas e células. Através de análises morfológicas, físico-químicas e biológicas, os pesquisadores demonstraram as propriedades adequadas desses hidrogeis.

A extrusão é um processo utilizado para moldar o hidrogel em uma forma desejada, no caso da gelatina, ao realizar o processo em um ambiente frio, o hidrogel mantém sua forma com maior facilidade devido à rigidez adquirida durante o resfriamento. Isso é especialmente útil quando se deseja obter hidrogéis com estruturas mais precisas e definidas, como fios ou filamentos. Quando a gelatina é submetida a temperaturas mais baixas, ocorre uma redução na mobilidade das moléculas e uma maior interação entre elas. Isso favorece a formação de ligações físicas e a geração de uma rede tridimensional mais coesa. Além disso, a diminuição da temperatura também acelera o processo de gelificação, permitindo um melhor controle da formação do hidrogel (PARK *et al.*, 2020).

3.4.2 Plastificantes

Os plastificantes são aditivos utilizados para aumentar a flexibilidade e extensibilidade de materiais poliméricos, melhorando propriedades mecânicas e de manuseio. No caso dos hidrogéis, são importantes para melhorar a capacidade de processamento e a eficácia para aplicações biomédicas, mas sua escolha deve levar em consideração o tipo de aplicação e a biocompatibilidade afetar propriedades do hidrogel, como sua capacidade de liberação ou o suporte a células na engenharia tecidual (YE *et al.*, 2023).

3.4.2.1 Álcool polivinílico (PVA)

O álcool polivinílico é um polímero termoplástico obtido pela hidrólise do poli(acetato de vinila) (PVAc), e não por processos de polimerização como alguns outros polímeros sintéticos. A transformação do PVAc em PVA é obtida pela alcoolização catalisada por base ou pela hidrólise iniciada por ácido. O PVA é o polímero sintético mais polar, é inodoro, atóxico, biocompatível e solúvel em água, ácidos e solventes altamente polares (FELDMAN, 2020).

Sendo um polímero sintético solúvel em água, se nenhuma medida for tomada contra altas temperaturas, exposição à luz, microorganismos, o PVA pode se degradar no ambiente por fotodegradação, biodegradação e degradação química. A rede de ligação cruzada física reduz a absorção de água e melhora a resistência à água. Devido à forte interação matriz de preenchimento, o compósito possui uma característica de decomposição térmica mais alta e melhores propriedades mecânicas e dinâmicas (HUANG *et al.*, 2019).

É um material que pode ser utilizado como materiais promissores para hidrogéis e suportes de cultura de tecidos em aplicações biomédicas e farmacêuticas (CONSTANTIN *et al.*,

2004; SINHA *et al.*, 2007; XIAO; YANG, 2006). Ele é biocompatível e capaz de induzir o crescimento de tecidos circundantes para as células transplantadas se fixarem (GOMES *et al.*, 2002).

3.4.2.2 Glicerol

O glicerol é gerado pela hidrólise de triglicerídeos, predominantemente produzido no processo de saponificação ou produção de biodiesel. Ele se apresenta como um líquido claro, incolor, inodoro, viscoso e higroscópico, e tem se tornado cada vez mais atraente devido à sua ampla gama de aplicações na indústria alimentícia (plastificante, estabilizante e emulsificante) e como um umectante em formulações cosméticas (ANKER; STADING; HERMANSSON, 2001; BROUGHAM; JOHNSON, 1981; PIAO; ADACHI, 2006). Além disso, tem demonstrado ter um papel importante como plastificante para a geração de estruturas hiper-ramificadas. No entanto, poucos estudos anteriores investigaram o uso de glicerol como agente de reticulação para ajustar a densidade de uma rede polimérica a fim de alcançar um comportamento de liberação sustentada.

O glicerol é frequentemente usado como plastificante devido à sua compatibilidade e solubilidade em água, podendo ser introduzido como plastificante para melhorar ainda mais as propriedades mecânicas do gel e contrariar os efeitos de vitrificação. Ao ser usado em conjunto com hidrogéis de gelatina, o glicerol não afeta o mecanismo de gelificação, mas melhora a elasticidade, flexibilidade e sensibilidade à umidade, reduzindo as interações entre cadeias adjacentes de gelatina (YAN *et al.*, 2017).

Em um estudo conduzido por Shintake, Sonar e Piskarev (2017), foram testadas várias amostras utilizando diferentes proporções de gelatina e glicerol, com tempos de secagem de 48 horas, a fim de reduzir o teor de água. O objetivo principal desse estudo era avaliar se a combinação desses materiais poderia apresentar características mecânicas semelhantes às dos elastômeros de silicone.

Hughes e Rus (2020) exploraram o uso de um teor mais elevado de glicerol para desenvolver um material que se biodegrada em água quente. Essa abordagem mostrou-se promissora para a criação de atuadores degradáveis e não conectados. Os resultados obtidos demonstraram a viabilidade desse material na geração de atuadores com propriedades degradáveis, oferecendo novas possibilidades para aplicações futuras nessa área.

No estudo conduzido por Hardman, George Thuruthel e Lida (2022), foi realizado o desenvolvimento de um hidrogel de gelatina e glicerol para aplicações de sensoriamento

flexível. Os resultados experimentais obtidos demonstraram a viabilidade e a eficácia dos hidrogéis iônicos em dispositivos vestíveis e tecnologias robóticas flexíveis para o sensoriamento de deformação, umidade e temperatura. Além disso, destacou-se a capacidade parcial de autorregeneração desses hidrogéis à temperatura ambiente, conferindo-lhes uma propriedade adicional de autorecuperação.

3.5 Óxido de Grafeno (OG)

O óxido de grafeno é um material derivado do grafeno, umas das formas alotrópicas do carbono. É composto por uma folha de grafeno com grupos funcionais de oxigênio covalentemente ligados, o que lhe confere características únicas, como alta condutividade elétrica e térmica, alta resistência mecânica, baixa densidade e alta superfície específica (LAZĂR; AGHASOLEIMANI; SEMERTSIDOU, 2023).

Na área da impressão 3D, o óxido de grafeno tem sido utilizado como aditivo em hidrogéis para melhorar suas propriedades mecânicas, condutividade elétrica e capacidade de retenção de água. Essas propriedades são especialmente relevantes para a produção de tecidos e órgãos artificiais que requerem alta biocompatibilidade, estabilidade mecânica e interação com células vivas. Além disso, o óxido de grafeno tem sido utilizado como um material de bioimpressão, que permite a produção de estruturas tridimensionais com alta precisão e resolução, bem como a capacidade de incorporar células e fatores de crescimento para regeneração de tecidos. No entanto, ainda são necessárias mais pesquisas para avaliar a segurança e eficácia desses materiais em aplicações biomédicas específicas (MA *et al*, 2021).

Alguns estudos recentes têm explorado o uso de hidrogéis contendo óxido de grafeno em diversas aplicações biomédicas. Li, Liu e Crook (2020) demonstraram a combinação do óxido de grafeno com *scaffolds* de alginato impressos em 3D para suporte de células tronco adiposas humanas (ADSC) e indução osteogênica. O alginato foi impresso com adição da gelatina, que foi removida após a impressão e a estrutura foi revestida com óxido de grafeno, mostrando boa citocompatibilidade e foi capaz de suportar a proliferação e diferenciação osteogênica de ADSCs humanas.

No estudo de Luu, Nguyen e Le (2022) foi desenvolvida uma formulação de hidrogel que consistia em alginato de sódio e óxido de grafeno para prolongar a liberação de lidocaína, um anestésico local, podendo ser um biomaterial potencial para a liberação controlada de anestésicos locais. Esta pesquisa revelou que os hidrogéis reforçados com óxido de grafeno

apresentaram uma liberação mais prolongada em comparação com hidrogeis de alginato de sódio.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

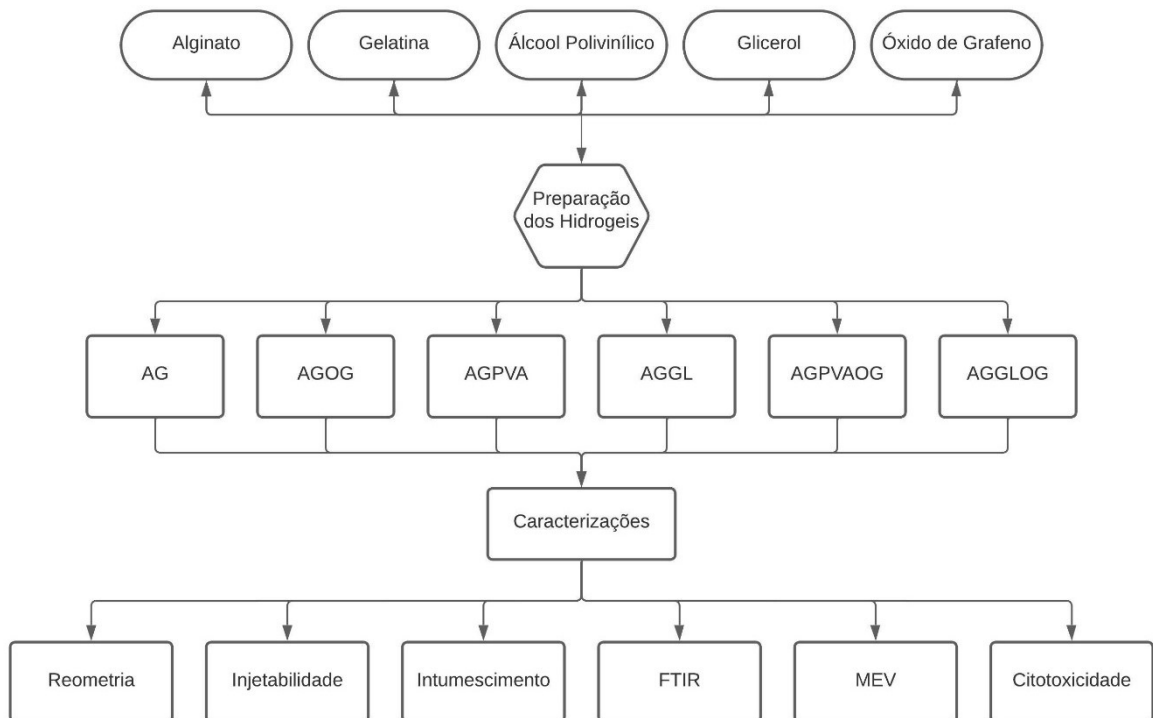
Para o desenvolvimento deste trabalho utilizou-se: Alginato de sódio P.A. ($C_6H_7(NaO)_6$)_n, Dinâmica ®; Gelatina suína (260 bloom – 40 Mesh), Gelita do Brasil; Álcool Polivinílico P.S. (C_2H_4O)_n, Dinâmica ®; Glicerol G5516-1L, Sigma-Aldrich ®; Fosfato de sódio monobásico 100 mM, Dinâmica ®; Fosfato de sódio bibásico 100 mM, Dinâmica ®; Cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), Dinâmica ®.

O óxido de grafeno foi obtido no laboratório utilizando o método de Hummers modificado (GUERRERO-CONTRERAS; CABALLERO-BRIONES, 2015), com técnicas verdes de acordo com metodologia adotada por Vercik (2021).

4.2 Fluxograma

As etapas do trabalho estão esquematizadas no fluxograma da Figura 2.

Figura 2: Fluxograma representando as etapas do desenvolvimento experimental do trabalho



Fonte: Autoria própria.

4.3 Preparação dos hidrogeis

O desenvolvimento experimental deste estudo foi realizado no Laboratório de Biomateriais do Grupo de Materiais (GMAT) do Departamento de Ciências Básicas (ZAB) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) na cidade de Pirassununga – SP (Brasil). As caracterizações por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), do Departamento de Zootecnia (ZAZ), e os ensaios de curva de fluxo com reômetro rotacional foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Biopolímeros (Biopolitec), e os ensaios de injetabilidade com texturômetro foram realizados no Centro Multiusuário de Funcionalidade de Macromoléculas (CEMFUM) ambos no Departamento de Engenharia de Biosistemas (ZEB). Todos os laboratórios estão localizados na mesma faculdade.

As formulações dos hidrogeis estão descritas na Tabela 1 levando em consideração a sua composição e as respectivas concentrações utilizadas em (m/v).

Tabela 1: Formulações dos hidrogeis

Hidrogel	Alginato (3%)	Gelatina (10%)	Glicerol (2%)	Álcool Polivinílico (3%)	Óxido de Grafeno (0,10%)
AG	x	x			
AGOG	x	x			x
AGPVA	x	x		x	
AGGL	x	x	x		
AGPVAOG	x	x		x	x
AGGLOG	x	x	x		x

Fonte: Autoria própria.

4.3.1 Formulação contendo alginato de sódio e gelatina (AG)

Foram preparados hidrogeis usando alginato de sódio 3% (m/v) e gelatina suína 10% (m/v) em uma solução de fosfato de sódio (PBS) com pH 7,4. Inicialmente a gelatina foi solubilizada na solução de PBS à temperatura de 45°C sob agitação mecânica, após completa solubilização adicionou-se o alginato de sódio e manteve-se a temperatura e a agitação até completa homogeneização. Essas amostras foram identificadas como AG.

4.3.2 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina e óxido de grafeno (AGOG)

Foram preparados hidrogeis utilizando alginato de sódio e gelatina suína, conforme descrito na seção 4.3.1. Antes de adicionar o óxido de grafeno, foi necessário solubilizá-lo em água destilada utilizando um sonicador por um período de 1 hora. Após essa etapa de solubilização, adicionou-se uma solução de OG 0,10% (m/v) à mistura de alginato de sódio e gelatina à temperatura de 45°C sob agitação mecânica para completa homogeneização. Essas amostras foram identificadas como AGOG.

4.3.3 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA)

Foram preparados hidrogeis utilizando alginato de sódio e gelatina suína, conforme descrito na seção 4.3.1. Nesse processo, o PVA foi adicionado à solução antes do alginato de sódio, permitindo que se dissolvesse juntamente com a gelatina sob a influência da temperatura. Em seguida, o alginato de sódio foi adicionado à solução. A mistura foi agitada continuamente por 30 minutos para assegurar uma homogeneização eficaz. Essas amostras foram identificadas como AGPVA.

4.3.4 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina e glicerol (AGGL)

Foram preparados hidrogeis utilizando alginato de sódio e gelatina suína, conforme descrito na seção 4.3.1. Após a adição do alginato de sódio, o glicerol foi incorporado à solução. A agitação foi mantida por 30 minutos para garantir uma homogeneização eficiente. Essas amostras foram identificadas como AGGL.

4.3.5 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG)

Foram preparados hidrogeis utilizando alginato de sódio e gelatina suína, conforme descrito na seção 4.3.1. O óxido de grafeno foi preparado seguindo o procedimento descrito na seção 4.3.2. Na preparação da solução, a ordem de adição seguiu o descrito na seção 4.3.3., em que o PVA foi adicionado antes do alginato de sódio, seguido pelo alginato de sódio e, por fim, o óxido de grafeno. A mistura foi agitada continuamente por 30 minutos para assegurar uma homogeneização adequada. Essas amostras foram identificadas como AGPVAOG.

4.3.6 Formulação contendo alginato de sódio, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG)

Foram preparados hidrogéis utilizando alginato de sódio e gelatina suína, de acordo com as instruções descritas na seção 4.3.1. O óxido de grafeno foi preparado seguindo o procedimento descrito na seção 4.3.2. Durante a preparação da solução, a ordem de adição após a gelatina foi a seguinte: primeiro o alginato de sódio, seguido pelo óxido de grafeno e, por fim, o glicerol. A mistura foi agitada de forma contínua por 30 minutos para garantir uma homogeneização eficiente. Essas amostras foram identificadas como AGGLOG.

4.4 Etapa de extrusão das formulações utilizando seringa descartável

As formulações obtidas nos itens 4.3 foram colocadas, ainda sob temperatura de aproximadamente 45°C, em seringas descartáveis (Figura 3). Após resfriamento até a temperatura ambiente, o material foi extrudado em placas de Petri (Figura 4) mantidas na temperatura de 7°C (Figura 5). Após a finalização da extrusão, adicionou-se cloreto de cálcio (CaCl₂) 2% (m/v) na placa de Petri para reticulação do alginato de sódio. Após um período de 30 min o material foi retirado da solução de cloreto de cálcio e armazenado em dessecador à temperatura ambiente para secagem por 48 horas.

Figura 3: Seringa descartável com amostra AGOG



Fonte: autoria própria.

Figura 4: Hidrogel AG após extrusão pela seringa



Fonte: Autoria própria.

Figura 5: Ambiente com temperatura de 7°C



Fonte: autoria própria.

4.5 Ensaio de curva de fluxo com reômetro rotacional

Para o ensaio de curva de fluxo, foi utilizado o reômetro compacto modular Anton Paar MCR-92 (Figura 6) no modo oscilatório, rampa de temperatura à 35°C, com geometria de placas paralelas com 50 mm de diâmetro, separados por uma distância de 1 mm. As amostras foram colocadas na placa inferior. Durante o ensaio, foram coletados dados de viscosidade e taxa de cisalhamento para análise.

Figura 6: Ensaio de curva de fluxo com reômetro rotacional



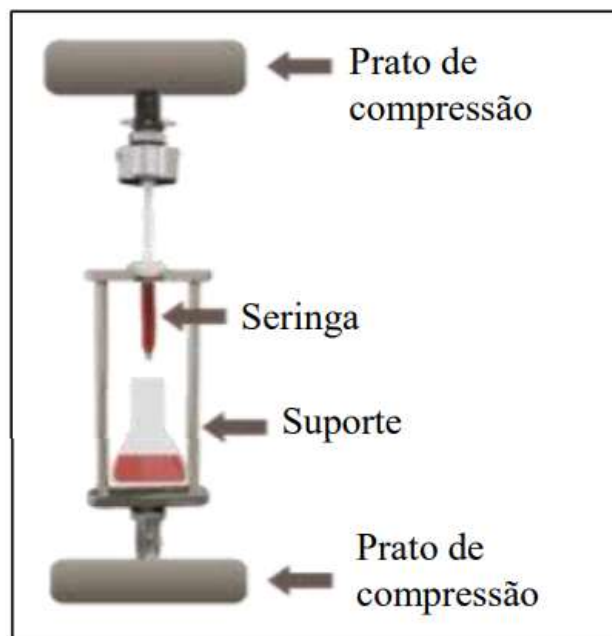
Fonte: autoria própria.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Biopolímeros (Biopolitec) do Departamento de Engenharia de Biosistemas (ZEB) da USP, campus Pirassununga.

4.6 Ensaio de Injetabilidade

Para determinar a injetabilidade dos materiais preparados, foi utilizado um texturômetro (Texture Analyser TA-TXplus). O processamento dos dados foi realizado através do *software* Texture Expert Exceed 2.64. Os testes foram realizados em temperatura ambiente pelo acoplamento (Figura 7) de seringas descartáveis de 20 mL e para cada tipo de formulação o ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como média, desvio padrão e intervalo de confiança. As condições de ensaio foram as seguintes: a força (N) necessária para a injetabilidade do hidrogel foi determinada em 50N e uma taxa de velocidade de 50 mm/min. A garra de compressão pressionada o êmbolo da seringa. A injetabilidade se deu em um período aproximado de 44 seg., método adaptado segundo (CUNHA, 2009).

Figura 7: Representação esquemática do aparato para teste de injetabilidade



Fonte: Moreira (2018)

Para o cálculo da taxa de injetabilidade foi utilizado o método adaptado por Chen e Taguchi (2019). Neste método foi utilizada a pesagem como parâmetro para coleta de dados. Cada seringa foi carregada com uma quantidade média de 15 mL de hidrogel, cada ensaio foi iniciado depois de decorridos 8 min do aquecimento da solução na seringa em banho maria. Neste processo, foi observado se o hidrogel foi injetado completamente e se durante a injetabilidade ocorreu segregação do material, simulando aplicabilidade do material. A equação (1) demonstra o cálculo realizado.

$$\text{Injetabilidade}(\%) = \left(\frac{(M1 - M0) - (M2 - M0)}{(M1 - M0)} \right) \quad (1)$$

Onde M0 representa o peso da seringa sem conteúdo, M1 refere-se ao peso da seringa com o material e M2 o peso da seringa após a injeção do material.

Para análise qualitativa da injetabilidade, foi observado o comportamento do hidrogel durante o processo de injetabilidade através da pressão do equipamento sobre a seringa descartável. Nesse processo foi observado se o material foi injetado completamente e se durante a injetabilidade ocorreu separação de fase.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Multiusuário (CEMFUM) do Departamento de Engenharia de Biosistemas (ZEB) da USP, campus Pirassununga.

4.7 Ensaio do Grau de Intumescimento

Para o ensaio do grau de intumescimento, os hidrogéis secos, foram previamente cortados e armazenados em dessecador com sílica por 24h para remoção completa de umidade e, em seguida, sua massa inicial foi determinada em balança analítica e imersos diretamente em 5 mL de uma solução tampão fosfato de sódio (10 mM) de pH 7.4 à temperatura de 37°C em tempos pré-determinados (0,5, 1, 4, 6, 24 e 48h), em triplicata. Após este período, o excesso de tampão foi removido levemente com papel de filtro por cerca de 5 segundos. Com o auxílio de uma balança analítica, foram determinadas as massas para o cálculo do grau de intumescimento (Q) dos hidrogéis na equação (2):

$$Q = [(M_t - M_s)/M_t] \times 100 \quad (2)$$

Onde M_t é a massa do hidrogel intumescido, e M_s é a massa do hidrogel seco.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biomateriais do Grupo de Materiais (GMAT) do Departamento de Ciências Básicas (ZAB) da USP, campus Pirassununga.

4.8 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) é utilizada para identificar grupos funcionais e determinar a composição de amostras. Neste

estudo, foram obtidos espectros de FTIR através da técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR) em cristal, permitindo a transmissão direta da amostra. Os materiais foram analisados na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , com uma resolução de 2 cm^{-1} , após acumulações de 64 varreduras (Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrun One, Perkin Elmer, USA). Os espectros foram coletados no *software* Spectrun One (versão 5.3) e plotados utilizando o *software* OriginPro 2023. Os resultados foram comparados com dados disponíveis na literatura para análise e interpretação.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Zootecnia (ZAZ) da USP, campus Pirassununga.

4.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos hidrogéis após a secagem foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV). As amostras secas foram fixadas em um suporte de alumínio usando fita de carbono. As imagens foram obtidas por meio de um microscópio eletrônico da marca HITACHI, modelo TM 3000, operando a uma tensão de 15kV. Para analisar a morfologia interna das amostras, estas foram quebradas utilizando nitrogênio líquido.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Departamento de Zootecnia (ZAZ) da USP, campus Pirassununga.

4.10 Citotoxicidade

Todos os materiais utilizados no ensaio foram esterilizados por autoclave em um processo de esterilização úmida. A esterilização foi realizada a uma temperatura de 120°C e uma pressão de 1 kgf/cm^2 , durante 20 minutos. O meio de cultura suplementado (MCS) foi esterilizado utilizando uma membrana estéril com uma porosidade de 0,22 μm . As amostras e o controle negativo (alumina) foram esterilizadas por uma hora utilizando radiação UV.

4.10.1 Cultura de células

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Zhang *et al.* (2011), com modificações, utilizando a linhagem celular CHO-k1, que consiste em células de ovário de Hamster chinês. As células foram cultivadas em placas de 150 mm de diâmetro, utilizando meio de cultura RPMI medium 1640 (GIBCO), suplementado com penicilina (100 U/mL),

estreptomicina (100 µg/mL), anfotericina B (0,025 µg/mL), glutamina (2 mM) e soro fetal bovino (10%). O cultivo foi realizado a uma temperatura de 37°C em uma atmosfera de CO₂ (5%) por um período de 72 horas, utilizando uma estufa incubadora (CCL-170B-8, ESCO, USA). Para garantir um crescimento celular adequado, foram realizadas trocas do meio de cultura suplementado nos intervalos de 24 e 48 horas. Após 72 horas, o meio suplementado foi removido e as células foram removidas utilizando uma solução de tripsina (Tryple Express com vermelho de fenol Gibco 12605).

A contagem celular foi realizada utilizando uma câmara de Neybauer por diluição em azul de trypan 0,4% (na proporção de 1:5) (Microscópio óptico 8060^a, BEL, Itália). Este método baseia-se na observação das células viáveis, que não permitem a penetração do corante, resultando em coloração transparente, enquanto as células não viáveis permitem a penetração do corante, resultando em coloração azul (KONOPKA *et al.*, 1996).

4.10.2 Viabilidade celular – método de incorporação do vermelho neutro (VN)

Os materiais foram preparados de acordo com a norma ISO 10993-10 (ISO 2010). As amostras e a alumina foram adicionadas a tubos cônicos Falcon de 15 mL e misturadas com o MCS na proporção de 2% (m/v). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C em uma atmosfera de CO₂ (5%) por 24 horas, utilizando uma estufa incubadora. Foram utilizados três controles: 1) Alumina (controle negativo); 2) solução de fenol 0,2% (controle positivo); 3) MCS (branco). Após as 24 horas, tanto as amostras quanto os controles foram submetidos a diluições seriadas para obter as concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%.

O ensaio de toxicidade foi realizado utilizando o método indireto de incorporação do vermelho neutro, de acordo com a norma ISO 10993-5 (ISO 2009). As células (1 x 10⁴ células/poço) foram cultivadas em MCS (200 µL) e incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO₂ (5%) em uma placa de 96 poços. Após 24 horas, o MCS foi removido e os tratamentos (amostras e controles) e suas respectivas diluições (200 µL) foram adicionados à placa contendo as células. A placa foi novamente incubada a 37°C em uma atmosfera de CO₂ (5%) por 24 horas. Após o tratamento, a morfologia celular foi observada utilizando um microscópio óptico invertido (PRIMO, CARL ZEISS, Alemanha). Em seguida, o meio contendo os tratamentos foi removido dos poços e as células foram lavadas com solução PBS (200 µL). Após a lavagem, adicionou-se 200 µL da solução de vermelho neutro (50 µg/mL) aos poços, e a placa foi incubada a 37°C em uma atmosfera de CO₂ (5%) por 3 horas para permitir a incorporação do vermelho neutro pelas células. Após a incubação, a solução de vermelho neutro foi removida e

os poços foram lavados com 200 µL de PBS. Em seguida, foram adicionadas 200 µL de solução de extração (50% etanol, 1% ácido acético, 49% água destilada) aos poços, e a placa foi agitada a 150 rpm por 10 minutos (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil) para extrair o vermelho neutro das células. As leituras de absorvância foram realizadas em um leitor de microplacas a 540 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA). Os resultados foram expressos em viabilidade celular (%VC), calculada de acordo com a equação (3).

$$\%VC = \left(\frac{Abs\ amostra}{Abs\ branco} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde *Abs amostra* é a absorvância da amostra a 540 nm e *Abs branco* é a absorvância do branco a 540 nm.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Biomateriais do Grupo de Materiais (GMAT) do Departamento de Ciências Básicas (ZAB) da USP, campus Pirassununga.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Ensaio de curva de fluxo com reômetro rotacional

Todas as composições foram caracterizadas no reômetro para determinar se os materiais apresentavam comportamento newtoniano, pseudoplástico ou dilatante. Um comportamento newtoniano indica uma viscosidade constante independentemente da taxa de cisalhamento, enquanto um comportamento pseudoplástico implica em uma diminuição da viscosidade à medida que a taxa de cisalhamento aumenta. Por outro lado, um comportamento dilatante envolve um aumento da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (COSTA, 2017).

Essa caracterização é crucial para compreender as propriedades de fluxo dos materiais durante o processo de extrusão. Um comportamento newtoniano pode facilitar a extrusão consistente, pois a viscosidade permanece constante. Por outro lado, um comportamento pseudoplástico pode ser benéfico, pois a viscosidade diminui quando o material é submetido a altas taxas de cisalhamento, facilitando a extrusão pela agulha (CALADO, 2015).

O fluxo de um fluido é oposto pelo atrito entre camadas adjacentes em movimento relativo, e, portanto, é necessária uma força para sustentar o fluxo do fluido. O comportamento de fluxo de um material viscoso é descrito pela lei de potência de Ostwald-de Waele descrito por del-Mazo-Barbara (2021), na qual a tensão de cisalhamento (τ) é dado pela taxa de cisalhamento conforme equação (4):

$$\tau = k \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (4)$$

Onde $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, k é o parâmetro de constante de fluxo e n é o índice de comportamento de fluxo. A viscosidade aparente η é um parâmetro que, em geral, depende da taxa de cisalhamento e é definida conforme equação (5):

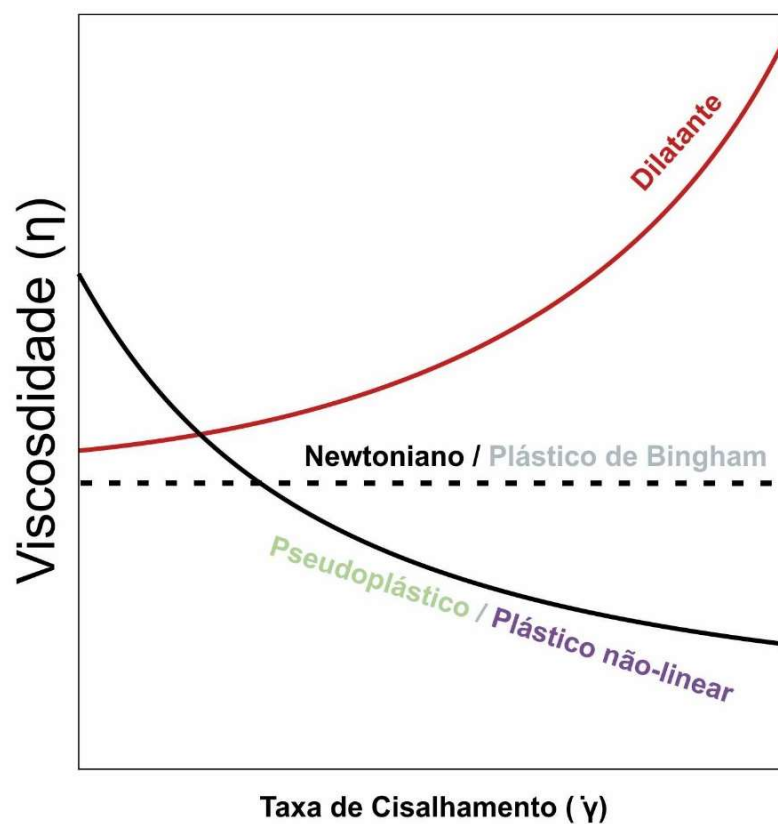
$$\eta = k \cdot (\dot{\gamma})^{n-1} \quad (5)$$

Portanto, combinando as equações (4) e (5), tem-se a equação (6):

$$\tau = [k \cdot (\dot{\gamma})^{n-1}] (\dot{\gamma}) = n \cdot (\dot{\gamma}) \quad (6)$$

Com base no índice de comportamento de fluxo, é possível categorizar materiais viscosos em diferentes classes. Os materiais newtonianos, caracterizados por um índice n igual a 1, exibem uma viscosidade constante. Por outro lado, os materiais pseudoplásticos ou tixotrópicos, cujo índice n se encontra na faixa de 0 a 1, demonstram uma diminuição na viscosidade à medida que a taxa de cisalhamento aumenta. Adicionalmente, os materiais dilatantes ou espessantes, em que n ultrapassa o valor 1, revelam um aumento na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento aplicada, conforme representado na Figura 8.

Figura 8: Viscosidade versus taxa de cisalhamento



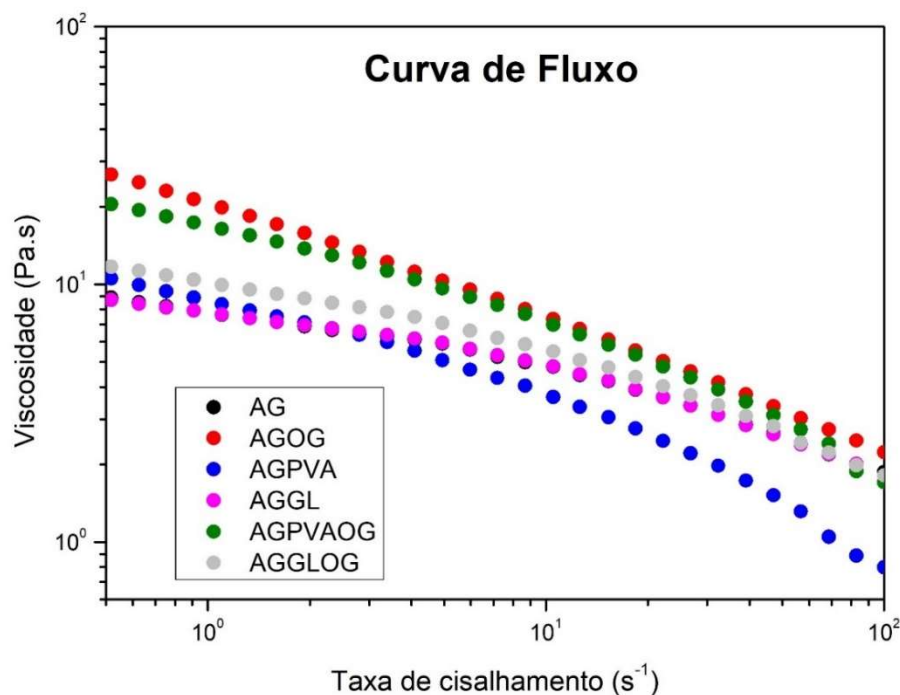
Fonte: Adaptada de: (DEL-MAZO-BARBARA; GINEBRA, 2021)

A investigação detalhada foi conduzida empregando o equipamento compacto modular Anton Paar MCR-92. Com o intuito de preservar as condições ideais para análise, os experimentos foram executados a uma temperatura de 35°C. Esse ajuste térmico foi crucial para prevenir o início prematuro do processo de gelificação do material, garantindo a viabilidade do ensaio. A configuração experimental adotada envolveu o uso de uma geometria placa-placa com um diâmetro de 50 mm, em um espaço de 1 mm. Para determinação da viscosidade, foram realizadas medidas na faixa de taxa de cisalhamento de 0,01 a 100 s⁻¹.

O gráfico apresentado (Figura 9) ilustra a relação entre a viscosidade e a taxa de cisalhamento visualizada através de um teste de fluxo variável realizado em hidrogéis. Análises adicionais são apresentadas nos gráficos exibidos (Figura 10 e Figura 11). Eles evidenciam que, conforme a taxa de cisalhamento aumenta, é observada uma diminuição na viscosidade do material. Esse comportamento indica uma redução na resistência ao fluxo à medida que a força de cisalhamento aplicada aumenta. Essa característica é típica de materiais com um comportamento pseudoplástico.

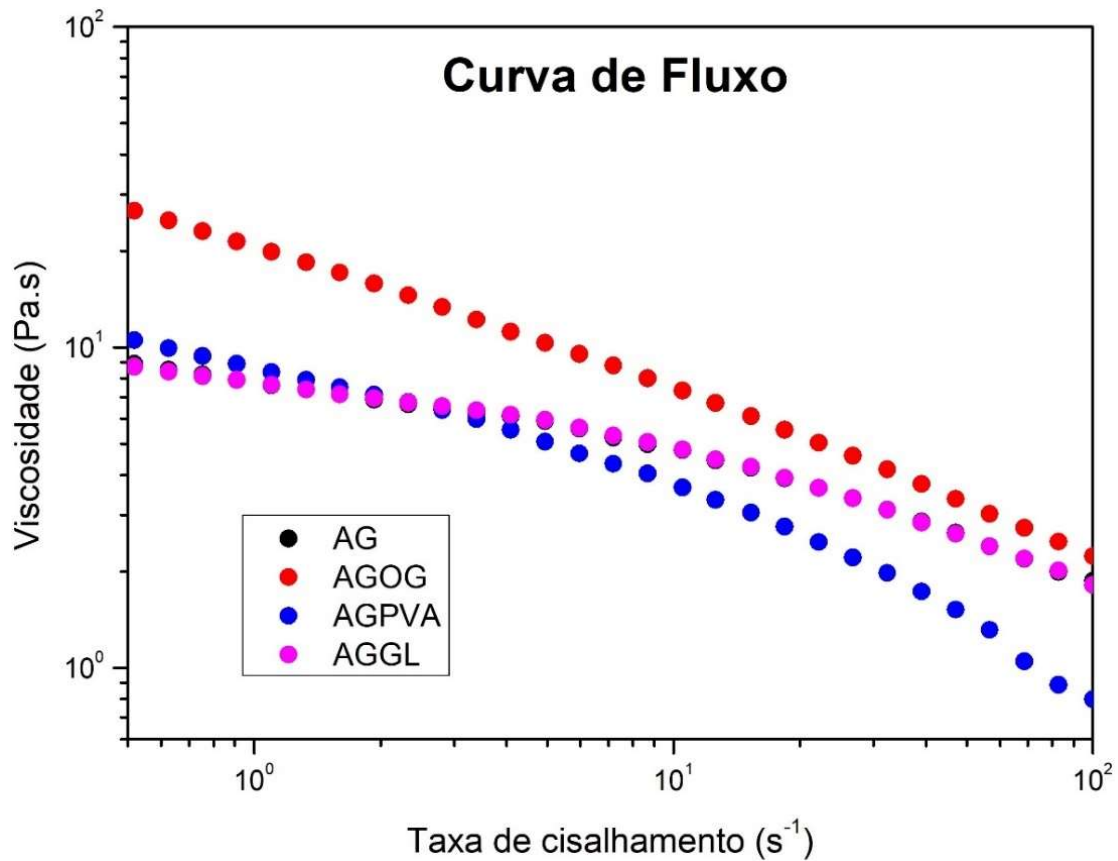
A redução na viscosidade aparente ocorre devido à reorganização ou desestruturação das moléculas ou partículas encapsuladas no interior do hidrogel, quando submetido a forças de cisalhamento. Esse processo provoca a quebra ou reorganização das estruturas internas, ocasionando um aumento na fluidez do material e, conseqüentemente, uma diminuição na viscosidade. Essa propriedade é crucial em diversos contextos, como processos de impressão 3D biofuncionalizados e administração controlada de fármacos, uma vez que permite a conformação e fluxo otimizados do hidrogel, influenciando diretamente na eficácia e versatilidade de aplicações biomédicas e biotecnológicas.

Figura 9: Curva de fluxo das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA); alginato, gelatina e glicerol (AGGL), alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG)



Fonte: autoria própria.

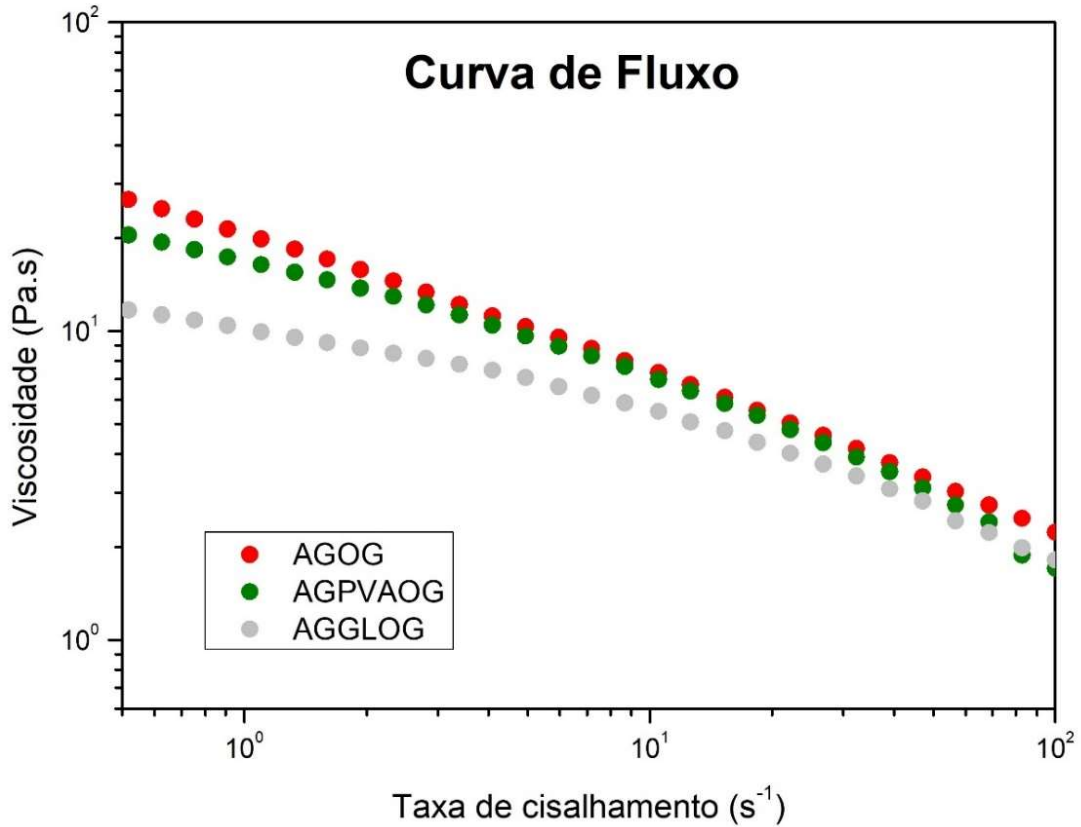
Figura 10: Curva de fluxo das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina e glicerol (AGGL)



Fonte: autoria própria.

Na investigação comparativa das amostras AG e AGGL (Figura 10), ao analisar o gráfico da viscosidade em relação à taxa de cisalhamento, destaca-se uma notável sobreposição das curvas. A amostra AG apresenta um desafio na identificação visual direta, sendo necessário uma ampliação dos resultados devido à notável semelhança nos valores. A observação de que a sobreposição persiste independentemente das taxas de cisalhamento sugere que a adição de glicerol não influenciou significativamente a viscosidade aparente das amostras AG e AGGL. Portanto, é possível concluir que o comportamento pseudoplástico dessas soluções é essencialmente governado pelos constituintes principais, permanecendo inalterado pela presença de glicerol.

Figura 11: Curva de fluxo das amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG)



Fonte: autoria própria.

Para determinar o comportamento reológico de fluidos não-newtonianos, foram aplicadas as equações de Ostwald-de Waele. Através do uso de técnicas de regressão linear, o valor de "n" é calculado a partir da inclinação da reta obtida no gráfico log-log, obtendo o valor de "m". A inclinação da reta corresponde ao valor de "n". Todos os valores de "n" obtidos foram inferiores a 1, conforme Tabela 2, confirmando que esses materiais se enquadram na categoria de pseudoplásticos.

Ao utilizar as equações de Ostwald-de Waele e analisar a inclinação da reta no gráfico log-log, é possível quantificar a relação entre a taxa de cisalhamento e a viscosidade aparente. Valores de "n" menores que 1 indicam um comportamento pseudoplástico, onde a viscosidade diminui à medida que a taxa de cisalhamento aumenta. Essa característica é comumente observada em muitos fluidos não-newtonianos, incluindo hidrogéis, polímeros e dispersões coloidais.

Tabela 2: Valores de “m” e “n”

Hidrogel	m	n
AG	0,1195	0,4029
AGOG	0,1037	0,3641
AGPVA	0,1283	0,5876
AGGL	0,1339	0,4090
AGPVAOG	0,2083	0,4225
AGGLOG	0,1564	0,5876

Fonte: autoria própria.

Portanto, a análise dos valores de "n" obtidos confirma o comportamento pseudoplástico desses materiais e fornece informações cruciais sobre suas propriedades reológicas, permitindo uma compreensão mais profunda de como eles se comportam em relação à taxa de cisalhamento.

5.2 Ensaio de Injetabilidade

Há divergências na literatura quanto a alguns termos como injetabilidade. Neste trabalho, o termo injetabilidade está relacionado à medida de força necessária para aplicação de determinada quantidade de material por meio de uma seringa, além da determinação da taxa de injetabilidade para análise quantitativa (QUEIROZ, 2021).

A injetabilidade é de grande importância para avaliar a capacidade de injeção manual ou para definir os parâmetros necessários para configurar uma impressora 3D, mas também faz parte da avaliação do comportamento reológico quando injetado em altas taxas de cisalhamento. E a força de ejeção inclui a força requerida pelo injetor para empurrar o material injetável para fora da seringa, além de definir a capacidade do hidrogel de se manter homogêneo durante a sua injeção.

O hidrogel deve ser extrudado através da seringa sem que ocorra separação de fases, podendo ocorrer quando o material gelifica antes do recomendado para a total extrusão. O tempo ideal para aquecimento dos hidrogéis é necessário para garantir que o hidrogel seja manuseado de forma adequada, possibilitando filamentos uniformes e sem separação de fases.

Neste trabalho, os hidrogéis foram preparados conforme as formulações definidas e carregadas em seringas de 20 mL, com aproximadamente 11 g de hidrogel. Utilizou-se um texturômetro (Texture Analyser TA-TXplus) conforme Figura 12, com uma força de 50N e uma taxa de velocidade de 50 mm/min. A injetabilidade se deu em um período de 44 seg.

Figura 12: Análise de injetabilidade no Texture Analyser TA-TXplus



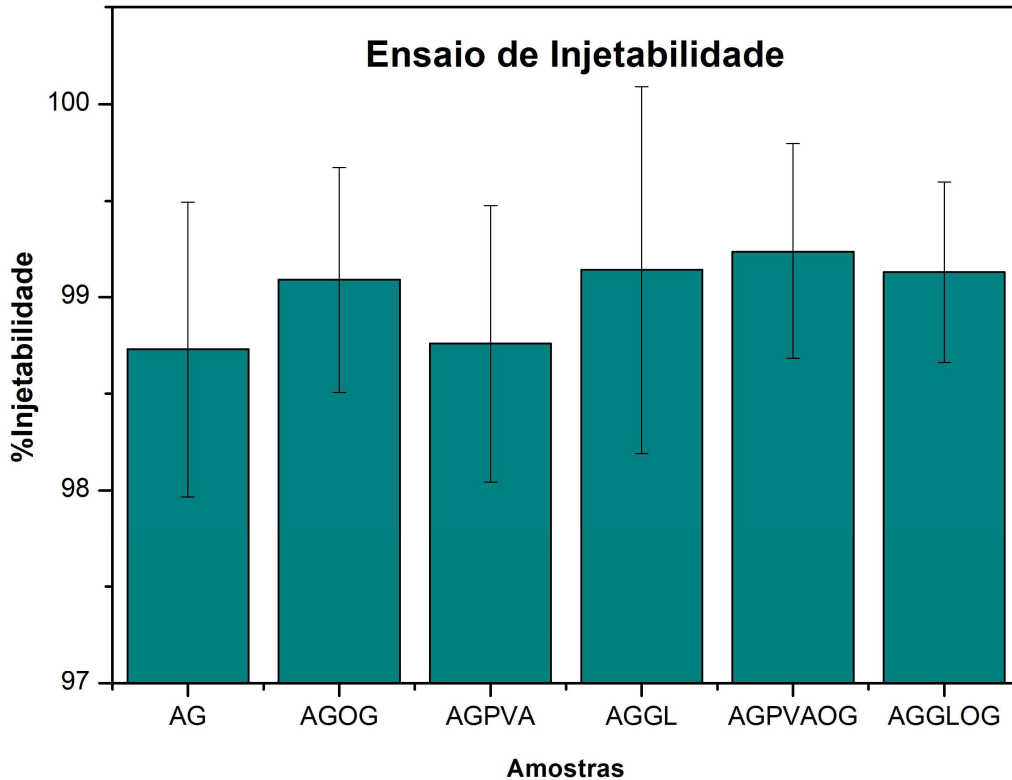
Fonte: autoria própria.

As amostras armazenadas na seringa foram aquecidas em banho maria com circulação no equipamento MA 159 a uma temperatura de 37°C por 30 min. Cada ensaio foi iniciado depois de decorridos 20 min da retirada das amostras do equipamento.

Os resultados indicaram que as soluções AGGOG, AGPVAOG e AGGLOG, que continham óxido de grafeno em sua composição, separaram partículas de óxido de grafeno, fazendo com que a extrusão não fosse totalmente homogênea, mesmo que apresentasse uma força decrescente constante.

Com os resultados obtidos conforme Figura 13, os valores estão acima de 97% considerando o desvio padrão. Por se tratar de hidrogéis, materiais com grande quantidade de água, o índice de injetabilidade ficou alto.

Figura 13: Ensaio de injetabilidade das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA); alginato, gelatina e glicerol (AGGL), alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG)

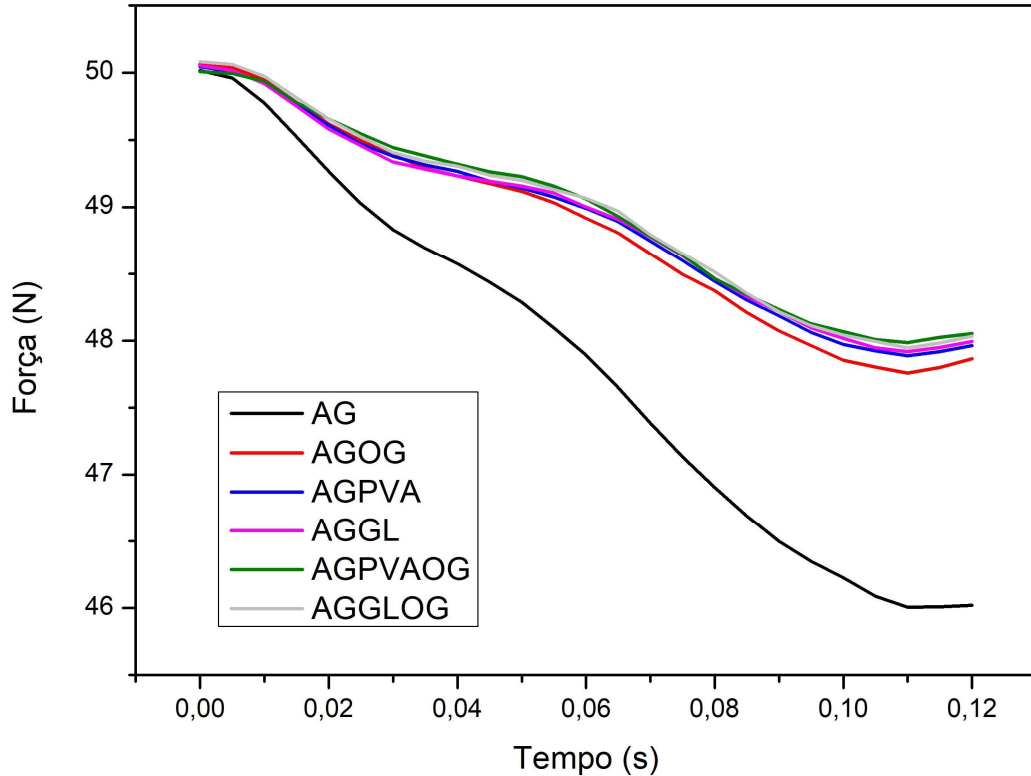


Fonte: autoria própria.

A injetabilidade pode ser afetada pela geometria da seringa, diâmetro interno, comprimento, forma da abertura, bem como o acabamento da superfície da seringa. A força aplicada a um êmbolo de seringa durante a extrusão de uma formulação é dissipada de três maneiras: (a) ultrapassando a força de resistência do êmbolo da seringa; (b) transmitindo energia cinética ao material; e (c) forçando o líquido através da agulha, caso utilizada (CILURZO *et al*, 2011). Foi determinada então a curva força versus tempo.

O perfil do gráfico de força x tempo é bastante semelhante para todas as amostras (Figura 14). A força necessária para extrudar o material é decrescida gradativamente à medida que o conteúdo da seringa começa a fluir, que é o pico de força inicial, valor também chamado de “força de deslocamento inicial”, sendo a força necessária para iniciar o movimento do êmbolo (CILURZO *et al*, 2011).

Figura 14: Curva representativa força x tempo das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA); alginato, gelatina e glicerol (AGGL), alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG)



Fonte: autoria própria.

A injetabilidade do hidrogel apresenta uma tendência semelhante à curva de fluxo obtida no ensaio, onde a viscosidade diminui à medida que a taxa de cisalhamento aumenta. Isso é evidenciado pelo fato de que uma força cada vez menor é necessária para dar continuidade ao processo de injeção do material.

Ao analisar a curva de fluxo do hidrogel no ensaio, é observado que a amostra AG (hidrogel sem aditivo) apresenta uma curva bastante próxima da curva da amostra AGGL (hidrogel com adição de glicerol). Isso sugere que a adição de glicerol não altera significativamente a viscosidade do hidrogel AG sob diferentes taxas de cisalhamento. No entanto, ao realizar o ensaio de injetabilidade, é possível constatar uma alteração no comportamento do hidrogel AGGL em comparação com o hidrogel AG. Neste caso, a adição de glicerol ou outro material pode afetar a capacidade de injeção manual do hidrogel, resultando em uma menor resistência ao fluxo e, conseqüentemente, exigindo maior força para realizar a injeção.

Os resultados mostram que a adição de outros materiais na solução composta por alginato e gelatina provocam a desaceleração do processo de gelificação da gelatina, esperando-se valores de força mais elevados para expulsar o conteúdo da seringa. Esse efeito é atribuído a interações hidrofóbicas que respondem às variações de temperatura, modificando a solubilidade da gelatina quando outros materiais são introduzidos. Esses são materiais que passam por uma transição de fase sol-gel e, em geral, são constituídos por polímeros denominados anfílicos, os quais apresentam segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos em sua estrutura química (ARIOLI, 2022).

Todos os hidrogeis preparados apresentaram bom aspecto de extrusão com a força de 50 N constante.

5.3 Ensaio do Grau de Intumescimento

Existem hidrogeis capazes de absorver água em até mil vezes a sua própria massa e a taxa de absorção de água é uma característica crucial desses materiais, e para medir sua capacidade, é necessário obter a capacidade de intumescimento em função do tempo.

Existem diversos fatores físicos que podem contribuir positivamente para um maior intumescimento de um material, como a presença de grupos hidrofílicos na rede polimérica, menor densidade de reticulação e uma boa flexibilidade da rede. Os grupos hidrofílicos presentes na rede polimérica são hidratados em meio aquoso, formando a estrutura do hidrogel. O termo “rede” se refere à reticulação, que tem a função principal de evitar a dissolução das cadeias poliméricas hidrofílicas na fase na aquosa (HENNINK; VAN NOSTRUM, 2002).

O grau de intumescimento (Q) é uma medida da capacidade de absorção de água de um polímero que pode ser expressa pela razão entre a massa do hidrogel após absorver água e a massa do hidrogel antes da absorção (BORTOLIN; AOUADA; MATTOSO, 2013).

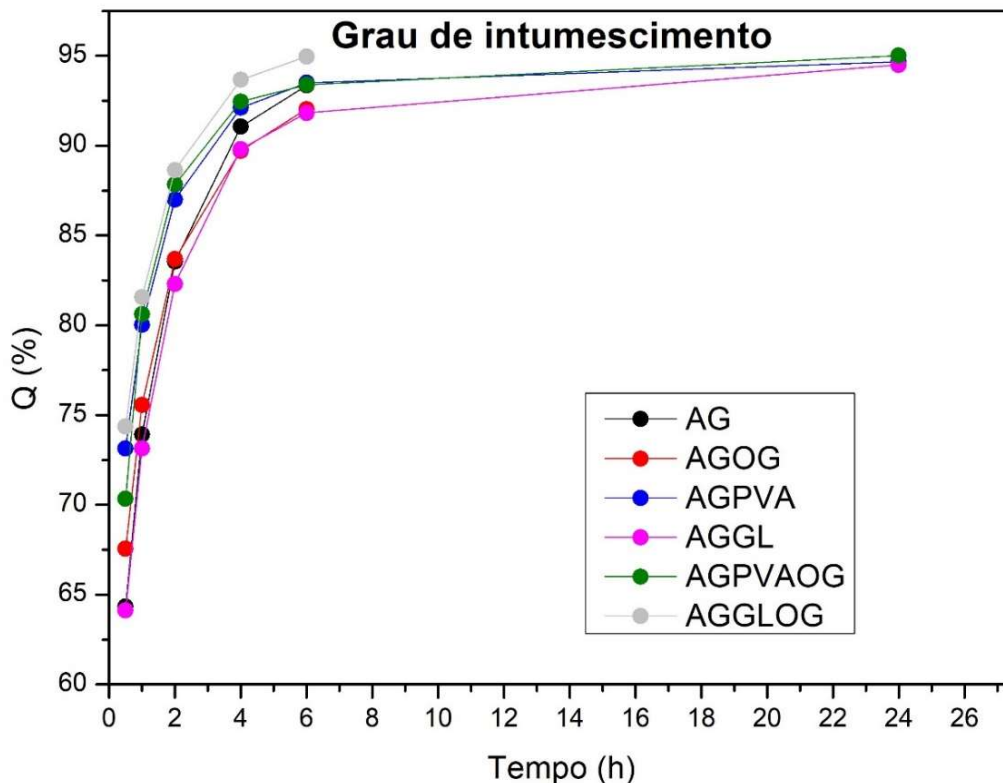
Com o intuito de aumentar a confiabilidade do processo, todas as análises experimentais foram realizadas em triplicata e foi possível verificar que os resultados apresentaram uma relação linear nas primeiras horas do teste realizado.

Na Figura 15 é possível observar a curva da cinética de intumescimento dos hidrogeis tomando como parâmetros Q em função do tempo de intumescimento medido em horas. O Q foi determinado a partir de medidas da massa do hidrogel no tempo (t) com intervalos pré estabelecidos através da equação (2). Essas medidas foram realizadas porque, além de serem um parâmetro específico para cada hidrogel na literatura, descobriu-se que os gráficos de intumescimento geram curvas em vez de retas, já que tendem ao equilíbrio. Isso significa que,

à medida que aumenta o tempo de intumescimento de um hidrogel, sua velocidade de intumescimento diminui até atingir seu grau máximo de intumescimento ($Q_{\text{máx}}$) (BORTOLIN, 2014).

Na Figura 15 tem-se que $Q_{\text{máx}}$ da formulação AGPVAOG é de 95%, o maior valor entre as formulações AGPVA e AGGL que também suportaram o ensaio depois de 24 horas em solução PBS. As outras formulações AG, AGOG e AGGLOG não apresentaram cadeias poliméricas firmes, o alto grau de intumescimento fez com que elas quebrassem. Todas as formulações apresentaram um grau de intumescimento próximo, mesmo com a adição de materiais na sua composição, como o óxido de grafeno, álcool polivinílico e glicerol não houve tanta alteração no intumescimento.

Figura 15: Análise do Grau de Intumescimento (Q) das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA); alginato, gelatina e glicerol (AGGL); alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG)



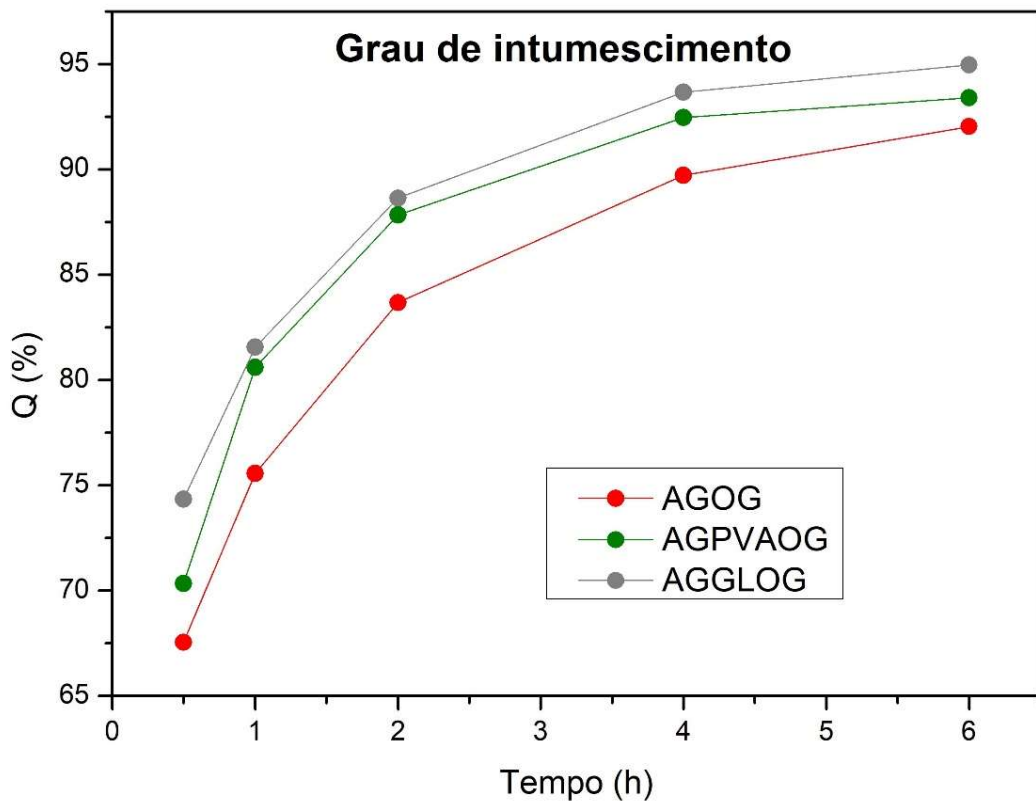
Fonte: autoria própria.

No corte apresentado da Figura 16, com apenas 6 horas de ensaio, foi notado que as amostras contendo tanto PVA (amostra AGPVAOG) quanto glicerol (amostra AGGLOG)

absorveram uma quantidade significativamente maior de água nas primeiras horas. Esse comportamento é atribuído à capacidade de penetração do líquido nos poros e à maior capacidade de retenção de água proporcionada pelo PVA e pelo glicerol presentes nessas amostras.

Diferentemente das outras amostras sem presença de óxido de grafeno, essas amostras não apresentaram um ponto de saturação durante o período de teste, o que significa que a absorção de água foi constante ao longo das 6 horas, não se estabilizando. Esse efeito destaca que a taxa de absorção de água e o grau de intumescimento podem variar ao longo do tempo e dependem das características específicas das amostras e do líquido utilizado. A presença de PVA ou glicerol conferiu às amostras uma absorção inicial mais acentuada e contínua, sem atingir um limite de saturação.

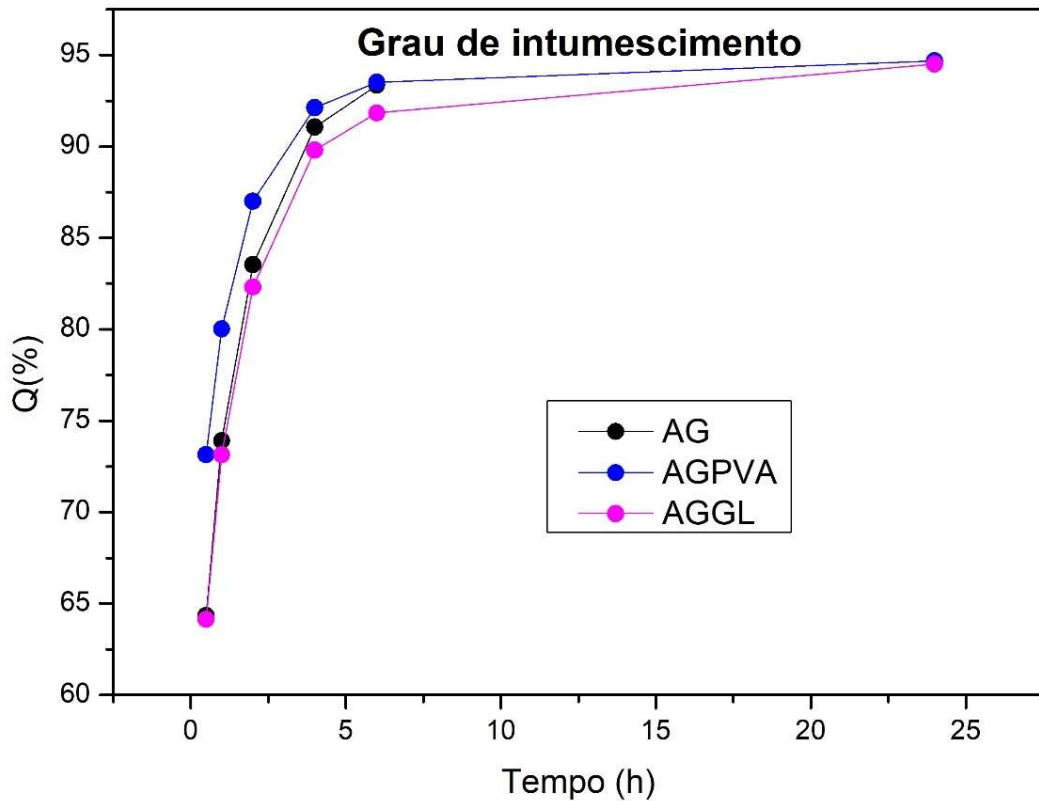
Figura 16: Análise do Grau de Intumescimento (Q) para as amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG)



Fonte: autoria própria.

Por outro lado, na Figura 17, nas amostras sem a inclusão de óxido de grafeno, aquelas sem a presença de álcool polivinílico ou glicerol demonstraram alta absorção de água entre 4 e 6 horas, resultando na incapacidade de suas cadeias sustentarem um ensaio de 24 horas.

Figura 17: Análise do Grau de Intumescimento (Q) para as amostras alginato e gelatina (AG), alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina e glicerol (AGGL)

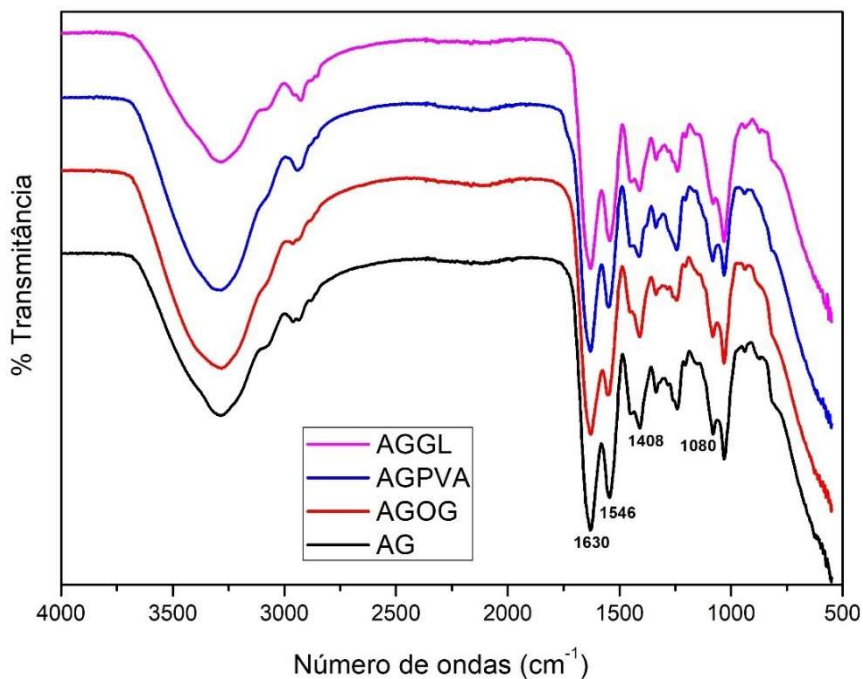


Fonte: autoria própria.

5.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

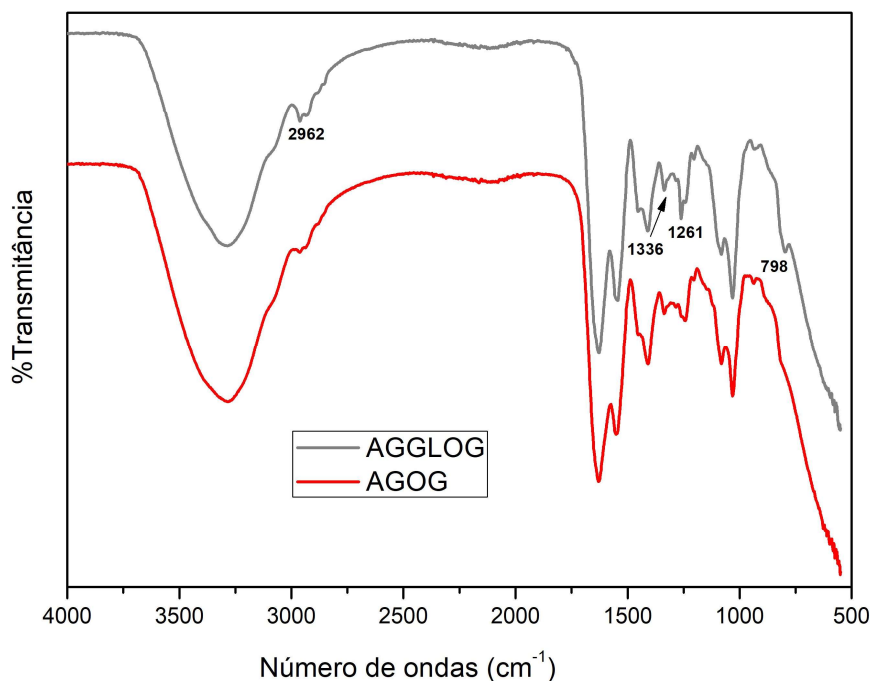
Foram conduzidos ensaios com todas as amostras, tendo os polímeros alginato e gelatina como componentes fundamentais, com o intuito de identificar as modificações químicas e físicas em suas estruturas na Figura 18, Figura 19, Figura 20 e Figura 21.

Figura 18: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras alginato e gelatina (AG); alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina e glicerol (AGGL)



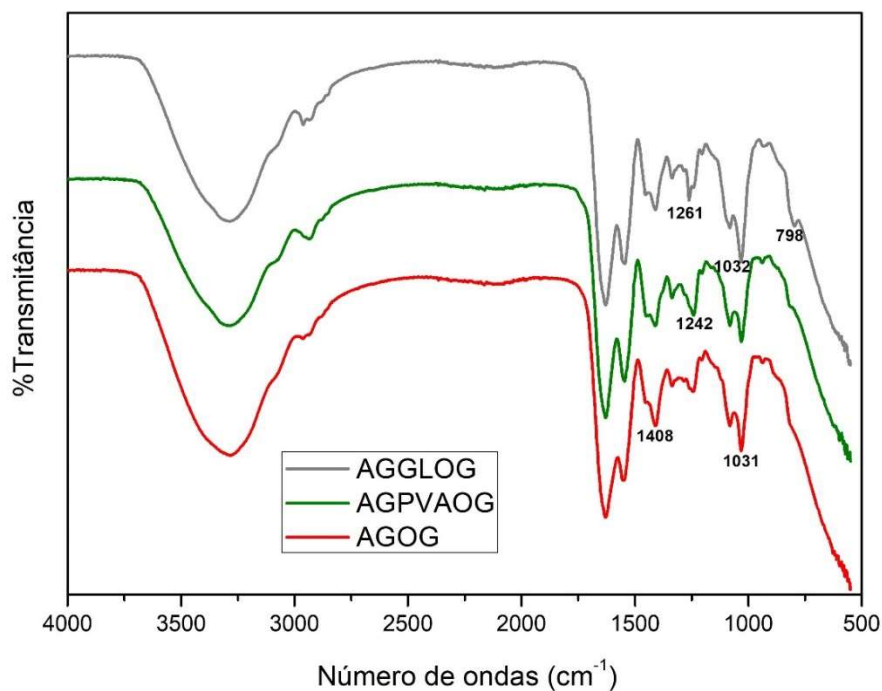
Fonte: autoria própria.

Figura 19: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) e alginato, gelatina, óxido de grafeno e glicerol (AGGLOG)



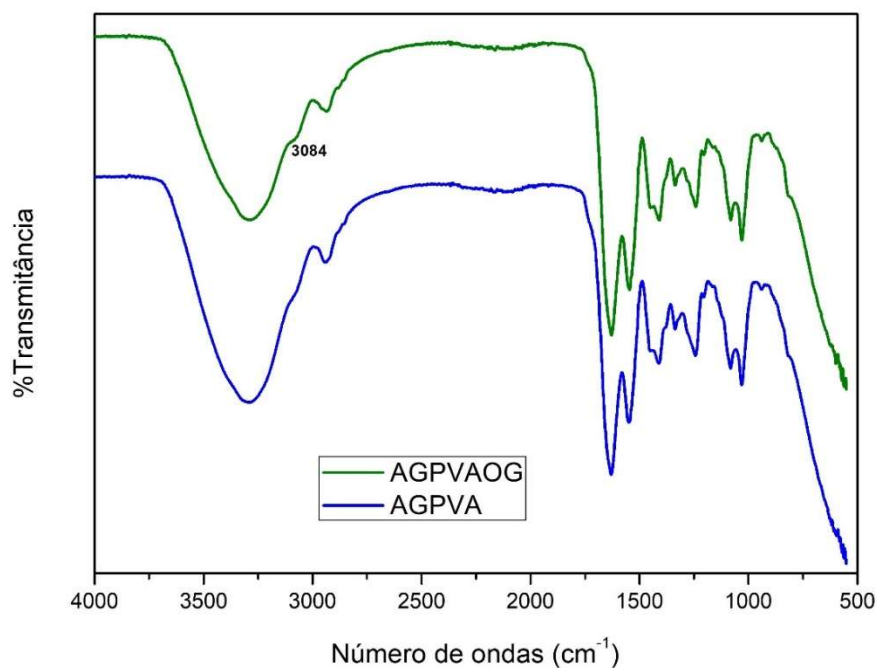
Fonte: autoria própria.

Figura 20: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG); alginato, gelatina, óxido de grafeno e álcool polivinílico (AGPVAOG) e alginato, gelatina, óxido de grafeno e glicerol (AGGLOG)



Fonte: autoria própria.

Figura 21: Espectros de absorção na região do infravermelho (FTIR) das amostras alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina, óxido de grafeno e álcool polivinílico (AGPVAOG)



Fonte: autoria própria.

A presença da banda em 1630 cm^{-1} nos espectros está relacionada à detecção de grupos conjugados e grupos doadores de elétrons presentes em anéis aromáticos. Além disso, uma banda simétrica em 1080 cm^{-1} , identificada como grupo (C-O-C) aquil-éter (NUNES *et al.*, 2010).

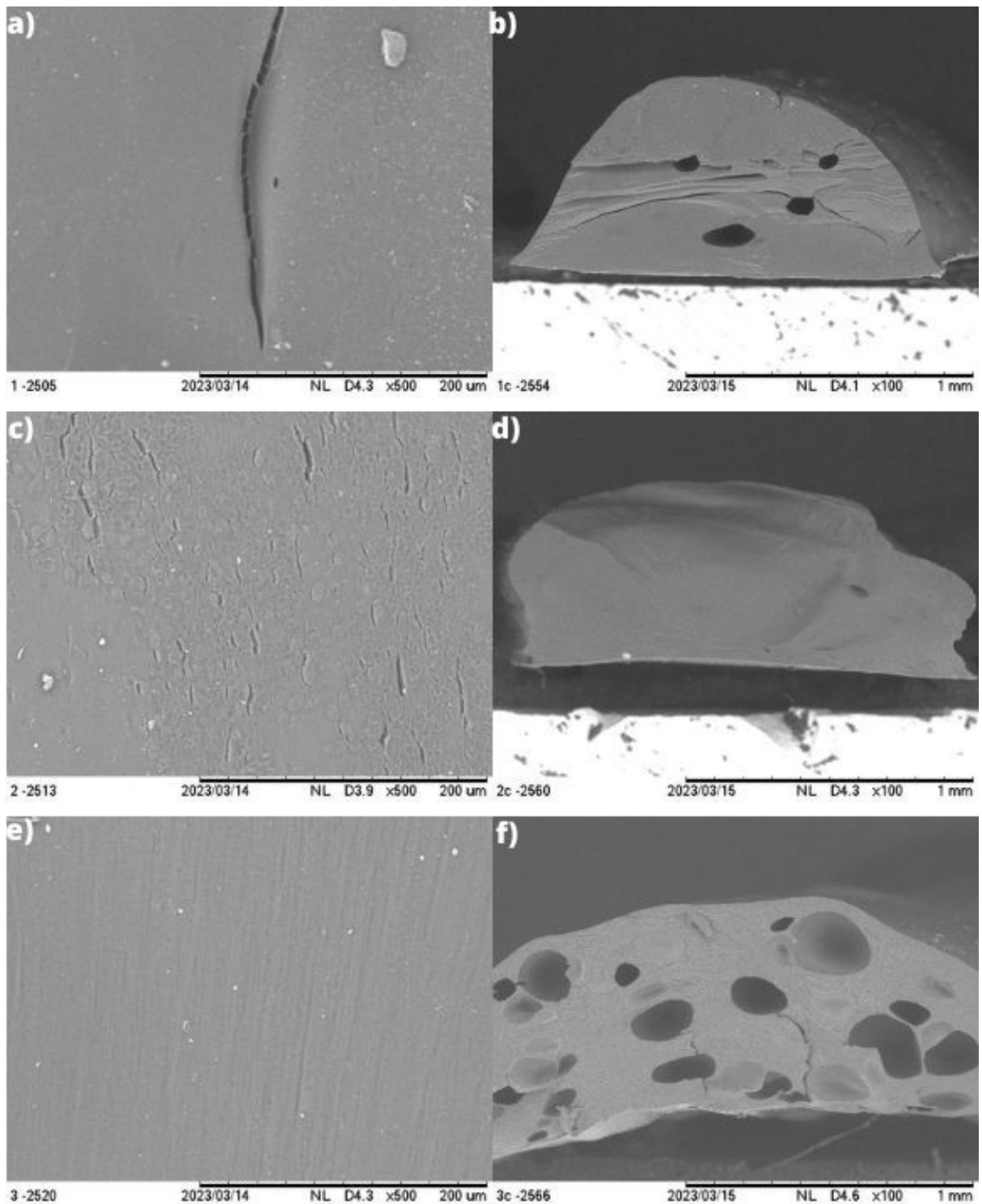
O espectro de absorção no infravermelho da gelatina é caracterizado pela presença das bandas fortes em 1630 e 1546 cm^{-1} , características de grupos carboxamidas (C=O e C-N) e vibração de flexão de agrupamento (-NH). A banda de absorção característica, em 1408 cm^{-1} , característica do alginato, corresponde ao grupo carboxila (-COO⁻) simétrico presente em sua estrutura (LI *et al.*, 2011).

De acordo com a análise dos espectros obtidos, pode-se observar que não ocorreram mudanças substanciais nas bandas características com a adição dos materiais óxido de grafeno, glicerol e álcool polivinílico, sugerindo que as concentrações empregadas para cada material não atingiram um nível que provocasse alterações significativas na estrutura molecular. A ausência de mudanças marcantes nos espectros de infravermelho ressalta a importância de um rigoroso controle de dosagem para garantir impactos relevantes nas propriedades químicas dos hidrogéis.

5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

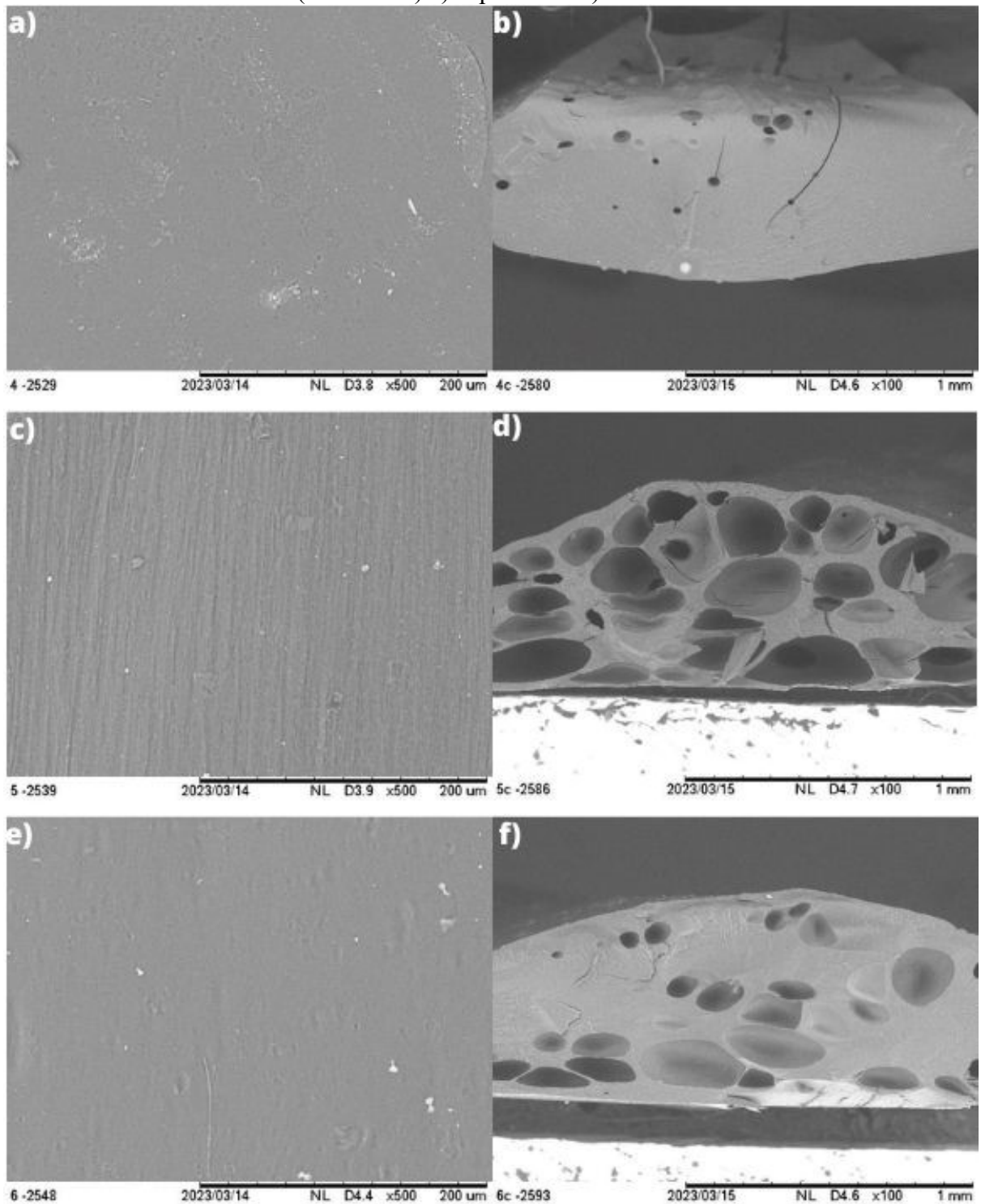
A caracterização da superfície dos hidrogéis usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é útil na compreensão da morfologia e a incorporação de substâncias nesses materiais (SZYNKOWSKA; PAWLACZYK; ROGOWSKI, 2008). Através da MEV, busca-se empregar uma análise detalhada da morfologia dos hidrogéis, explorando diversos aspectos como a estrutura interna, a distribuição de poros, a homogeneidade e a identificação de eventuais heterogeneidades no material. Além disso, a técnica permite determinar o tamanho médio dos poros e a forma das partículas, avaliando a uniformidade da distribuição das partículas e a orientação da matriz. Esses parâmetros são indispensáveis para a compreensão e otimização das atividades biológicas dos hidrogéis. Na Figura 22 e Figura 23, são apresentadas as fotomicrografias obtidas por MEV para os hidrogéis.

Figura 22: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato e gelatina (AG) a) superfície e b) volume; alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) c) superfície e d) volume e alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e) superfície e f) volume



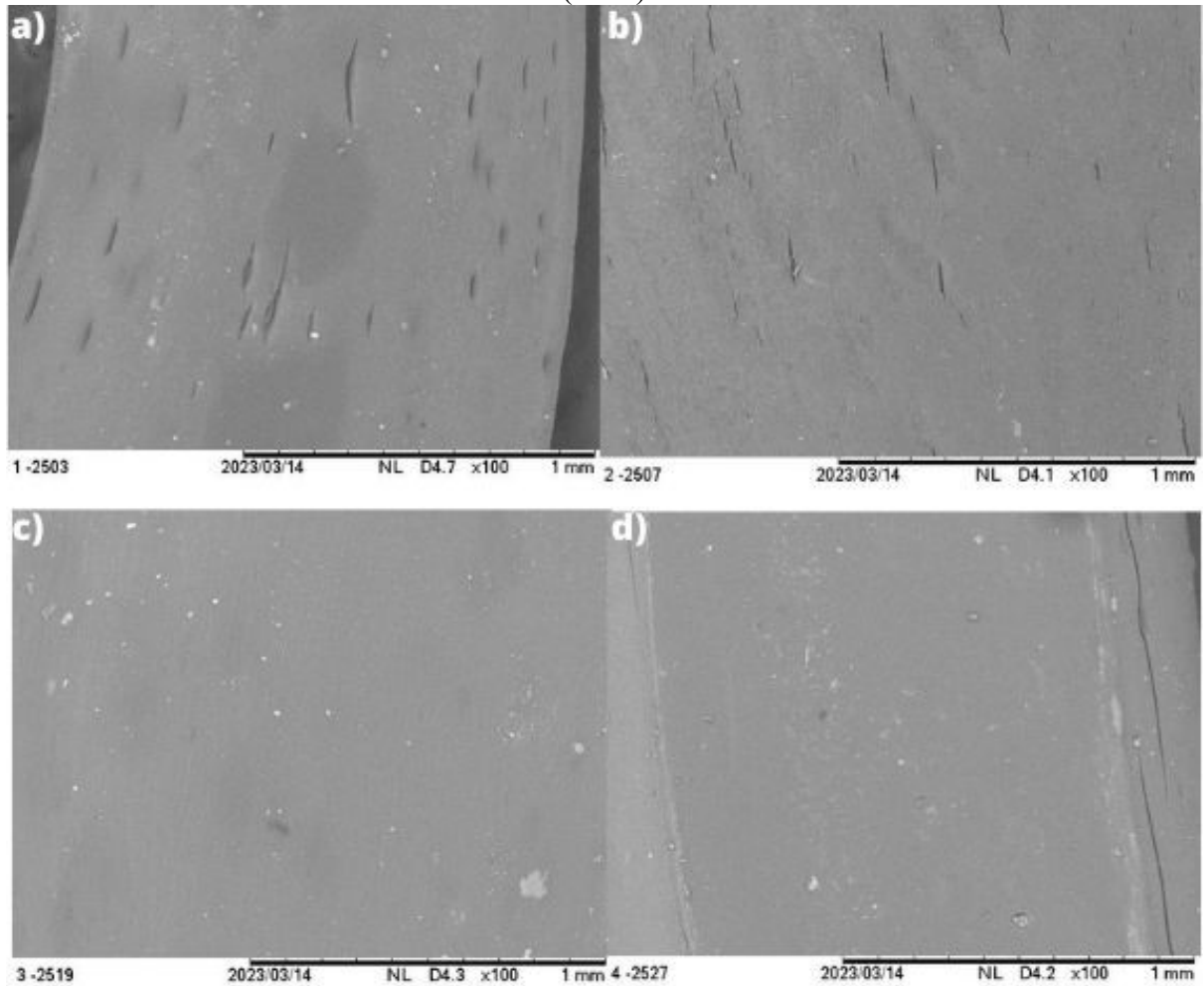
Fonte: autoria própria.

Figura 23: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato, gelatina e glicerol (AGGL) a) superfície e b) volume; alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) c) superfície e d) volume e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG) e) superfície e f) volume



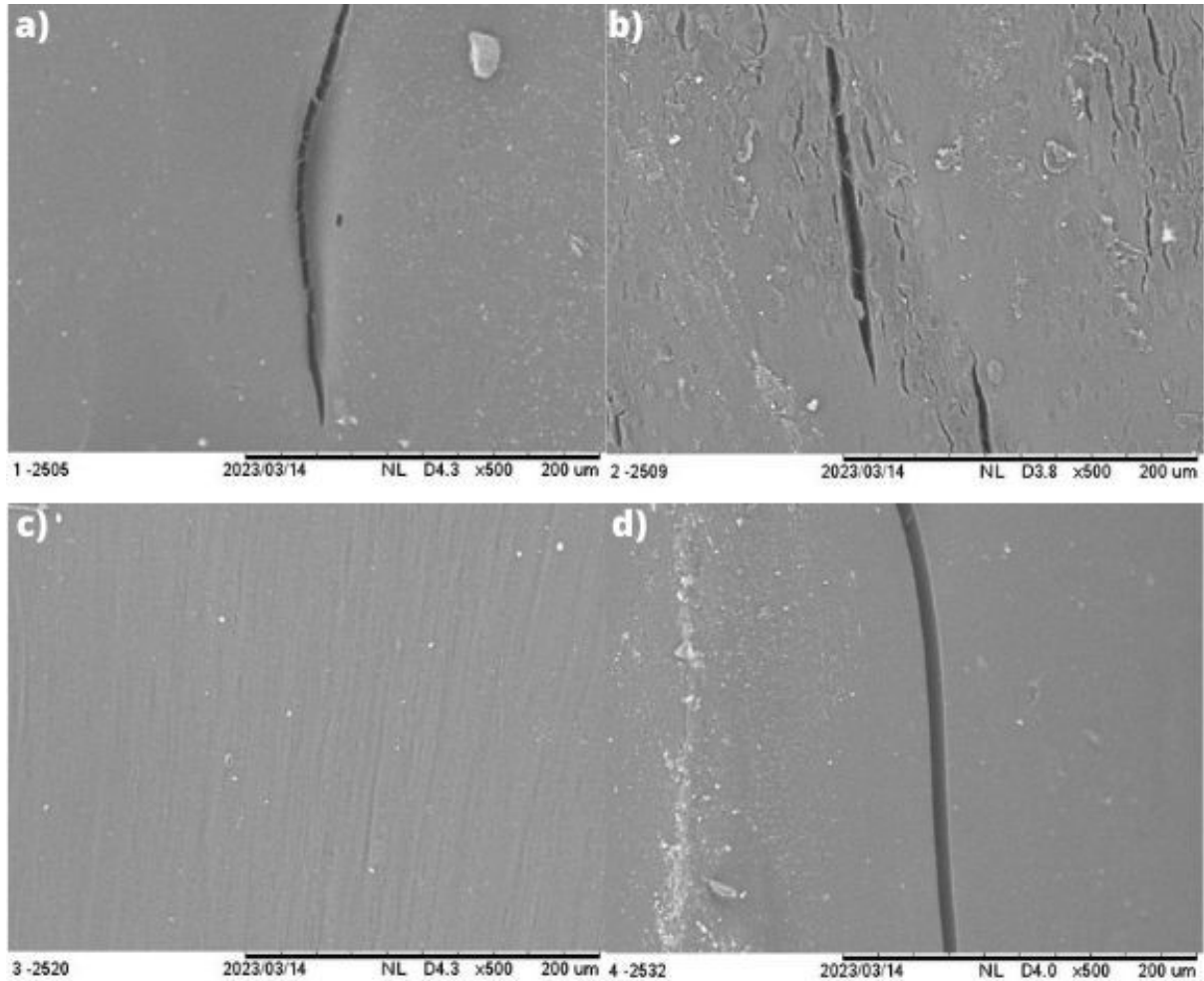
Fonte: autoria própria.

Figura 24: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato e gelatina (AG) a) superfície; alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) b) superfície; alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) c) superfície e alginato, gelatina e glicerol (AGGL) d) superfície (x100)



Fonte: autoria própria.

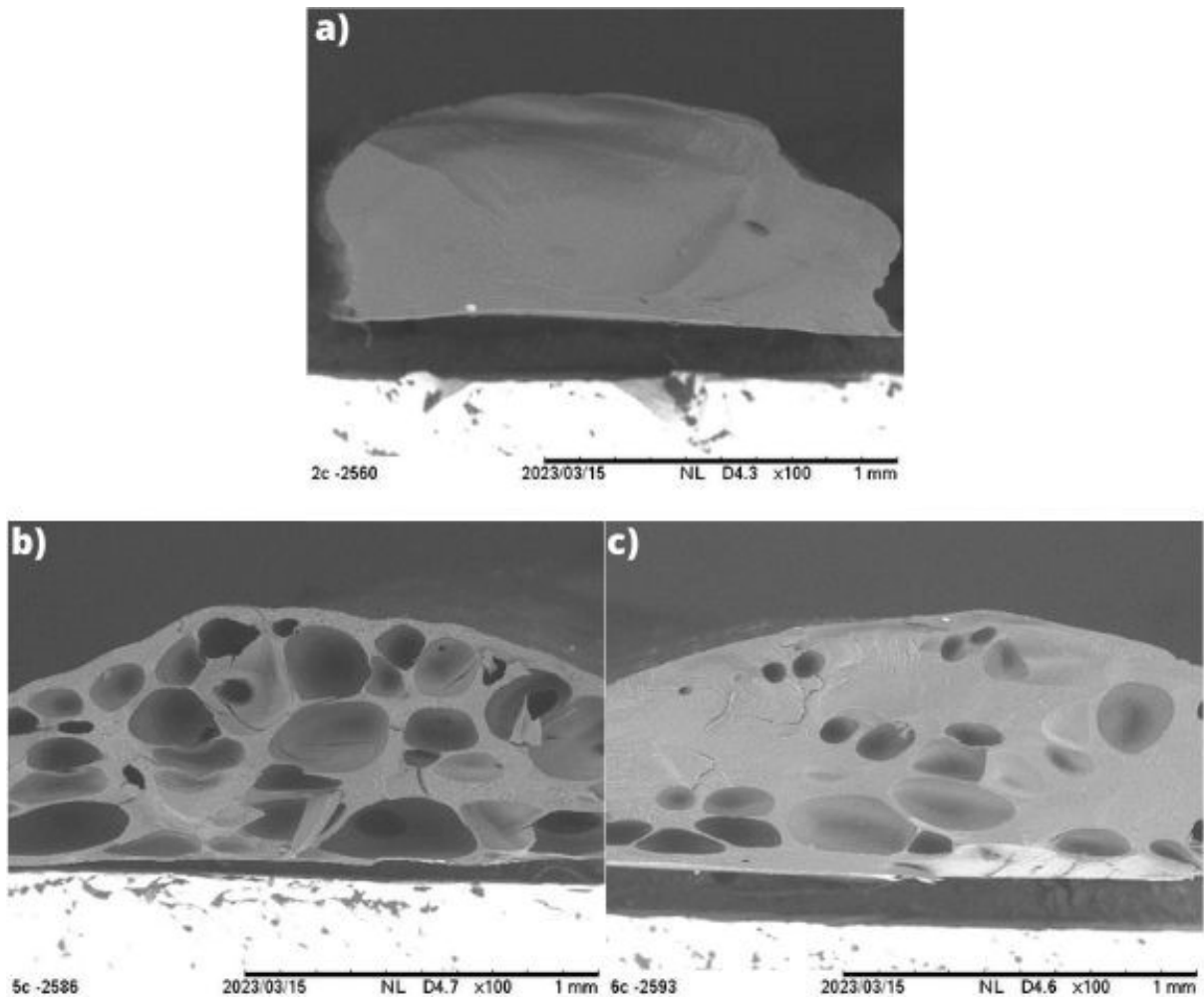
Figura 25: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato e gelatina (AG) a) superfície; alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) b) superfície; alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) c) superfície e alginato, gelatina e glicerol (AGGL) d) superfície (x500)



Fonte: autoria própria.

Na Figura 24 e Figura 25 são apresentadas as fotomicrografias obtidas por MEV do alginato e gelatina e também com a adição de cada um dos materiais utilizados no experimento, em que é perceptível o surgimento de fraturas ao longo da superfície do hidrogel, com exceção da amostra AGPVA, que quando adicionado o álcool polivinílico, apresenta uma superfície mais lisa.

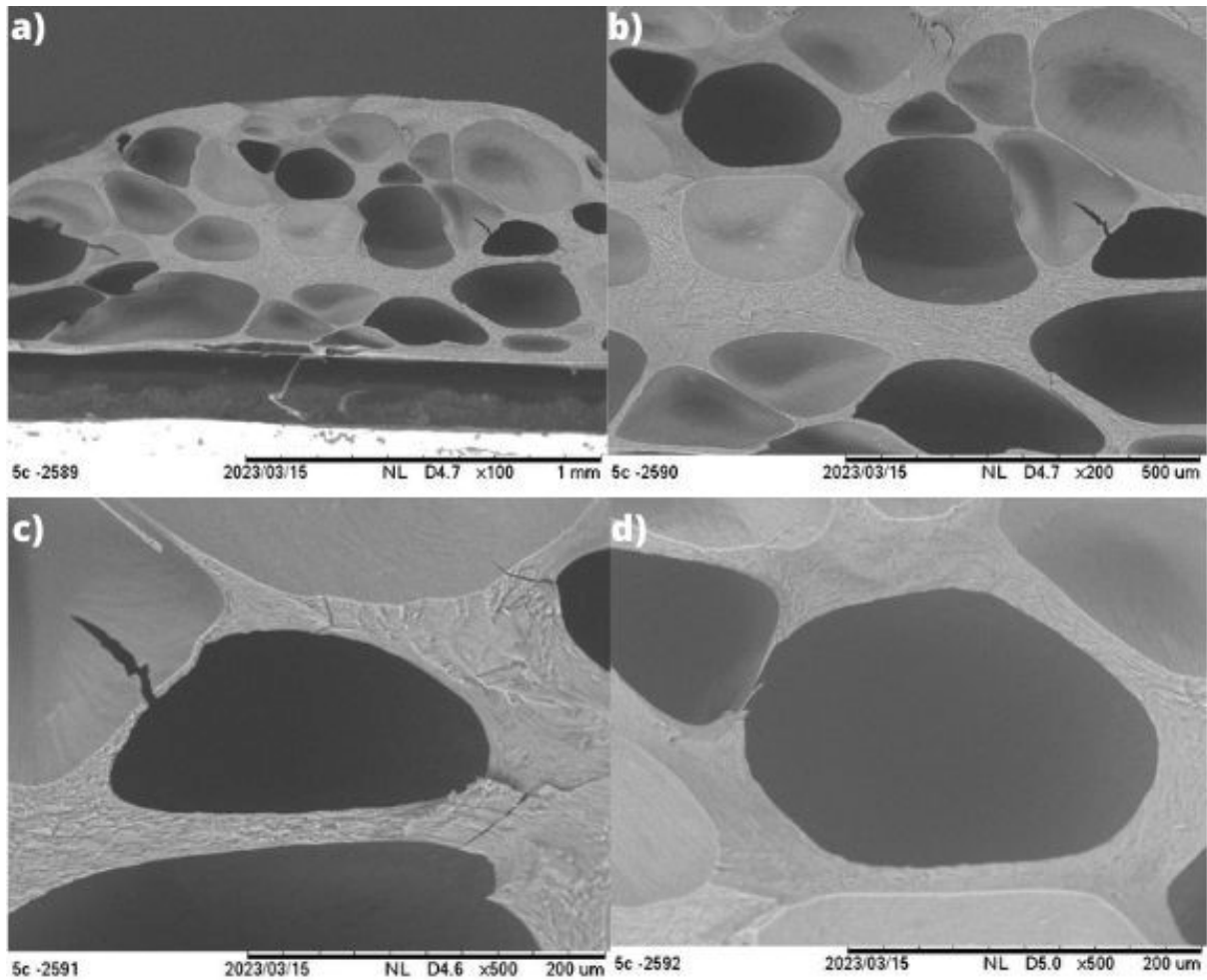
Figura 26: Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG) a) volume; alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) b) volume e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG) c) volume



Fonte: autoria própria.

A morfologia dos hidrogéis referentes às amostras AGPVAOG e AGGLOG, na Figura 26 e Figura 27, exibiram estruturas altamente porosas com poros interligados, por outro lado, a amostra AGOG, sem a presença do álcool polivinílico e glicerol aparentou ter poucos poros nessas fotomicrografias.

Figura 27: Microscopia Eletrônica de Varredura da amostra alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) a) volume (x100); b) volume (x200); c) volume (x500) e d) volume (x500)



Fonte: autoria própria.

De acordo com a comparação das microscopias, a amostra AGPVAOG, parece apresentar maior diâmetro dos poros e uma disposição dos materiais mais heterogêneas, enquanto, a amostra AGGLOG apresenta-se folheada, com poros menores e mais definidos e disposições mais homogêneas dos materiais ao longo da estrutura. Os fatores de variação na velocidade de congelamento e viscosidade dos hidrogéis podem estar relacionados com o diâmetro dos poros, portanto, à medida que outros materiais são adicionados a solução, esses fatores vão ficando em evidência (RUBIRA *et al.*, 2009).

Todos os hidrogéis apresentaram sinais de degradação em suas estruturas, principalmente achatamento na parte que entrou em contato com a placa no momento da extrusão.

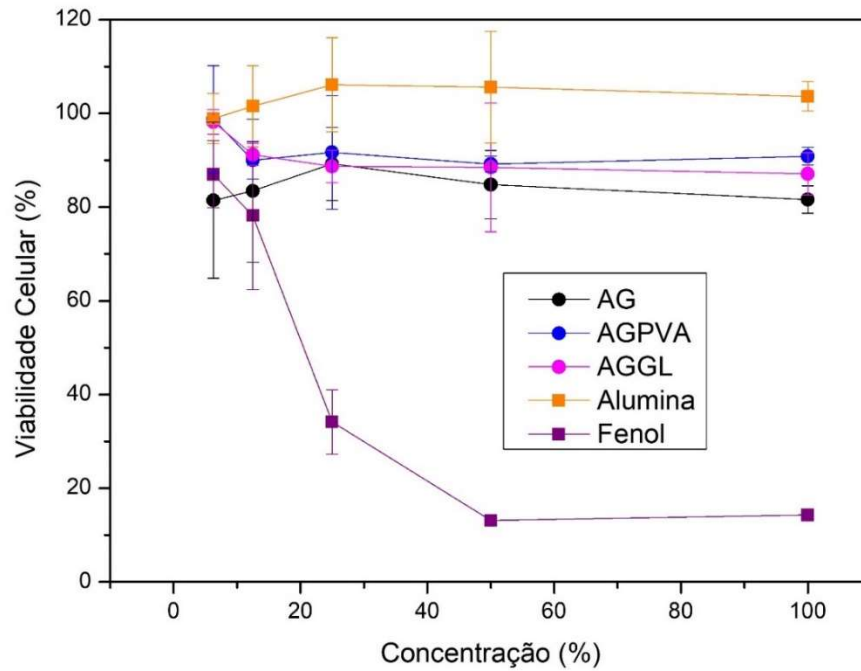
5.6 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade das amostras foi conduzido utilizando a metodologia de incorporação do corante vermelho neutro. Além de avaliar possíveis efeitos citotóxicos dos materiais, esse método também proporciona informações sobre o mecanismo de ação das amostras em relação às células (MARTINS *et al.*, 2019).

Nesse contexto, o corante vermelho neutro é capaz de penetrar na célula e interagir com a matriz lisossomal, ocasionando modificações em sua função. Essa interação ocorre devido à formação de ligações eletrostáticas com a membrana lisossomal. Portanto, quando a matriz lisossomal é afetada pelo material em estudo, ocorre uma redução na captura do corante, evidenciando uma alteração na função da matriz. Assim, a diminuição da captura do corante vermelho neutro indica um comprometimento da função da matriz lisossomal em decorrência da interação com as amostras avaliadas. Essa observação sugere um possível efeito do material sobre os processos intracelulares relacionados à matriz lisossomal (LÓPEZ; LUCAS, 2021; ROGERO *et al.*, 2003).

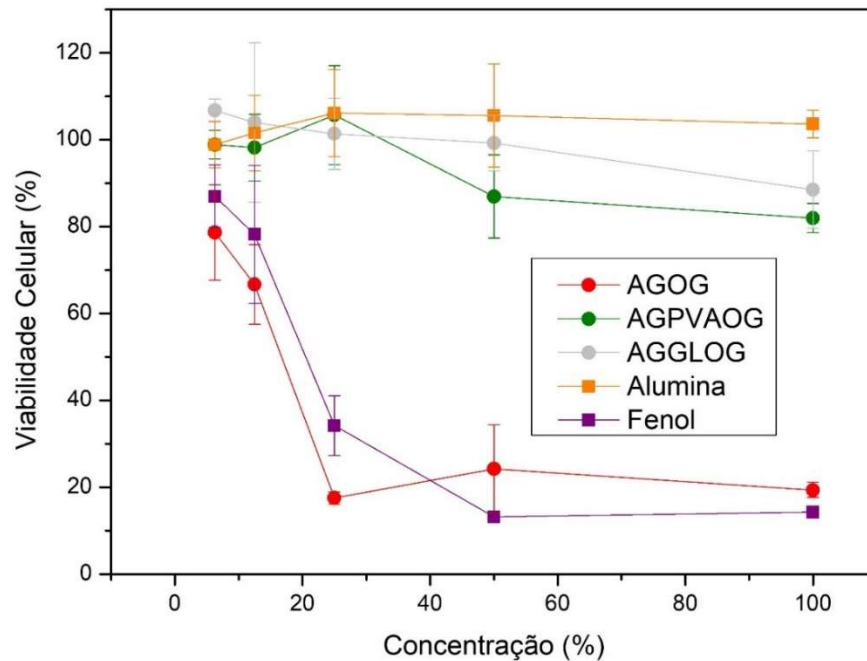
A Figura 28 e Figura 29 apresentam as curvas de viabilidade celular para os hidrogéis e os controles utilizados no estudo. Ao analisar os resultados, é possível observar que a maioria dos hidrogéis, juntamente com o controle negativo (alumina), não apresentaram efeito citotóxico, demonstrando uma viabilidade celular acima de 80%. No entanto, uma exceção é observada para a amostra AGOG, que apresentou um perfil diferente. O perfil para essa amostra foi semelhante ao controle positivo (fenol), exibindo uma diminuição significativa da viabilidade celular, indicando uma possível influência adversa desse material nas células.

Figura 28: Curva de viabilidade celular para as amostras alginato e gelatina (AG), alginato, gelatina e álcool polivinílico (AGPVA) e alginato, gelatina e glicerol (AGGL) e controle negativo (alumina) e positivo (fenol) pela incorporação de VN, utilizando linhagem celular CHO-K1 (ovário de Hamster chinês)



Fonte: autoria própria.

Figura 29: Curva de viabilidade celular para as amostras alginato, gelatina e óxido de grafeno (AGOG), alginato, gelatina, álcool polivinílico e óxido de grafeno (AGPVAOG) e alginato, gelatina, glicerol e óxido de grafeno (AGGLOG) e controle negativo (alumina) e positivo (fenol) pela incorporação de VN, utilizando linhagem celular CHO-K1 (ovário de Hamster chinês)



Fonte: autoria própria.

A concentração de óxido de grafeno na amostra AG é maior, pois contém apenas alginato e gelatina, o oposto das amostras AGPVAOG e AGGLOG, que possuem álcool polivinílico e glicerol em suas composições. Portanto, é possível que a maior concentração de óxido de grafeno tenha influenciado na toxicidade do hidrogel, ou a presença dos plastificantes PVA ou glicerol tenha impactado em sua toxicidade. É importante ressaltar que a toxicidade do OG não depende apenas da quantidade, mas também de outros fatores, como a forma de exposição, a duração da exposição e as características do sistema biológico em estudo.

Além da maior concentração de óxido de grafeno na amostra AGOG, os resultados do ensaio de intumescimento na Figura 16 também mostram uma menor absorção de água em comparação com as outras amostras que contêm óxido de grafeno. Esse ensaio é realizado em meio líquido, o que pode facilitar a liberação do óxido de grafeno presente no hidrogel. Essa liberação pode ser uma das razões pelas quais a amostra AGOG demonstrou maior toxicidade.

No estudo dos grânulos esféricos de hidrogel poroso, os ensaios de citotoxicidade revelaram que as amostras contendo menos de 0,5% de óxido de grafeno não demonstraram toxicidade celular quando a concentração de GT-GO5 foi inferior a 125 µg/mL. Esses resultados indicam que a concentração dos materiais pode influenciar na resposta do óxido de grafeno (RAHMANI; SAHRAEI; GHAEMY, 2018).

É difícil comparar os efeitos citotóxicos do óxido de grafeno entre diferentes estudos devido à diversidade de tamanhos, formas e superfícies. Por exemplo, diferentes métodos de produção resultam em diferentes quantidades de oxigênio ligadas à sua superfície, o que tem se mostrado correlacionado com sua toxicidade em células e outros sistemas vivos. Existe a necessidade de padronizar a terminologia, a fabricação e a validação de metodologias toxicológicas. A padronização fornecerá informações necessárias aos pesquisadores para melhor compreender as características físico-químicas e os possíveis efeitos toxicológicos em células e animais, facilitando assim a aplicação prática desses promissores novos nanomateriais em seres humanos.

Esforços recentes tem se concentrado em modificar o óxido de grafeno com moléculas que conferem biocompatibilidade, como polímeros biodegradáveis ou grupos funcionais específicos com a finalidade de reduzir a sua citotoxicidade, além de buscar novos métodos para obter o OG (AHADIAN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2013).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foram formulados hidrogeis utilizando uma solução de fosfato de sódio com pH 7,4, contendo alginato 3% (m/v), gelatina 10% (m/v), óxido de grafeno (0,10%), álcool polivinílico 3% (m/v) e glicerol 2% (m/v). As amostras foram identificadas como AG, AGOG, AGPVA, AGGL, AGPVAOG e AGGLOG, de acordo com suas formulações.

Os resultados obtidos por meio do ensaio de reômetro através da curva de fluxo indicaram um comportamento pseudoplástico para todas as amostras, com a viscosidade reduzindo à medida que a taxa de cisalhamento aumenta. Notou-se uma semelhança no comportamento entre os hidrogeis AG e AGGL, sugerindo que a adição de glicerol não teve um impacto significativo na viscosidade aparente.

O ensaio de injetabilidade revelou um alto índice de injetabilidade para todas as amostras, com resultados superiores a 97%. As curvas representativas de força versus tempo mostraram tendência semelhante à curva de fluxo determinada pelo reômetro. Observou-se que a adição de glicerol ou outros materiais pode afetar a capacidade de injeção manual do hidrogel, uma vez que a amostra AG se comportou de forma diferente das demais.

Quanto ao ensaio de intumescimento, todas as amostras apresentaram redes poliméricas fracas após 6 horas, com absorção inicial mais acentuada e contínua quando PVA ou glicerol estavam presentes, sem atingir um limite de saturação.

A análise por FTIR não mostrou mudanças significativas nas bandas de absorção com a adição dos materiais óxido de grafeno, glicerol e álcool polivinílico. Por meio do MEV, observou-se que as amostras contendo PVA apresentaram superfícies mais lisas, enquanto as demais mostraram fraturas, além de estruturas altamente porosas nas amostras AGPVAOG e AGGLOG. Todas as amostras exibiram achatamento em sua estrutura.

No ensaio de citotoxicidade, a maioria das formulações não apresentou citotoxicidade, exceto o hidrogel AGOG, que possuía uma concentração maior de óxido de grafeno e não continha PVA ou glicerol.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o uso de outros polímeros para a formulação dos hidrogeis;
- Explorar diferentes métodos, como a incorporação de agentes reforçadores ou estratégias de reticulação;
- Avaliar a possibilidade de imprimir os hidrogeis em uma impressora 3D;
- Avaliar a viabilidade celular após a impressão por extrusão;
- Investigar a concentração de óxido de grafeno que torna o material citotóxico;
- Realizar estudos *in vivo* para avaliar o desempenho e a biocompatibilidade dos materiais em modelos animais relevantes;
- Avaliar a escalabilidade do processo de síntese e viabilidade econômica na produção em grande escala;
- Comparar os hidrogeis desenvolvidos com outros sistemas disponíveis comercialmente em termos de propriedades e desempenho.

REFERÊNCIAS

- AHADIAN, S. et al. Facile and green production of aqueous graphene dispersions for biomedical applications. *Nanoscale*, v. 7, n. 15, p. 6436–6443, Apr. 2015.
- AHMAD, I.; OLIVEIRA, H.; MUMTAZ, A. Hydrogel scaffold-based fiber composites for engineering applications. *Hybrid Fiber Composites*, p. 351–367, Oct. 2020.
- AHRENS, C. H. et al. Engenharia reversa por meio de fotogrametria: estudo comparativo da técnica de digitalização tridimensional visando aplicação na manufatura aditiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE FABRICAÇÃO, 7., 2013, Penedo. Anais [...]. Rio de Janeiro: ABCM, 2013.
- ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A. M. Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 2, p. 989–995, 2001.
- ANTICH, C.; DE VICENTE, J.; JIMÉNEZ, G. Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs. *Acta Biomaterialia*, v. 106, p. 114–123, Apr. 2020.
- ARIOLI, G. A. Polímeros termorresponsivos: principais características do hidrogel e aplicações biomédicas. 2022. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.
- ARMSTRONG, J. P. K.; BURKE, M.; CARTER, B. M. 3D bioprinting using a templated porous bioink. *Advanced Healthcare Materials*, v. 5, n. 14, p. 1724–1730, July 2016.
- ASHAMMAKHI, N.; AHADIAN, S.; ZENGJIE, F. Advances and future perspectives in 4D bioprinting. *Biotechnology Journal*, v. 13, n. 12, Dec. 2018. DOI: 10.1002/biot.201800148.
- AXPE, E.; OYEN, M. L. Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 12, Nov. 2016. DOI: 10.3390/ijms17121976.
- BILLIET, T.; GEVAERT, E.; DE SCHRYVER, T. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. *Biomaterials*, v. 35, n. 1, p. 49–62, 2014.
- BOCIAGA, D.; BARTNIAK, M.; GRABARCZYK, J. Sodium alginate/gelatine hydrogels for direct bioprinting-the effect of composition selection and applied solvents on the bioink properties. *Materials*, v. 12, n. 17, Sept. 2019. DOI: 10.3390/ma12172669.

- BORTOLIN, A. Desenvolvimento de nanocompósitos baseados em hidrogéis aplicados à liberação de nutrientes agrícolas. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- BORTOLIN, A.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Nanocomposite PAAm/methyl cellulose/montmorillonite hydrogel: evidence of synergistic effects for the slow release of fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 31, p. 7431– 7439, Aug. 2013.
- BROUGHAM, M. J.; JOHNSON, D. B. Glycerol,-glycerophosphate and other compounds as stabilizers of alcohol dehydrogenase from yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, n. 3, p. 225-228, July 1981.
- CALADO, L. Desenvolvimento de compósitos poliméricos: estudo da sua reologia e extrusão. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa, Lisboa, 2015.
- CHANG, C. et al. Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery. *European Polymer Journal*, v. 46, n. 1, p. 92–100, Jan. 2010.
- CHEN, X.; TAGUCHI, T. Injectable, non-diffusible, and pre-filled bone paste composed of α -tricalcium phosphate and hydrophobically modified poly(Vinyl Alcohol). *Advanced Engineering Materials*, v. 21, n. 11, Nov. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1002/adem.2018900660>.
- CHIMENE, D.; KAUNAS, R.; GAHARWAR, A. K. Hydrogel bioink reinforcement for additive manufacturing: a focused review of emerging strategies. *Advanced Materials*, v. 32, n. 1, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201902026>.
- CHOPRA, H.; KUMAR, S.; SINGH, I. Bioinks for 3D printing of artificial extracellular matrices. In: DU TOIT, L. C.; CHOONARA, Y. E. *Advanced 3D-printed systems and nanosystems for drug delivery and tissue engineering*. Sawston: Woodhead, 2020. p. 1–37.
- CILURZO, F. et al. Injectability evaluation: an open issue. *AAPS PharmSciTech*, v. 12, n. 2, p. 604–609, June 2011.
- CONSTANTIN, M. et al. Preparation and characterisation of poly(vinyl alcohol)/cyclodextrin microspheres as matrix for inclusion and separation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 285, n. 1–2, p. 87–96, Nov. 2004.
- COSTA, C. Caracterização reológica de fluidos complexos. *Revista Brasileira de Iniciação Científica*, v. 4, n. 7, p. 3-28, 2017. Ed.Especial Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

- CROOK, J. M. (Ed.). 3D Bioprinting: principles and protocols. Totowa: Humana, 2020. (Methods in Molecular Biology Book, 2140).
- CUNHA, I. S. Desenvolvimento de substituto ósseo injectável para regeneração óssea. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia do Porto, Porto, 2009.
- DEL-MAZO-BARBARA, L.; GINEBRA, M. P. Rheological characterisation of ceramic inks for 3D direct ink writing: a review. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 41, n. 16, p. 18–33, Dec. 2021.
- DUAN, J.-J.; ZHANG, L.-Na. Robust and smart hydrogels based on natural polymers. *Chinese Journal of Polymer Science*, v. 35, n. 10, p. 1165–1180, Oct. 2017.
- FELDMAN, D. Poly(Vinyl alcohol) recent contributions to engineering and medicine. *Journal of Composites Science*, v. 4, n. 4, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcs4040175>.
- FONTES, A. B.; MARCOMINI, R. F. 3D Bioprinting: a review of materials, processes and bioink properties. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 6, n. 5, p. 0617– 0639, Dec. 2020.
- GAO, Q. et al. Coaxial nozzle-assisted 3D bioprinting with built-in microchannels for nutrients delivery. *Biomaterials*, v. 61, p. 203–215, Aug. 2015.
- GOMES, M. E. et al. Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties. *Materials Science and Engineering C*, v. 20, p.19-26, 2002.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, v. 20, n. 1, p. 3–16, Jan. 2009.
- GUERRERO-CONTRERAS, J.; CABALLERO-BRIONES, F. Graphene oxide powders with different oxidation degree, prepared by synthesis variations of the Hummers method. *Materials Chemistry and Physics*, v. 153, p. 209–220, Mar. 2015.
- GUILLEMOT, F.; MIRONOV, V.; NAKAMURA, M. Bioprinting is coming of age: report from the international conference on bioprinting and biofabrication in Bordeaux (3B'09). *Biofabrication*, v. 2, n. 1, Mar. 2010. DOI: 10.1088/1758-5082/2/1/010201.
- HARAGUCHI, K.; TAKEHISA, T. Nanocomposite hydrogels: a unique organic– inorganic network structure with extraordinary mechanical, optical, and swelling/de-swelling properties. *Advanced Materials*, v. 14, n. 16, p. 1120–1124, 2002.
- HARDMAN, D.; THURUTHEL, T. G.; IIDA, F. Self-healing ionic gelatin/glycerol hydrogels for strain sensing applications. *NPG Asia Materials*, v. 14, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41427-022-00357-9>.

- HARING, A. P. et al. Process- and bio-inspired hydrogels for 3D bioprinting of soft free-standing neural and glial tissues. *Biofabrication*, v. 11, n. 2, Feb. 2019.
DOI: 10.1088/1758-5090/ab02c9.
- HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels. *Macromolecules*, v. 33, n. 7, p. 2472–2479, Apr. 2000.
- HELARY, C. et al. Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes. *Biomaterials*, v. 31, n. 3, p. 481–490, Jan. 2010.
- HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 13–36, 2002.
- HOCKADAY, L. A. et al. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. *Biofabrication*, v. 4, n. 3, Sept. 2012. DOI: 10.1088/1758-5082/4/3/035005.
- HOFFMAN, A. S. Stimuli-responsive polymers: Biomedical applications and challenges for clinical translation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, n. 1, p. 10–16, Jan. 2013.
- HORVATH, L. et al. Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting. *Scientific Reports*, v. 5, Jan. 2015. DOI: 10.1038/srep07974.
- HOSPODIUK, M. et al. The bioink: a comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*, v. 35, n. 2, p. 217–239, Mar. 2017.
- HU, J. et al. High fracture efficiency and stress concentration phenomenon for microgel-reinforced hydrogels based on double-network principle. *Macromolecules*, v. 45, n. 23, p. 9445–9451, Dec. 2012.
- HUANG, B. et al. Mechanically strong, heat-resistant, water-induced shape memory poly(vinyl alcohol)/regenerated cellulose biocomposites via a facile coprecipitation method. *Biomacromolecules*, v. 20, n. 10, p. 3969–3979, Oct. 2019.
- HUGHES, J.; RUS, D. Mechanically programmable, degradable & ingestible soft actuators. In: *IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON SOFT ROBOTICS*, 3., 3030, New Haven. Proceedings [...]. DOI: 10.1109/RoboSoft48309.2020.9116001.
- HUSSAIN, Z.; PEI, R. Scaffold-free and scaffold-based cellular strategies and opportunities for cornea tissue engineering. *Progress in Biomedical Engineering*, v. 3, n. 3, July 2021.
DOI: 10.1088/2516-1091/ac12d7.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5: biological evaluation of medical devices — part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: ISO, 2009.

- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. ISO 10993-10: biological evaluation of medical devices — part 10: tests for irritation and skin sensitization. Geneva: ISO, 2009.
- IZADIFAR, Z. et al. Analyzing biological performance of 3Dprinted, cell-impregnated hybrid constructs for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering - part C: methods*, v. 22, n. 3, p. 173–188, Mar. 2016.
- JIANG, T. et al. Extrusion bioprinting of soft materials: an emerging technique for biological model fabrication. *Applied Physics Reviews*, v. 6, n. 1, Mar. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1063/1.5059393>.
- JORGENSEN, A. M. et al. Bioprinted skin recapitulates normal collagen remodeling in full-thickness wounds. *Tissue Engineering - part A*, v. 26, n. 9–10, p. 512–526, May 2020.
- KAČAREVIĆ, Ž. P. et al. An Introduction to 3D bioprinting: possibilities, challenges and future aspects. *Materials*, v. 11, n. 11, Nov. 2018. DOI: 10.3390/ma11112199.
- KODAMA, H. Automatic method for fabricating a three-dimensional plastic model with photo-hardening polymer. *Review of Scientific Instruments*, v. 52, n. 11, p. 1770–1773, 1981.
- KONOPKA, K. et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1312, p. 186–196, 1996.
- KULKARNI, V. Natural polymers - a comprehensive review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v. 3, n. 4, p. 1597-1613, Dec. 2012.
- KUNDU, B.; KUNDU, S. C. Silk sericin/polyacrylamide in situ forming hydrogels for dermal reconstruction. *Biomaterials*, v. 33, n. 30, p. 7456–7467, Oct. 2012.
- KUNDU, J. et al. An Additive manufacturing-based PCL-alginatechondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 9, n. 11, p. 1286–1297, Nov. 2015.
- LAZĀR, A. I. et al. Graphene-related nanomaterials for biomedical applications. *Nanomaterials*, v. 13, n. 6, Mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano13061092>.
- LI, J. et al. 3D Printing of cytocompatible graphene/alginate scaffolds for mimetic tissue constructs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, July 2020.
DOI: <https://doi.org/10.3389/fbiol.2020.00824>.
- LI, J. et al. 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications. *Materials Science and Engineering R: reports*, v. 140, Apr. 2020.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mser.2020.100543>.

- LI, Y. et al. Sodium alginate-gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity. *Journal of Membrane Science*, v. 375, n. 1–2, p. 304–312, June 2011.
- LIU, X. et al. A Biofabricated vascularized skin model of atopic dermatitis for preclinical studies. *Biofabrication*, v. 12, n. 3, Apr. 2020. DOI: 10.1088/1758-5090/ab76a1.
- LÓPEZ, A. M. Q.; LUCAS, J. A. Cytological aspects of compatible and incompatible interactions between cashew (*Anacardium occidentale* L.) seedlings and isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) complex. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 43, n. 2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-29452021701>.
- LUU, C. H. et al. Graphene oxide-reinforced alginate hydrogel for controlled release of local anesthetics: synthesis, characterization, and release studies. *Gels*, v. 8, n. 4, Apr. 2022. DOI: 10.3390/gels8040246.
- MA, Z. et al. Bioinspired tough gel sheath for robust and versatile surface functionalization. *Science Advances*, v. 7, n. 15, Apr. 2021. DOI: 10.1126/sciadv.abc3012.
- MANKOVICH, N. J.; CHEESEMAN, A. M.; STOKER, N. G. The Display of three-dimensional anatomy with stereolithographic models. *Journal of Digital Imaging*, v. 3, n. 3, p. 200-203, Aug. 1990.
- MARKSTEDT, K. et al. 3D Bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. *Biomacromolecules*, v. 16, n. 5, p. 1489–1496, May 2015.
- MARRO, A.; BANDUKWALA, T.; MAK, W. Three-dimensional printing and medical imaging: a review of the methods and applications. *Current Problems in Diagnostic Radiology*, v. 45, n. 1, p. 2–9, 2016.
- MARTINS, M. L. et al. Antibacterial and cytotoxic potential of a Brazilian red propolis. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 19, n. 1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.4034/PBOCI.2019.193.93>.
- MATOZINHOS, I. P. et al. Impressão 3D: inovações no campo da medicina. *Revista Interdisciplinar Ciências Médicas-MG*, v. 1, n. 1, p. 143–162, 2017.
- MOREIRA, C. D. F. Hidrogéis injetáveis a base quitosana/gelatina/nanopartículas de vidro bioativo com potência para regeneração óssea: estudo in vitro e in vivo. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

- NUNES, P. S. et al. Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 99, n. 3, p. 1011–1014, 2010.
- ONUH, S. O.; YUSUF, Y. Y. Rapid prototyping technology: applications and benefits for rapid product development. *Journal of Intelligent Manufacturing*, v. 10, n. 3, p. 301–311, 1999.
- OOI, H. W. et al. Thiol-ene alginate hydrogels as versatile bioinks for bioprinting. *Biomacromolecules*, v. 19, n. 8, p. 3390–3400, Aug. 2018.
- OVSIANIKOV, A.; KHADEMHOSEINI, A.; MIRONOV, V. The Synergy of scaffold-based and scaffold-free tissue engineering strategies. *Trends in Biotechnology*, v. 36, n. 4, p. 348–357, Apr. 2018.
- PAL, K.; BANTHIA, A. K.; MAJUMDAR, D. K. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *AAPS PharmSciTech*, v. 16, n. 8, Mar. 2007. DOI: 10.1208/pt080121.
- PARK, H. E. et al. Effect of temperature on gelation and cross-linking of gelatin methacryloyl for biomedical applications. *Physics of Fluids*, v. 32, n. 3, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.514496>.
- PATI, F. et al. Extrusion bioprinting. In: ATALA, A.; YOO, J. J. (Ed.). *Essentials of 3D biofabrication and translation*. New York: Academic Press, 2015. Chap.7, p. 123–152.
- PEPELANOVA, I. et al. Gelatin-methacryloyl (GelMA) hydrogels with defined degree of functionalization as a versatile toolkit for 3D cell culture and extrusion bioprinting. *Bioengineering*, v. 5, n. 3, July 2018. DOI: 10.3390/bioengineering5030055.
- PIAO, J.; ADACHI, S. Stability of O/W emulsions prepared using various monoacyl sugar alcohols as an emulsifier. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 7, n. 3, p. 211–216, Sept. 2006.
- RODRIGUES, V. P. et al. Manufatura Aditiva: estado-da-arte e framework de aplicações. *Revista Gestão da Produção Operações e Sistemas*, v. 12, n. 3, jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.15675/gepros.v2i3.1657>.
- QUEIROZ, P. M. Síntese e caracterização de nanopartículas de vidro bioativo contendo Ca e Mn e incorporação em hidrogéis injetáveis de Pluronic® F127. 2021. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.
- RAHMANI, Z.; SAHRAEI, R.; GHAEMY, M. Preparation of spherical porous hydrogel beads based on ion-crosslinked gum tragacanth and graphene oxide: study of drug delivery behavior. *Carbohydrate Polymers*, v. 194, p. 34–42, Aug. 2018.

- ROGERO, S. O. et al. Biocompatibility study of polymeric biomaterials. *Artificial Organs*, v. 27, n. 5, p. 424-427, May 2003.
- RUBIRA, A. F. et al. Morfologia de hidrogéis-IPN termo-sensíveis e pH-responsivos para aplicação como biomaterial na cultura de células. *Polímeros*, v. 19, n. 2, 2009.
DOI: <https://doi.org/10.15908/50104-14282009000200006>.
- RUSTAD, K. C. et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. *Biomaterials*, v. 33, n. 1, p. 80–90, Jan. 2012.
- SAKAI, T. et al. Design and fabrication of a highstrength hydrogel with ideally homogeneous network structure from tetrahedron-like macromonomers. *Macromolecules*, v. 41, n. 14, p. 5379–5384, July 2008.
- SANWLANI, S.; KUMAR, P.; BOHIDAR, H. B. Hydration of gelatin molecules in glycerol-water solvent and phase diagram of gelatin organogels. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 115, n. 22, p. 7332–7340, June 2011.
- SARAIVA, S. M. et al. Synthesis and characterization of a photocrosslinkable chitosangelatin hydrogel aimed for tissue regeneration. *RSC Advances*, v. 5, n. 78, p. 63478–63488, 2015.
- SCHMID, J. Design and manufacture an elevator for a tissue printer. 2008. Thesis (MsC) – ETH Zürich, Zürich, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3929/ethz-a-005638616>.
- SCHUBERT, C.; VAN LANGEVELD, M. C.; DONOSO, L. A. Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. *British Journal of Ophthalmology*, v. 98, n. 2, p. 159–161, Feb. 2014.
- SHI, S. et al. Facile preparation of hydrogen-bonded supramolecular polyvinyl alcoholglycerol gels with excellent thermoplasticity and mechanical properties. *Polymer*, v. 111, p. 168–176, Feb. 2017.
- SHI, Y. et al. Tyrosinase-doped bioink for 3D bioprinting of living skin constructs. *Biomedical Materials (Bristol)*, v. 13, n. 3, Mar. 2018. DOI: 10.1088/1748-605X/aaa5b6.
- SHIM, J. H. et al. Bioprinting of a mechanically enhanced threedimensional dual cell-laden construct for osteochondral tissue engineering using a multi-head tissue/organ building system. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, v. 22, n. 8, 2012.
DOI: 10.1088/0960-1317/22/8/085014.
- SHINTAKE, J. et al. Soft pneumatic gelatin actuator for edible robotics. 2017.
DOI: 10.1109/IROS.2017.8206525.

- SINHA, A. et al. Poly(vinyl alcohol)-hydroxyapatite biomimetic scaffold for tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, v. 27, n. 1, p. 70–74, Jan. 2007.
- SPICER, C. D. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: the importance of polymer choice. *Polymer Chemistry*, v. 11, n. 2, p. 184–219, Jan. 2020.
- STANTON, M. M.; SAMITIER, J.; SÁNCHEZ, S. Bioprinting of 3D hydrogels. *Lab on a Chip*, v. 15, n. 15, p. 3111–3115, June 2015.
- SU, A.; AL'AREF, S. J. History of 3D printing. In: AL'AREF, S. J. et al. *3D Printing applications in cardiovascular medicine*. New York: Academic Press, 2018. Chap.1, p. 1–10.
- SZYKOWSKA, M. I.; PAWLACZYK, A.; ROGOWSKI, J. ToF-SIMS and SEMEDS analysis of the surface of chosen bioindicators. *Applied Surface Science*, v. 255, n. 4, p. 1165–1169, Dec. 2008.
- TAN, Y. et al. 3D printing facilitated scaffold-free tissue unit fabrication. *Biofabrication*, v. 6, n. 2, June 2014. DOI: 10.1088/1758-5082/6/2/02411.
- TANAN, W.; PANICHPAKDEE, J.; SAENG SUWAN, S. Novel biodegradable hydrogel based on natural polymers: synthesis, characterization, swelling/reswelling and biodegradability. *European Polymer Journal*, v. 112, p. 678–687, Mar. 2019.
- THAKUR, S. et al. Recent progress in gelatin hydrogel nanocomposites for water purification and beyond. *Vacuum*, v. 146, p. 396–408, Dec. 2017.
- THOMPSON, A.; MASKERY, I.; LEACH, R. K. X-ray computed tomography for additive manufacturing: a review. *Measurement Science and Technology*, v. 27, n. 7, June 2016. DOI: 10.1088/0957-0233/27/7/072001.
- VAIDYA, M. Startups tout commercially 3D-printed tissue for drug screening. *Nature Medicine*, v. 21, n. 1, Jan. 2015. DOI: 10.1088/0957-0233/27/7/072001.
- VERCIK, A. Harmonic analysis of the nonlinear response of graphene oxide-based memristors. *IEEE Transactions on Electron Devices*, v. 68, n. 10, p. 4938–4943, Oct. 2021.
- WANG, C. et al. Three-dimensional in vitro cancer models: a short review. *Biofabrication*, v. 6, n. 2, June 2014. DOI: 10.1088/1758-5082/6/2/022001.
- WANG, S. et al. Culturing fibroblasts in 3D human hair keratin hydrogels. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 7, n. 9, p. 5187–5198, Mar. 2015.
- WANG, X. et al. Effect of bioglass on growth and biomineralization of saos-2 cells in hydrogel after 3d cell bioprinting. *Plos One*, v. 9, n. 11, Nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112497>.

- WINDER, J.; BIBB, R. Medical rapid prototyping technologies: state of the art and current limitations for application in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 63, n. 7, p. 1006-1015, July 2005.
- XIAO, C.; YANG, M. Controlled preparation of physical cross-linked starch-g-PVA hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, v. 64, n. 1, p. 37–40, Apr. 2006.
- YAN, X. et al. High strength and self-healable gelatin/polyacrylamide double network hydrogels. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 5, n. 37, p. 7683–7691, 2017.
- YE, Z. et al. Glycerol-modified poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) self-healing hydrogel for artificial cartilage. *Polymer International*, v. 72, n. 1, p. 27–38, Jan. 2023.
- YILMAZ, B. et al. Bioprinting: a review of processes, materials and applications. *Bioprinting*, v. 23, n. 12, May 2021. DOI: 10.1016/j.bprint.2021.e00148.
- YU, Y. et al. Evaluation of cell viability and functionality in vessel-like bioprintable cell-laden tubular channels. *Journal of Biomechanical Engineering*, v. 135, n. 9, Sept. 2013. DOI: 10.1115/1.4024575.
- ZHANG, B. et al. Mechanical properties, degradation performance and cytotoxicity of Mg-Zn-Ca biomedical alloys with different compositions. *Materials Science and Engineering C*, v. 31, n. 8, p. 1667–1673, Dec. 2011.
- ZHANG, B. et al. CAD-based design and pre-processing tools for additive manufacturing. *Journal of Manufacturing Systems*, v. 52, part. B, p. 227–241, July 2019.
- ZHANG, H.; GRÜNER, G.; ZHAO, Y. Recent advancements of graphene in biomedicine. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, n. 20, p. 2542–2567, May 2013.
- ZHANG, Y. et al. Characterization of printable cellular micro-fluidic channels for tissue engineering. *Biofabrication*, v. 5, n. 2, June 2013. DOI: 10.1088/1758-5082/5/2/025004.
- ZHENG, W. J. et al. Tough Al-alginate/Poly(N -isopropylacrylamide) hydrogel with tunable LCST for soft robotics. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 7, n. 3, p. 1758– 1764, Jan. 2015.
- ZHU, D.; WANG, H.; TRINH, P. Elastin-like protein-hyaluronic acid (ELP-HA) hydrogels with decoupled mechanical and biochemical cues for cartilage regeneration. *Biomaterials*, v. 127, p. 132–140, May 2017.