



PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS HÍBRIDOS DE
POLICAPROLACTONA (PCL) E HIDROGEL PRODUZIDOS POR BIOIMPRESSORA
3D

Carolina Barbosa de Andrade

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Aline Raybolt dos Santos

Rio de Janeiro

Março de 2020

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS HÍBRIDOS DE
POLICAPROLACTONA (PCL) E HIDROGEL PRODUZIDOS POR BIOIMPRESSORA
3D

Carolina Barbosa de Andrade

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO
ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Aline Raybolt dos Santos

Aprovada por: Prof^a Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Prof^a Aline dos Santos Raybolt

Prof Sérgio Álvaro de Souza Camargo Jr

Prof Marcos Farina de Souza

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2020

Andrade, Carolina Barbosa de

Produção e caracterização de arcabouços híbridos de policaprolactona (PCL) e hidrogel produzidos por bioimpressora 3D / Carolina Barbosa de Andrade. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2020.

XII, 76 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Aline Raybolt dos Santos

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2020.

Referências Bibliográficas: p. 69-76.

1. Bioimpressão 3D. 2. Hidrogel. 3. Regeneração Óssea. 4. PCL. 5. Quitosana/Gelatina I. Thiré, Rossana Mara da Silva Moreira *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título

“Questions of Science, Science and progress,

Do not speak as loud as my heart.”

The Scientist, Coldplay, 2002

“Você me pergunta pela minha paixão

Digo que estou encantada

Com uma nova invenção”

Belchior, 1976

Agradecimentos

Primeiramente eu gostaria de agradecer às forças do Universo que me guiaram até aqui, para a realização desse trabalho. Se não fosse esse modo de agir misterioso, porém certo, esse trabalho não teria sido concluído. Obrigada Universo, hoje e sempre, por ser abundante, próspero e generoso, e por me prover tudo que preciso sempre.

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras Aline Raybolt e Rossana Thiré, por terem apostado em mim, acreditado no meu potencial e me conduzido até aqui. São profissionais de excelência e sou muito grata pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Biopolímeros e Bioengenharia.

Agradeço à minha mãe, Mônica, por acreditar sempre em mim, e que por mais que tudo tenha ficado difícil no meio desse curso, sempre foi uma palavra de incentivo, de motivação para que eu chegasse até aqui. Agradeço também à minha avó Leny, a quem dedico esse trabalho, pois sem seu carinho, preocupação, incentivo e toda infraestrutura que me forneceu a vida inteira, eu jamais teria alcançado nada, em absoluto. Agradeço a meu pai Aloisio por sempre estar do meu lado, sempre acreditar em tudo que proponho, por mais louco que seja, e por sonhar meus sonhos loucos comigo. Sem vocês esse trabalho seria impossível.

Agradeço a meu namorado, Arthur, pois tê-lo encontrado no meio dessa jornada tornou tudo mais fácil, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por trazer humor, amor e paz aos meus dias, você foi um presente do meu mestrado. Agradeço a todas as minhas amigas, principalmente Gabriela, Isabela, Camila, Brunna e Érika, pois vocês deixaram tudo mais leve, e ter vocês ao meu lado faz a minha vida muito melhor.

Um grande obrigada para a equipe Biopoli, principalmente Marcelli, Arthur, Javier, Aline, Bruna, Agnes e Franz. Obrigada pelos conselhos, pela amizade, pelas risadas, companheirismo, e pela grande amizade que construímos nesse último ano. Vocês são meu dreamteam, e sou muito grata por terem me acolhido tão bem. Espero que ainda possamos trabalhar juntos por muito tempo.

Obrigada à CAPES pelo patrocínio e pela bolsa nesses dois anos de mestrado, ao PEMM por ter me dado toda a estrutura necessária para tornar este estudo possível e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ARCABOUÇOS HÍBRIDOS DE
POLICAPROLACTONA (PCL) E HIDROGEL PRODUZIDOS POR BIOIMPRESSORA
3D

Carolina Barbosa de Andrade

Março/2020

Orientadoras: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Aline dos Santos Raybolt

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

O objetivo principal deste trabalho foi produzir arcabouços híbridos, compostos por policaprolactona e hidrogel de quitosana/gelatina a partir de uma bioimpressora, buscando a aplicação para regeneração óssea e o desenvolvimento da técnica de bioimpressão. Também se buscou uma alternativa mais barata em relação ao uso de gelatinas modificadas para a regeneração óssea. Inicialmente foi feito o ajuste dos parâmetros de impressão, e foi avaliada a capacidade da bioimpressora em produzir peças compatíveis com seu modelo virtual. Foram analisadas as influências da velocidade e fator de extrusão para a impressão de hidrogéis e foram definidos os melhores parâmetros para a impressão dos arcabouços. Uma moldura em PCL foi produzida, com filamentos de 0,3 mm de diâmetro e 8,3 mm de comprimento e largura, foi impressa a 77°C, com infill de 20%, na velocidade de 30 mm.s⁻¹, com fator de extrusão de 1,2 e diâmetro do bico de impressão de 0,3. A peça de hidrogel preencheu os poros sendo impressa na velocidade de 5 mm.s⁻¹, fator de extrusão 1, temperatura de 23 °C, infill de 20% e o diâmetro do bico de 0,4 mm. Nessas condições, os arcabouços produzidos demonstraram ter boa printabilidade, houve interação química entre a quitosana e a gelatina para a formação do hidrogel, há degradação parcial do arcabouço ao final de 4 semanas, há potencial hemostático no material, ele é capaz de liberar íons para o ambiente e captar fluidos, e não é tóxico para as células estudadas. Com isso, o arcabouço proposto pode ser uma alternativa mais barata ao uso da gelatina modificada como biotinta.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

MANUFACTURE AND CHARACTERIZATION OF HYBRID SCAFFOLDS FROM
POLYCAPROLACTONE (PCL) AND HYDROGEL PRODUCED BY 3D BIOPRINTER

Carolina Barbosa de Andrade

March/2020

Advisors: Rossana Mara da Silva Moreira Thiré

Aline dos Santos Raybolt

Department: Metallurgical and Material Engineering

The main goal of this work was to produce hybrid scaffolds, composed of polycaprolactone and chitosan/gelatin hydrogel using a bioprinter, aiming its application for bone regeneration and the development of the bioprinting technique. A cheaper alternative was also sought in relation to the use of modified gelatins for bone regeneration. Initially, the adjustment of the printing parameters was made, and the ability of the bioprinter to produce parts compatible with its virtual model was evaluated. The influences of speed and extrusion factor for printing hydrogels were analyzed and the best parameters for scaffolds' printing were defined. A PCL frame was produced, with filaments of 0.3 mm in diameter and 8.3 mm in length and width, was printed at 77°C, with an infill of 20%, at a speed of 30 mm.s⁻¹, with an extrusion factor of 1.2 and nozzle diameter of 0.3. The hydrogel piece filled the pores and was printed at a speed of 5 mm.s⁻¹, extrusion factor 1, temperature of 23 °C, infill of 20% and the nozzle diameter of 0.4 mm. Under these conditions, the frameworks produced have demonstrated good printability, there was a chemical interaction between chitosan and gelatin to form the hydrogel, partial degradation of the framework after 4 weeks was detected, there is hemostatic potential in the material, it releases ions to the environment and captures fluids, and it is no toxic to the cells studied. Thus, the proposed framework may be a cheaper alternative to the use of modified gelatine as a biotint.

Sumário

I- INTRODUÇÃO.....	xii
II- OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo	5
2.2 Objetivos Específicos	5
III- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 Engenharia Tecidual	6
2.2 O Tecido Ósseo.....	8
2.3 Biofabricação	13
2.4 Hidrogéis.....	19
2.5 Gelatina e Quitosana	23
2.6 Associação de materiais.....	26
2.7 Caracterização dos materiais.....	27
IV- MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Materiais.....	29
4.2 Obtenção dos arcaouços de PCL e hidrogel.....	29
4.2.1 Design da estrutura 3D.....	30
4.2.2 Obtenção da tinta de biomaterial.....	32
4.2.3 Ajuste dos parâmetros de impressão	32
4.2.3.1 Velocidade X Fator de extrusão	33
4.2.4 Impressão da peça	35
4.3 Caracterização da tinta de biomaterial e dos arcaouços híbridos	36
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	36
4.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	36
4.3.3 Ensaio de degradação <i>in vitro</i>	37
4.3.3.1 Ensaio de degradação com solução simuladora de fluido corpóreo	37
4.3.3.2 Ensaio de degradação enzimática	38
4.3.4 Ensaio de absorção de fluidos	38
4.3.5 Ensaio de Desidratação	39
4.3.6 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	39
4.3.7 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	40
4.3.7.1 Cultura de células	40
4.3.7.2 Condições de cultura <i>in vitro</i>	40

4.3.7.3	Análise de citotoxicidade	40
4.3.7.4	Análise da Morfologia celular	41
V-	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Ajuste dos parâmetros de impressão	41
5.1.1	Impressão da moldura de Policaprolactona (PCL)	41
5.1.2	Velocidade x Fator de Extrusão	43
5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
5.3	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	49
5.4	Ensaio de Degradação	51
5.5	Teste de Absorção de Fluidos	55
5.6	Teste de desidratação	60
5.7	Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	61
a)	MTT	61
VI-	CONCLUSÃO	67
VII-	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	68
VIII-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 3. 1 O gráfico acima expressa quantidade de potenciais doadores de órgãos no primeiro semestre de 2019. Fonte: ABTO - 2019	7
Figura 3. 2 O gráfico expressa quantidade de doadores efetivos no período de janeiro a junho de 2019. Fonte: ABTO - 2019	8
Figura 3. 3 Esquema demonstrando duas das principais células envolvidas na remodelação óssea, bem como o osteóide. Adaptado de BUSTIN, STEPHEN. Molecular Biology of the Cell (2015).....	10
Figura 3. 4 Adaptação de Groll et al. 2019, mostrando a diferença entre biotintas (à esquerda) e tintas de biomateriais (à direita).....	15
Figura 3. 5 Esquema demonstrando a variação da printabilidade em função da biocompatibilidade. Adaptado de KYLE et al., 2017	17
Figura 3. 6 Desenho esquemático dos tipos de bioimpressoras existentes no mercado (Imagem adaptada de Gungor-Ozkerim, 2018).	18
Figura 3. 7 Desenho esquemático da parte ativa do tipo de bioimpressora que foi utilizada no presente estudo (Imagem adaptada de Gungor-Ozkerim, 2018).	18
Figura 3. 8 Observa-se um hidrogel de PVA-Quitosana obtido por esse processamento. Observa-se as zonas cristalinas, onde estão os microcristais e as zonas amorfas. Adaptado de ADDIN, 2005	21
Figura 3. 9 Grupos aniônicos (COO ⁻) interagindo com o íon Ca ²⁺ reticulando. Imagem obtida do site theorganicsolution	21
Figura 3. 10 Um poliânion de encontro a um policátion, gerando um complexo coacervado. Imagem obtida do site webofscience utilizando como palavra-chave “coacervado”.....	22
Figura 3. 11 Formação do hidrogel entre Carboximetilcelulose e alginato de sódio. Imagem obtida de ADDIN, 2005.....	22
Figura 3. 12 Estrutura química da gelatina. Imagem de DEVI et al., 2016.....	23
Figura 3. 13 Estrutura química da quitosana, onde n é o número de unidades monoméricas.	25
Figura 3. 14 Estrutura da unidade monomérica da policaprolactona, sendo n o número de unidades monoméricas.	27
Figura 4. 1 Visão superior do design do arcabouço de PCL	30
Figura 4. 2 Visão lateral do design do arcabouço de PCL.	30
Figura 4. 3 Visão superior do design do arcabouço de hidrogel.	31
Figura 4. 4 Visão lateral do design do arcabouço de hidrogel.	31
Figura 4. 5 Observa-se ambos arcabouços (de PCL e hidrogel) adicionados como parte no programa Slic3r®	31
Figura 4. 6 Aspecto do hidrogel de quitosana e gelatina obtido logo após o processamento	32
Figura 4. 7 Design escolhido para realização do teste de velocidade X fator de extrusão. O diâmetro da peça é de 0,3 mm.	34
Figura 4. 8 Figura esquemática demonstrando como foram obtidos os pontos medidos no ImageJ para obtenção do diâmetro médio impresso.	35
Figura 4. 9 Foto da bioimpressora Genesis II™ utilizada no presente estudo para realizar a impressão dos arcabouços híbridos.	36
Figura 5. 1 Dimensões das amostras medidas em comprimento, largura, altura e espessura de filamento dos arcabouços obtidos via bioimpressora expressos em milímetros.	42
Figura 5. 2 Imagem demonstrativa do teste de velocidade x fator de extrusão. Na figura A, aplicou-se o fator de extrusão de 0,7, na B 0,8 e na C 1,0.	43
Figura 5. 3 Gráfico de área x fator de extrusão à velocidade constante.	44

Figura 5. 4 Gráfico de fator de extrusão x diâmetro médio de filamento de gel depositado (em mm) sob diferentes velocidades. Diâmetro projetado: 0,3 mm.	45
Figura 5. 5 Figura A: se observa o arcabouço com a moldura de PCL impressa com o bico de 0,4. Figura B: se observa o arcabouço impresso com o bico de 0,25. O losango vermelho sinaliza um ponto com ausência de hidrogel.	46
Figura 5. 6 Na micrografia A se observa o arcabouço de uma visão frontal, as estrelas demonstram pontos onde não se vê hidrogel são pontos de tensão. Na micrografia B se vê o arcabouço de uma visão de fundo, observando sua estruturação de eixo 0-90°.....	47
Figura 5. 7 Na micrografia A observa-se um poro da moldura de PCL coberto parcialmente com um filme de hidrogel. A figura b ilustra a espessura do mesmo filme.	48
Figura 5. 8 Na figura A se nota o padrão de deposição do hidrogel sobre a moldura de PCL. Na figura B observa-se uma área onde o filme se desprendeu da moldura.	48
Figura 5. 9 Espectro de FTIR para o hidrogel, a quitosana pura e a gelatina pura com espectro do infravermelho na faixa de 500-4000 cm^{-1}	49
Figura 5. 10 Destaque da Figura 5.9 para o espectro de 800-2000 cm^{-1} . As setas indicam as bandas características da quitosana e da gelatina.	49
Figura 5. 11 Gráfico do perfil de degradação dos arcabouços em tampão e em saliva em função do tempo.	52
Figura 5. 12 Gráfico do perfil de degradação enzimática dos arcabouços em tampão e em saliva em função do tempo, com seus respectivos controles.	53
Figura 5. 13 Gráfico dos percentuais elementares em função do tipo de ensaio de absorção realizado.	54
Figura 5. 14 Na figura A tem-se o arcabouço seco em dessecador por 24 horas. Na Figura B observa-se o arcabouço após o tempo de 10 minutos em saliva. Na Figura C verifica-se o mesmo arcabouço após 180 minutos no mesmo fluido.	55
Figura 5. 15 Perfil de absorção dos arcabouços em saliva, água e tampão nos tempos de 0 a 25 minutos.....	56
Figura 5. 16 Perfil de absorção dos arcabouços em saliva, água e tampão nos tempos de 0 a 180 minutos.....	56
Figura 5. 17 Espectro por EDS da superfície do hidrogel do arcabouço antes do ensaio de absorção.	57
Figura 5. 18 Espectro por EDS da superfície do hidrogel do arcabouço depois de 3 horas do ensaio de absorção em saliva.	59
Figura 5. 19 Perfil de desidratação dos arcabouços em sílica e em estufa, a 37 °C no período de 0 a 30 minutos.....	61
Figura 5. 20 Na imagem acima observa-se os arcabouços imediatamente após a reação com o DMOS. Na imagem abaixo observa-se os arabouços após a retirada do sobrenadante.	63
Figura 5. 21 Micrografia das amostras após o teste de MTT. Na figura A mostra as células aderidas ao material mesmo após o teste. Na Figura B se vê a mesma região, em um aumento maior.	63
Figura 5. 22 Eletromicrografia do ensaio de adesão celular de 4 horas na figura A e 24 horas na figura B. As setas vermelhas marcam os locais de aglomerados celulares.....	64
Figura 5. 23 Na figura A se vê uma micrografia de cultura de 4 horas. Na B há uma micrografia de cultura de 24 horas.	65
Figura 5. 24 Ensaio celular de 4 horas em maior aumento	65
Figura 5. 25 Micrografia das células após cultura de 24 horas. Na figura A vê-se células arredondadas, algumas secretando matriz, e outras iniciando o espraiamento. Na figura B se observa uma célula já espraiada	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais tecnologias e feitos, em ordem cronológica. Adaptada de BERTHIAUME, MAGUIRE E YARMUSH, 2011	1
Tabela 2 Bandas de absorção no infravermelho características da quitosana com seus valores encontrados na literatura e os obtidos no presente estudo para a quitosana e o hidrogel (LAWRIE et al., 2007).	50
Tabela 3 Bandas de absorção no infravermelho características da gelatina com seus valores encontrados na literatura e os obtidos no presente estudo para a gelatina e o hidrogel (NG; YEONG; NAING, 2016) (IBRAHIM et al., 2011).	50
Tabela 4 Elementos presentes na análise de EDS com seus pesos percentuais, para os arcabouços após o teste de absorção em cada um dos fluidos apresentados. O arcabouço bruto, sem nenhum tipo de análise também está presente para efeito de comparação.	54
Tabela 5 Elementos presentes na análise de EDS, antes dos ensaios de absorção, com seus pesos percentuais, percentual atômico e o erro associado.	58
Tabela 6 Elementos presentes na análise de EDS com seus pesos percentuais, percentual atômico e o erro associado após o ensaio de absorção de 3 horas em saliva.	59
Tabela 7 Concentração celular média por amostra.	61
Tabela 8 Porcentagem média de viabilidade celular.	62

I- INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual se originou na década de 60, trazendo à comunidade científica uma alternativa aos transplantes convencionais. Unindo diversas áreas de pesquisa, é uma terapia que se baseia na utilização de células, materiais biocompatíveis e fatores de crescimento, usados separadamente ou em associação, para gerar estruturas similares aos tecidos, que irão auxiliar na recuperação de um órgão lesionado (LANZA et al. 2011).

Esse tipo de terapia possui um amplo espectro de aplicações, no qual, cita-se como principal, a recuperação de um tecido perdido, que pode ter função estrutural (como osso), de barreira e transporte (vasos sanguíneos) ou secretora (como fígado). Outras aplicações, no entanto, vêm sendo desenvolvidas, como por exemplo: (1) o desenvolvimento de tecidos extracorpóreos, para realizar triagens de diagnósticos, (2) testes toxicológicos de medicamentos, para avaliar a eficácia dos mesmos e definir doses seguras, (3) estudos básicos de desenvolvimento de tecido e morfogênese (BERTHIAUME; MAGUIRE; YARMUSH, 2011). A Tabela 1 mostra alguns marcos históricos da engenharia tecidual.

Tabela 1 Principais tecnologias e feitos, em ordem cronológica. Adaptada de BERTHIAUME, MAGUIRE E YARMUSH, 2011

ANO	TECNOLOGIA/FEITO	REFERÊNCIA
3000 AC	Enxertos de pele descritos em textos em Sânscrito, na Índia	HERMAN, 2002
1794	Enxertos de pele autólogos, na Europa	HERMAN, 2002
1881	Enxertos de pele cadavérica alógenos	HERMAN, 2002
1944	Enxertos de pele refrigerados alógenos	WEBSTER, 1944
1949	Criopreservação de células a temperaturas inferiores a 0 °C	POLGE; SMITH; PARKES, 1949
1952	Criopreservação de pele	BILLINGHAM; MEDAWAR, 1952
1962	Esponjas de Ivalon desenvolvidas como substitutos sintéticos de pele	CHARDACK et al., 1962
1975	Cultivo <i>in vitro</i> de queratinócitos	RHEINWATD; GREEN, 1975

1979	Epitélio autólogo cultivado, comercializado posteriormente como Epicel	GREEN; KEHINDE; THOMAS, 1979
1982	Matriz dérmica de colágeno e glicosaminoglicanos (GAG's)	YANNAS et al., 1982
1987	Termo engenharia tecidual é criado	VIOLA, 2003
1988	Transplante de células em polímeros biodegradáveis	VACANTI et al., 1988
1994	Cultura e transplante de condrócitos	BRITTBERG et al., 1994
2000	Primeira Impressão 3D de um rim para fins diagnósticos	COLPANI, 2018
2004	Primeiro arcabouço impresso por impressão 3D	WHITAKER, 2014
2006	Cultura de bexiga bioartificial <i>in vitro</i> e implante <i>in vivo</i>	ATALA et al., 2006
2008	Criação de traqueia a partir de matriz descelularizada semeada com células tronco humanas	MACCHIARINI et al., 2008
2010	Produção de organóides renais	UNBEKANDT E DAVIES, 2009

Conforme mostra a Tabela 1, as pesquisas foram se aprimorando e se tornando cada vez mais complexas para alcançar órgãos, e também, para atender melhor a finalidade a qual se destinam. Atualmente, uma das tecnologias que mais vem sendo estudada dentro da engenharia de tecidos é a impressão 3D, por sua capacidade de produzir peças pequenas e complexas com acurácia e reprodutibilidade.

Dentro de um ambiente *in vivo* existem diversos microambientes 3D com as mais variadas formas e topografias, sendo as células muito sensíveis a esses fatores (PIEUCHOT et al., 2018). Tendo isso em vista, é desejável que as mesmas estejam em um ambiente o mais familiar possível para poderem cumprir suas funções fisiológicas naturais. Foi desenvolvido, em 2018, um arcabouço de PLA, por meio de impressão 3D, com a superfície modificada com polidopamina e colágeno, buscando aumentar a bioatividade das células para a regeneração óssea e foi observado que a sua modificação resultou uma melhor resposta celular (TEIXEIRA et al., 2018).

No entanto, no método tradicional de impressão de arcabouços para posterior semeadura, não é possível obter uma distribuição anisotrópica de células, nem trabalhar com altas populações celulares desde o início. Então, ao observar essas deficiências de metodologia, e buscando inovação, surgiu a bioimpressão, que se utiliza dos mesmos princípios da impressão 3D, produzindo estruturas a partir de um modelo gerado no computador, com deposição de um material embebido em células, ou esferóides, camada a camada sobre os eixos X, Y e Z, sendo capaz de reproduzir estruturas complexas (MORONI et al., 2018). Esses modelos podem ser obtidos a partir de imagens de tomografias computadorizadas do paciente para a obtenção das características do tecido em questão, sendo uma técnica personalizada e que permite uma reprodução de alta complexidade (KANG et al., 2016).

Dentro do processo do bioimpressão, as biotintas são um componente muito importante para o sucesso da técnica. Hidrogéis são amplamente utilizados como base para biotintas por possuírem bastante água em sua composição mimetizando as propriedades da matriz extracelular (MEC) (GROLL et al., 2019; HÖLZL et al., 2016; MALDA et al., 2013). Existem diversos tipos de hidrogéis que são utilizados para esse fim, como por exemplo a quitosana e a gelatina (GUNGOR-OZKERIM et al., 2018).

Apesar de ser ainda uma tecnologia em desenvolvimento, a bioimpressão já demonstra ter um grande potencial para a impressão de vários tecidos como pele, cartilagem e osso (KUNDU ET AL., 2013; LEE ET AL., 2014; MCBETH ET AL., 2017). Existem diversos trabalhos na literatura abrangendo e esses tecidos, e, já foi demonstrado que a diferenciação de células tronco em uma linhagem específica pode ser alterada pela rigidez do microambiente da matriz na qual as células se encontram. Células-tronco somente se diferenciam em osteoblastos maduros e mineralizam em substratos rígidos (EVEN-RAM; ARTYM; YAMADA, 2006), portanto, para regeneração óssea a utilização de um hidrogel puramente macio pode não ser a melhor estratégia.

Buscando solucionar essa limitação, diversos estudos se dedicaram a desenvolver hidrogéis carregados de células com polímeros termoplásticos, malhas de nano ou microfibras e materiais inorgânicos. Quando esses compostos são adicionados ao hidrogel as propriedades mecânicas são melhoradas. Contudo, apesar dos hidrogéis híbridos serem mecanicamente resistentes, existem desvantagens que precisam ser levadas em conta, como: controle limitado sobre a arquitetura 3D, produtos de degradação tóxicos e propriedades mecânicas insuficientes em comparação com o tecido ósseo nativo (FEDOROVICH et al., 2011)(FEDOROVICH et al., 2012).

Em 2017 foi desenvolvido um sistema de um hidrogel reforçado com uma microestrutura impressa em impressora 3D de ácido polilático termoplástico biodegradável que teve resultados muito interessantes em termos de rigidez estrutural, demonstrando rigidez superior, até mesmo, à do osso (HEO et al., 2017). Em conjunto, esse mesmo material foi capaz de prover a estruturação ao arcabouço e também atuar de forma positiva sobre as células, estimulando a adesão celular, seu espalhamento, proliferação e diferenciação osteogênica demonstrando que sistemas híbridos podem ser eficientes no desenvolvimento de dispositivos para regeneração óssea.

I- OBJETIVOS

2.1 Objetivo

O objetivo dessa dissertação foi fabricar e caracterizar arcabouços híbridos de policaprolactona (PCL) e hidrogel de quitosana e gelatina por meio de bioimpressora visando aplicação em regeneração de tecido ósseo.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Obtenção do hidrogel de quitosana e gelatina;
- ✓ Avaliação dos parâmetros para impressão de peças de PCL;
- ✓ Avaliação dos parâmetros para impressão de peças do hidrogel;
- ✓ Impressão dos arcabouços híbridos de PCL e hidrogel utilizando bioimpressora 3D;
- ✓ Caracterização morfológica e físico-química dos arcabouços produzidos.
- ✓ Avaliação *in vitro* da viabilidade celular e adesão de células semeadas nos arcabouços híbridos impressos.

II- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Engenharia Tecidual

A engenharia tecidual, começou a se desenvolver, principalmente, no final da década de 60, onde Hubacek et al (1967) relataram a realização de uma cirurgia em ratos com um material inteiramente criado em laboratório. Foi sintetizado um hidrogel neutro que foi polimerizado em camadas subcutâneas dos animais, não desenvolvendo nenhuma resposta anti-inflamatória anormal ao material (HUBACEK et al., 1967). Esse procedimento abriu portas para a evolução de uma nova tecnologia: os biomateriais.

O Instituto Americano de Saúde (NIH) define os biomateriais como

“qualquer substância ou combinação de substâncias, com exceção de medicamentos sintéticos ou de origem natural, o qual pode ser utilizado durante qualquer período de tempo, que aumente ou substitua parcialmente ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, a fim de manter ou melhorar a qualidade de vida de um indivíduo.”

O estudo de engenharia tecidual engloba três tipos de terapia: (1) terapia com células; (2) terapia com arcabouços (ou *scaffolds*); (3) terapia com fatores de crescimento. Essas terapias podem ser utilizadas separadamente ou em conjunto para potencializar os resultados e criar estruturas similares a tecidos humanos (BERTHIAUME; MAGUIRE; YARMUSH, 2011).

A engenharia tecidual transita entre a medicina, química, ciência de materiais e biologia e, por ser tão multidisciplinar, tem passado por grandes desenvolvimentos e modificações desde seu início. Atualmente, existem muitas pesquisas sobre a regeneração e substituição de tecidos, fundamentados na recuperação de função por meio de substituição de partes do corpo perdidas. Dentro desse contexto, salienta-se o tratamento tradicional de transplante de órgãos e tecidos, que é um procedimento que já salvou milhares de vidas, mas que, no entanto, sofre com problemas de rejeição, sendo sempre necessária a utilização de imunomoduladores, e sofrendo também com a pouca oferta de doadores (WOOD et al., 2018).

O primeiro implante feito no mundo foi realizado em 1910. Peyton Rous executou um transplante de tecido embrionário, recebendo um prêmio Nobel pelo feito (ROUS, 1910). Muito progresso foi conseguido desde então, especialmente nas últimas 3 décadas. Entretanto, segundo a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos, em 2017, 32.716 pessoas aguardavam um transplante no Brasil, sendo o rim o órgão que possuía a maior fila. Estima-se

que naquele período 21.962 pessoas aguardavam para realizar o procedimento cirúrgico (ABTO, 2019). A Figura 3.1 e 3.2 demonstram gráficos com números de potenciais doadores e doadores efetivos, e é possível notar que existe uma diferença significativa entre os dois. Somente no estado de São Paulo, se vê que de 1527 doadores potenciais apenas 516 doadores realmente doaram órgãos efetivamente.

Apesar do Brasil possuir um dos maiores sistemas de transplantes do mundo e em franca expansão, muitos pacientes vêm a óbito na fila aguardando um doador. Quando se observa essa necessidade em nível mundial, o número sobe para 1,2 milhões de pessoas e calcula-se que apenas 10% dessas pessoas conseguem de fato realizar a cirurgia (GODT, 2017).

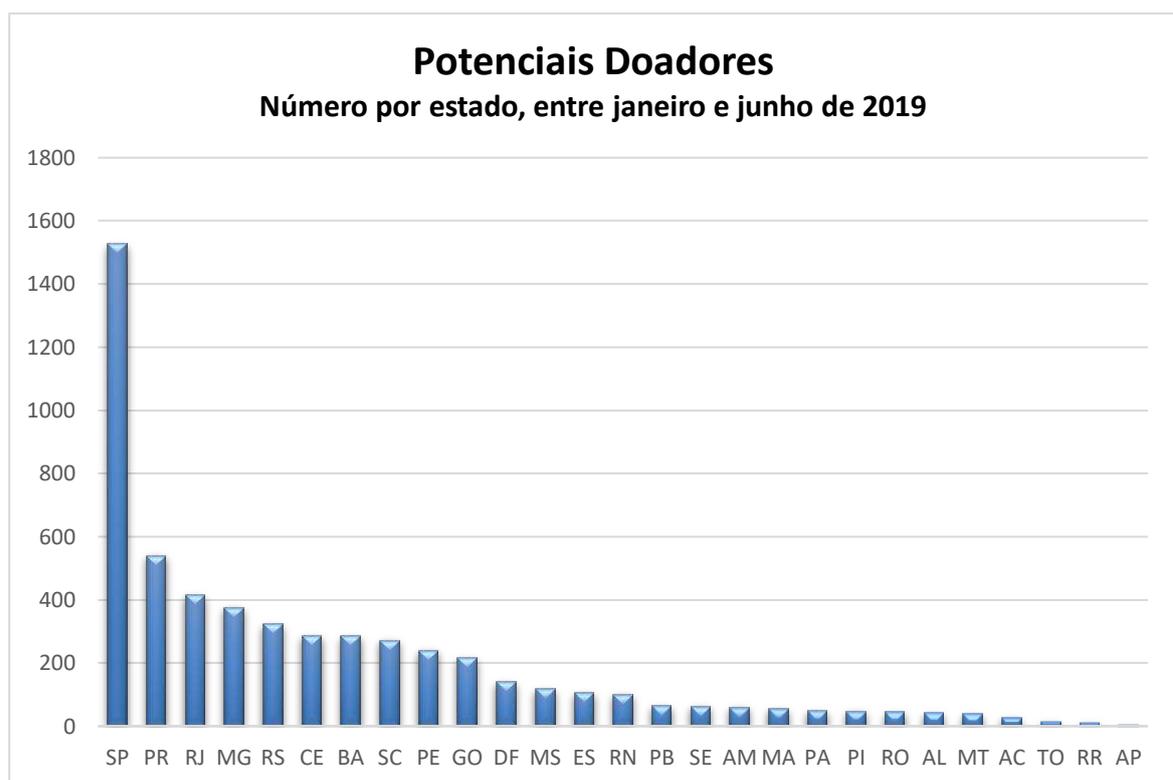


Figura 3. 1 O gráfico acima expressa quantidade de potenciais doadores de órgãos no primeiro semestre de 2019. Fonte: ABTO - 2019

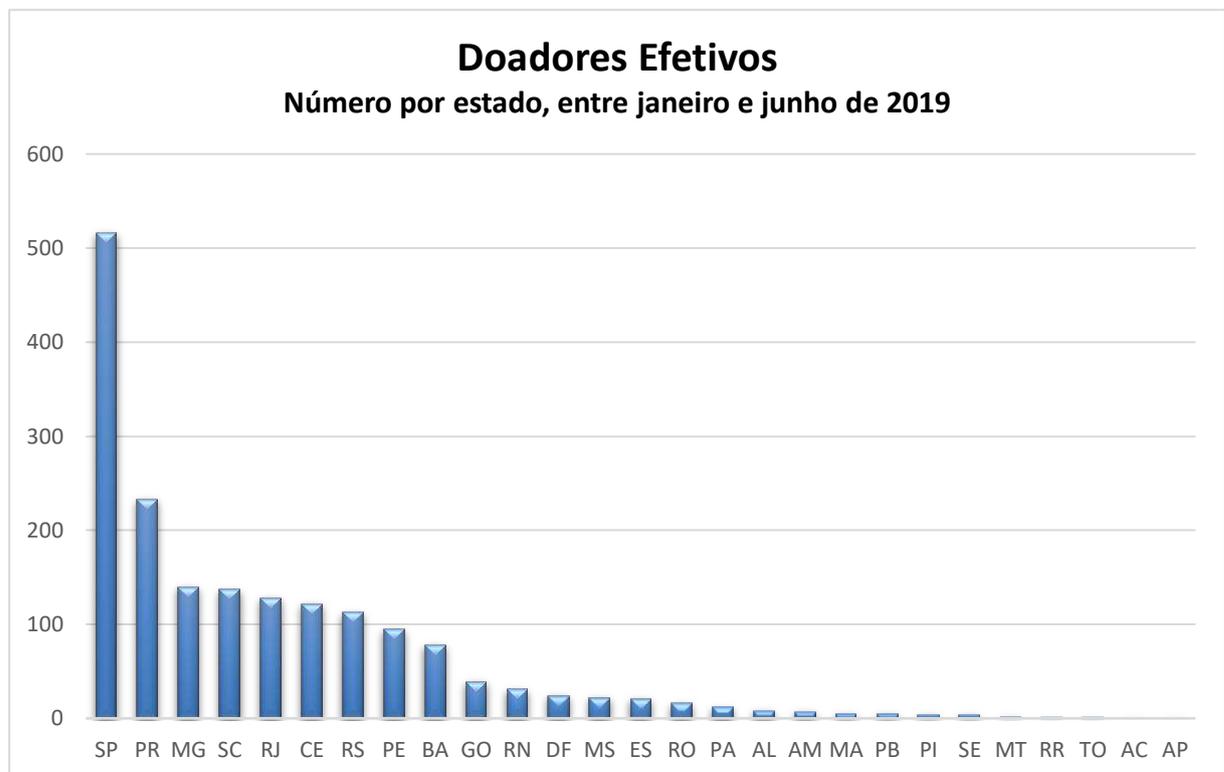


Figura 3. 2 O gráfico expressa quantidade de doadores efetivos no período de janeiro a junho de 2019.
 Fonte: ABTO - 2019

Infere-se que as maiores dificuldades dos transplantes no Sistema Único de Saúde estejam associadas a: (1) crescimento insuficiente nas doações, (2) elevados índices de recusa familiar à doação, (3) disparidades entre estados e regiões, (4) limitações financeiras de alguns programas, (5) baixo índice de notificações de morte encefálica, que é fundamental para que seja possível a realização de alguns transplantes (ABTO, 2019). Devido a toda essa grande demanda de doação de órgãos, é de grande relevância que se busque uma alternativa ao uso do transplante, portanto, o desenvolvimento técnico/científico de substituição de tecidos se mostra pertinente.

2.2 O Tecido Ósseo

Todos os animais vertebrados possuem tecido ósseo em seu corpo, e esse órgão é muito importante, tanto para manter a forma do corpo como para dar sustentação aos músculos, proteger os órgão e vísceras e funcionar como depósito de cálcio e fosfato (OZAWA; HOSHI; AMIZUKA, 2008). A matriz óssea pode ser considerada um compósito, possuindo uma fase mineral depositada em cima de uma moldura orgânica (QUERIDO et al., 2011).

Uma das formas pelas quais o osso pode ser classificado é por sua aparência macroscópica, e as classificações abrangem: (1) Tecido ósseo compacto e (2) tecido ósseo esponjoso ou trabeculado (KIERSZENBAUM, 2016). O primeiro se apresenta com uma composição sólida e massiva, já o segundo caso é formado por trabéculas ósseas e uma trama ramificada de espículas, delimitando espaços que são ocupados pela medula óssea. Em volta da maioria dos ossos existe uma camada de tecido conjuntivo com potencial osteogênico denominada periósteo, e dentro da cavidade medular da diáfise e dos espaços internos do tecido ósseo esponjoso existe o endósteo, com as mesmas características (KIERSZENBAUM, 2016).

O osso possui origem mesodérmica e as principais células presentes nesse órgão podem ser divididas em: (1) osteoblastos (originados de células-tronco pluripotentes mesenquimais), que são as células responsáveis por sintetizar a matriz óssea orgânica e inorgânica, (2) os osteócitos, que são osteoblastos maduros que se enclausuraram na matriz óssea, são responsáveis por manter a integridade óssea, e (3) os osteoclastos (de origem mieloide), que são células responsáveis por absorver a matriz óssea (OZAWA; HOSHI; AMIZUKA, 2008).

Para manter a homeostasia geral do organismo, há um contínuo ciclo de deposição e degradação óssea orquestrada pelas células anteriormente citadas. Os osteoclastos mediam a absorção do osso e, após isso, os osteoblastos começam a depositar e mineralizar a nova matriz óssea. Alguns osteoblastos acabam presos na matriz que eles mesmos depositaram, se tornando, então, osteócitos. Essas células mantêm a integridades da matriz durante um certo período de tempo, regulando também estresses mecânicos no osso, porém, eventualmente recrutam osteoclastos para realizarem a remoção de matriz óssea antiga, retomando o ciclo. Entre todas as células citadas, os osteoblastos são as principais para a mineralização óssea, pois eles produzem matriz óssea orgânica (não mineral) e depois induzem a mineralização para prover ao osso sua principal característica: a rigidez (RAMBHIA; MA, 2019). Quando o osso é fraturado, ele pode demonstrar um metabolismo muito ativo, que se direciona a reparar a lesão tecidual. O tecido ósseo possui uma incrível capacidade de modificação, regeneração e remodelação (DOHERTY; GHALAMBOR; DONAHUE, 2015). A Figura 3.3 apresenta um esquema que demonstra como os osteoblastos e os osteócitos se encontram no osso.

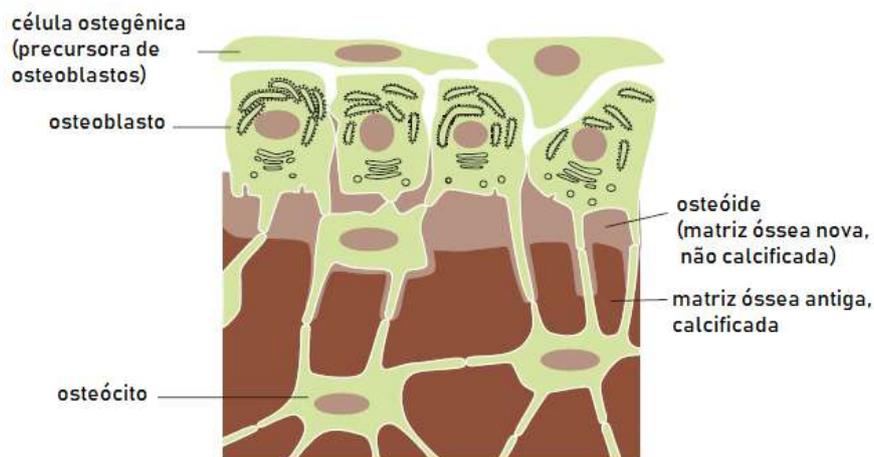


Figura 3.3 Esquema demonstrando duas das principais células envolvidas na remodelação óssea, bem como o osteóide. Adaptado de BUSTIN, STEPHEN. *Molecular Biology of the Cell* (2015).

Após a mineralização da matriz óssea, essas células que foram isoladas pela deposição de matriz se tornam osteócitos e formam uma rede que se expande para fora do osso mineralizado. São células com uma população muito densa, representando de 90-95% da população de células do osso. Os osteócitos possuem extensões similares a dendritos que se estendem através de canaliculos da matriz mineralizada e o objetivo desses processos similares a dendritos é aumentar a comunicação com outros osteócitos e também interagir com osteoblastos que se encontram na superfície óssea. Os osteócitos também são capazes de responder a cargas mecânicas e essa trama de prolongamentos é o que se conjectura ser a responsável pela detecção da tensão associada à microfraturas ósseas (rachaduras microscópicas no osso mineralizado) que se acumulam em um esqueleto que é submetido a fadiga e cargas normais. Estudos foram realizados que endossam a ideia de que os osteócitos são responsáveis diretos por iniciar o processo de remodelação óssea para reparar ossos danificados. (VERBORGT et al., 2002).

O hormônio da paratireoide, o paratormônio (PTH), o peptídeo relacionado ao hormônio da paratireoide (PTH-rP) e a vitamina D são os principais reguladores hormonais da homeostase óssea e são liberados quando há baixas concentrações de íons cálcio no sangue. O PTH estimula a liberação de cálcio e fosfato, atuando como iniciador em uma cascata que resultará em ativação osteoclástica, enquanto ao mesmo tempo atua no rim para aumentar a reabsorção de cálcio e inibir a reabsorção de fosfato. O PTH também aumenta a produção renal de 1,25 (OH) 2vitamina D, que atua no intestino para melhorar a absorção de cálcio (GRABOWSKI, 2015).

A calcitonina, é um hormônio produzido pelas células C da tireóide, e atua no osso para inibir a reabsorção óssea osteoclástica quando há altas concentrações de íons cálcio no soro sanguíneo. Há também evidências de uma ação no rim para diminuir a reabsorção tubular de cálcio, e no cérebro e no hipotálamo, onde várias ações foram relatadas. Os dados desses estudos permitem a proposição de que a calcitonina tem papéis importantes e relacionados em (1) proteger o esqueleto através da regulação da renovação óssea e (2) manter a homeostase do cálcio (DAVEY; FINDLAY, 2013).

A remodelação óssea acontece por diversas semanas e é realizada por osteoclastos e osteoblastos, que absorvem e que formam o osso, respectivamente, e se organizam em estruturas anatômicas temporárias denominadas unidades multicelulares básicas. Os osteoblastos ocupam a porção terminal das UMB's, secretando e depositando matriz óssea não-mineralizada, que direciona a formação e mineralização do osso lamelar maduro. Esse arranjo espacial temporário das células nas UMB's é crítico para a remodelação óssea, assegurando as todas as fases do processo (HAUGE et al., 2001). O ciclo de remodelação é composto por quatro fases sequenciais: ativação precede a reabsorção, que precede a reversão, que precede a formação. Locais de remodelação podem se desenvolver aleatoriamente mas também são direcionados para áreas que necessitam de reparo. A ativação envolve o recrutamento de osteoclastos para a degradação da matriz óssea antiga, a reabsorção consiste na degradação de matriz óssea pelos osteoclastos e essa fase termina quando os mesmos entram em apoptose. Durante a fase reversa, há uma reorganização das células para uma futura deposição de nova matriz óssea, e durante a fase de formação, os osteoblastos sintetizam a matriz óssea (CLARKE, 2008).

A porção inorgânica da matriz óssea é majoritariamente composta por cristais de fosfato de sódio e de hidroxiapatita. A hidroxiapatita de osso possui um formato de fita e dimensões nanométricas. Micro cristais demandam pouco tempo para crescer, constituindo uma vantagem para o desenvolvimento embrionário do osso, crescimento pós-natal e também para a regeneração óssea, quando uma mineralização rápida se faz necessária. Cristais pequenos também favorecem a absorção dos osteoclastos durante a remodelação homeostática do osso. O colágeno do tipo I compõe aproximadamente 80% da porção orgânica do osso. Proteínas não colagênicas incluem osteonectina, osteocalcina, sialoproteínas do osso, osteopontina, entre outras (OZAWA; HOSHI; AMIZUKA, 2008).

Os osteoblastos se diferenciam das células tronco nos primeiros passos para a formação de osso, adquirindo polaridade celular e então secretando substâncias orgânicas para formar a

matriz óssea imatura não-mineralizada para formar o osteóide, que formará um modelo (suporte) para a futura matriz óssea mineralizada. Durante a formação do osteóide, os osteoblastos secretam vesículas de matriz ligadas a membrana, de aproximadamente 50-200 nm em diâmetro, para dentro do osteóide por brotamento (RAMBHIA; MA, 2019).

A mineralização se inicia quando há o aparecimento de hidroxiapatita em conjunto com essas vesículas. Os cristais de hidroxiapatita crescem com as vesículas de matriz, e atravessam as membranas para formar nódulos mineralizados, também conhecidos como nódulos calcificados. Cristais continuam sendo depositados em cima desses nódulos, e uma vez maiores, eles alcançam as moléculas de colágeno ao seu redor, estendendo a mineralização às fibrilas colágenas, estabelecendo uma matriz mineralizada expansiva (RAMBHIA; MA, 2019).

Apesar do osso estar em contínuo processo de remodelação existem alguns casos em que as fraturas não são capazes de se curar completamente mesmo com intervenção clínica. SCHMITZ e HOLLINGER, em 1986, conduziram um estudo em calvárias de ratos, e classificaram que um defeito de 8 mm teria um tamanho crítico para a recuperação do corpo. Demonstraram que sem uma terapia guiada, defeitos com mais de 8 mm não são capazes de regredir sozinhos (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

A grande capacidade de se modelar e de se curar do osso, se deve às células-tronco pós-natais que são encontradas em sua medula (BIANCO, 2015). A aplicação bem-sucedida das células-tronco estromais, no caso de estratégias para regeneração óssea, necessita do desenvolvimento das técnicas de cultura de células que permitam o crescimento das mesmas fora do corpo sem perda das características funcionais, citogenéticas e imunofenotípicas. Ao aliar tudo isso com arcabouços é possível desenvolver estratégias inteligentes para o desenvolvimento ósseo (TARE et al., 2011).

O osso é um órgão muito complexo e possui muitas propriedades dinâmicas e mecânicas. É possível dizer que o módulo elástico de um osso humano varia entre 1 a 20 Gpa (BALA et al., 2016). Para se alcançar uma regeneração óssea com todas as suas propriedades físico-químicas similares a de um osso natural, o material deve possuir resistência estrutural, para substituir o tecido ósseo perdido, e biocompatibilidade, para se unir ao tecido natural da matriz óssea ou dar origem a ele.

Ao escolher uma terapia de regeneração tecidual por meio da utilização de arcabouços é preciso escolher um material que traga o mínimo possível de inflamação local, sendo também

importante mimetizar a configuração natural do osso, que possui trabéculas, provendo um microambiente saudável para um bom aporte sanguíneo e adequada deposição de matriz inorgânica (DECLERCQ et al., 2014). Um bom arcabouço para regeneração óssea deve possuir poros, assim como o tecido, porém deve possuir também rigidez suficiente para resistir às tensões mecânicas, devendo haver um equilíbrio entre ambos.

2.3 Biofabricação

A manufatura aditiva é um processamento que é capaz de produzir estruturas de metal, polímero, cerâmicos ou compósitos camada a camada a partir de um arquivo desenhado e gerado no computador. Esse termo, manufatura aditiva, também é utilizado como impressão 3D e é um processo visionário em desenvolvimento para a obtenção de arcabouços dentro da engenharia tecidual por suas vantagens (BOSE et al., 2018).

No processo de impressão 3D, primeiramente, a peça que será impressa é desenhada no computador com o auxílio de um programa do tipo CAD (*computer aided design*), focado em ferramentas para desenho. Esse programa é capaz de adicionar características próprias à peça permitindo que a mesma seja personalizada para cada impressão. Após, o CAD gera um arquivo do tipo extensão .STL, que será posteriormente processado em um programa de fatiamento desse arquivo. Esse programa (de fatiamento) separa a peça por camadas, transformando-as em estruturas bidimensionais, e então utiliza essas estruturas 2D para criar os caminhos que as ferramentas percorrerão sobre os eixos X e Y. Cada camada é produzida uma em cima da outra para gerar a peça tridimensional, e por isso, esse tipo de técnica é denominada de manufatura aditiva (BOSE et al., 2018).

A bioimpressão tem como fundamentos os mesmos princípios da impressão 3D, com os mesmos conceitos de deposição de material camada a camada sobre os eixos X, Y, Z. Sua diferença, entretanto, consiste no fato de que há adição de células ao material que é depositado pela impressora, sendo o mesmo denominado como biotinta (GROLL et al., 2019). O termo biotinta, porém é muito amplo, e inicialmente foi concebido como o fornecimento de um biopaper que posteriormente teria células impressas nesse material como biotinta por bioimpressão.

O termo “biotinta” originalmente corresponde a um componente celular que era posicionado em 3D sobre, ou com, hidrogéis. Em estudos pioneiros, essa denominação foi utilizada também para células ou agregados celulares gerando certa confusão, pois houve um

aumento muito grande de técnicas de bioimpressão. Entre as principais técnicas ressalta-se: (1) extrusão, (2) deposição, (3) jatos de tinta, (4) transferência a laser e (5) litografia. Cada técnica dessa possui seus requisitos reológicos próprios para gerar tintas funcionais (GROLL et al., 2019).

Recentemente, alguns pesquisadores propuseram uma nova definição de biotintas em quatro categorias: (I) *support bioinks*, que são materiais designados a suportar as populações celulares durante a deposição da tinta e agir como uma matriz extracelular à medida que as células se multiplicam, (II) *fugitive bioinks* que são materiais de sacrifício ou temporários, que podem ser facilmente removidos, formando poros e canais na estrutura impressa, (III) *structural bioinks* que são usadas pra prover suporte mecânico às estruturas impressas, porém também podem ser fugitivas com o passar do tempo e (IV) *functional bioinks* que provêm características bioquímicas, mecânicas e elétricas que influenciam o comportamento celular após a impressão da estrutura (WILLIAMS et al., 2018).

A terminologia “biotinta”, no entanto, somente deve ser empregada quando existem células sendo impressas conjuntamente com o hidrogel. Segundo GROLL *et al*, 2019, o campo de pesquisa da biofabricação é mais voltado para criação de procedimentos automatizados para a criação de um arranjo 3D de células, muitas vezes com o auxílio de biomateriais, porém as aplicações de tais produtos não são importantes para a definição de biotinta.

O radical “bio” na palavra biotinta refere-se às células como componentes necessários na formulação, sendo um componente limitador nos processos e sensível às condições de processamento. Os autores, buscando fins didáticos, afirmam que formulações aquosas de polímeros ou hidrogéis precursores, que contenham fatores biológicos podem ser consideradas tintas de biomateriais, que por definição se tornariam biotintas com a posterior adição de células à sua formulação, conforme mostra a Figura 3.4.

Os autores enfatizam que a definição do termo “biotinta” é “uma formulação de células capazes de serem processadas por uma tecnologia de biofabricação e que também pode conter componentes biologicamente ativos e/ou biomateriais”. Para mimetizar a matriz extracelular onde as células residem, uma gama de polímeros biocompatíveis vem sendo usados para a fabricação de arcabouços (GROLL et al., 2019).

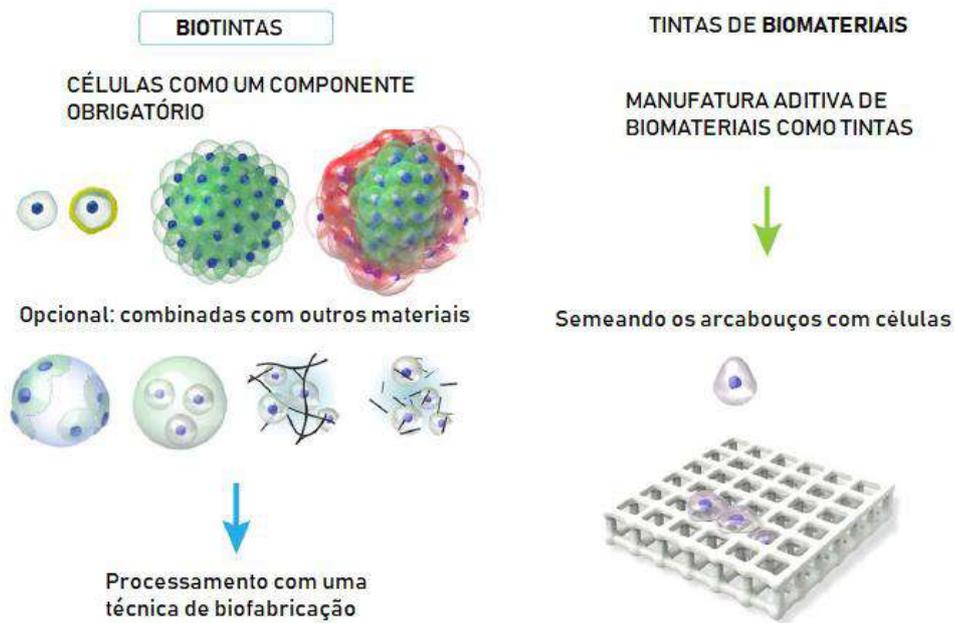


Figura 3. 4 Adaptação de Groll et al. 2019, mostrando a diferença entre biotintas (à esquerda) e tintas de biomateriais (à direita).

O material para trabalhar com bioimpressão deve permitir a viabilidade celular e também ser passível de ser impresso, em termos de manutenção da sua integridade física e mecânica após a impressão. Pode ser fisicamente líquido ou semi-sólido, no entanto é necessário que haja posteriormente, logo em seguida, a criação de ligações cruzadas dentro dele, para que ele possa ser tornar mecanicamente mais estável (GUNGOR-OZKERIM et al., 2018).

Dentre eles os hidrogéis têm, recentemente, chamado atenção por possuírem água em sua composição, gerando um ambiente amigável para as células e também por terem uma estrutura adequada para interações celulares e sinalizações bioquímicas. Sua natureza flexível os torna mais suaves, minimizando danos ao tecido circundante, além de serem altamente permeáveis, o que possibilita a troca de nutrientes e metabólitos, facilitando o crescimento celular. Os hidrogéis biocompatíveis são considerados ótimos materiais para a produção de arcabouços, pois eles demonstram similaridades físicas e estruturais com muitos tecidos naturais e têm grande potencial para satisfazer os requisitos básicos para a bioimpressão 3D (MALDA et al., 2013). Sua principal desvantagem consiste em sua baixa resistência mecânica, porém isso pode ser contornado com a formação de reticulações ou de redes interpenetradas (JEJURIKAR et al., 2012).

As características fundamentais de um arcabouço, manufaturado por esse tipo de técnica, para alcançar a funcionalidade em engenharia de tecidos são : (a) biocompatibilidade e biodegradabilidade, (b) ter capacidade de adaptação das propriedades mecânicas para cada

tecido, e (c) um controle preciso da arquitetura interna de multiescala para representar a complexidade da matriz extracelular nativa, onde macroporos acomodam a adesão celular e crescimento e microporos acomodam fatores de crescimento, liberação e transporte de nutrientes para as células ao redor (YING et al., 2018).

O arcabouço deve permitir o crescimento celular, o desenvolvimento dos tecidos e ser capaz de mimetizar as funções biológicas e estruturais da matriz extracelular nativa tanto em composição química quanto estrutura física. Arcabouços utilizados para aplicação em engenharia de tecidos devem: (1) ser biocompatíveis, (2) capazes de prover um suporte mecânico adequado, (3) ter boas propriedades de superfície tais como promover adesão celular, induzir a proliferação e diferenciação das células e (4) promover um ambiente nas quais as células sejam capazes de manter seus fenótipos (ZHANG et al., 2017a).

Portanto, para alcançar tais requisitos, esses hidrogéis devem ser processados para formar reticulações em 3D que simulem microambientes que são encontrados *in vivo*. Isso é necessário para dar um suporte espacial adequado para as atividades celulares, ao invés de formas não estruturadas e planas. E é extremamente desejável também, que os hidrogéis de bioimpressão possuam poros interconectados que permitam a oxigenação, o aporte de nutrientes, a difusão de toxinas, bem como a mobilidade celular, facilitando a geração de tecidos funcionais (YING et al., 2018).

Dentro da bioimpressão 3D existe um paradigma denominado “Paradigma da janela de fabricação”, que está atrelado ao compromisso entre a adequação à fabricação (a printabilidade em si) ao mesmo tempo que a biotinta mantém sua capacidade de encapsular e manter a viabilidade celular. O grande desafio para encontrar a biotinta ideal vai de encontro a esses paradigmas, pois tradicionalmente, os hidrogéis não são capazes de manter a fidelidade de forma, e não possuem resistência mecânica adequada, produzindo também perfis de bioatividade e biodegradabilidade deficientes. Com a introdução de bioligações e aumento de suas concentrações, é possível adicionar mais reticulações e, conseqüentemente, rigidez à peça produzida (KYLE et al., 2017).

No entanto uma alta densidade de reticulações também não é desejável pois, essas redes que se formam podem impedir a migração celular, a deposição de matrizes e a difusão de nutrientes. Todavia, redes menos densas podem levar à fragilidade e fidelidade de forma deficientes. Portanto, tradicionalmente, biotintas possuem uma densidade de reticulação média, mas com um ambiente de cultura celular deficiente. O projeto de biotintas mais avançadas

englobam melhora da capacidade de impressão aliado a biocompatibilidade, através do controle de várias propriedades físicas, químicas e biológicas. Como exemplo pode-se citar a melhora da reologia, biofuncionalização, biodegradação, cinética de gelificação e função celular (citocompatibilidade, adesão celular, migração, proliferação e diferenciação). Na Figura 3.5 há um esquema mostrando como a biocompatibilidade aumenta de acordo com a diminuição das reticulações, e como a fidelidade de forma aumenta com o aumento das ligações cruzadas, mas que, no entanto, há decréscimo da biocompatibilidade (KYLE et al., 2017).

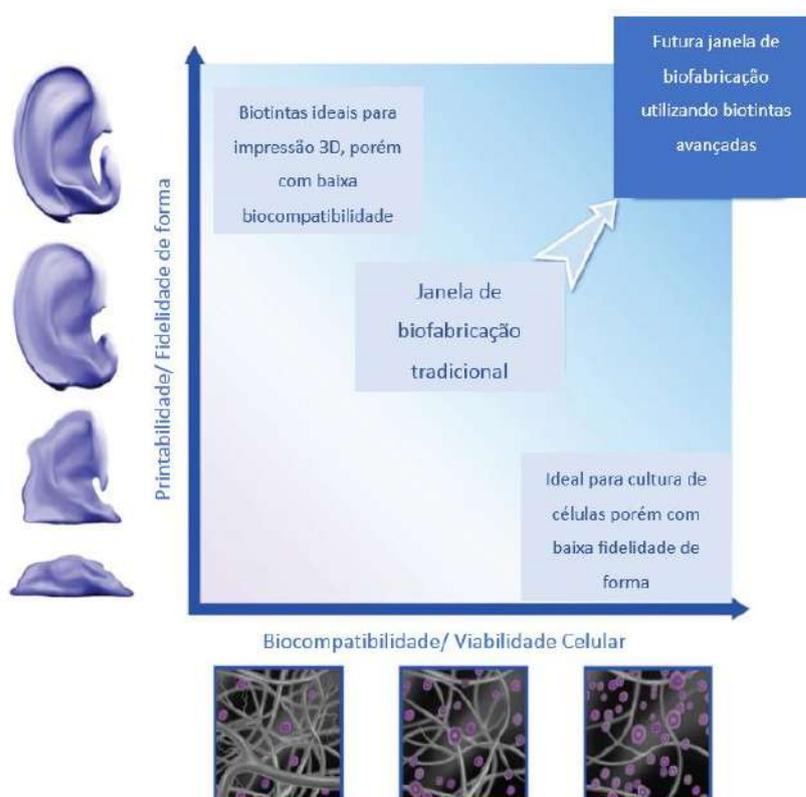


Figura 3. 5 Esquema demonstrando a variação da printabilidade em função da biocompatibilidade. Adaptado de KYLE et al., 2017

O tipo de biotinta empregada variará em decorrência da técnica escolhida para realizar a bioimpressão (JI; GUVENDIREN, 2017). Uma das técnicas de bioimpressão mais difundidas no mundo é a bioimpressão por extrusão. Dentro desse processo a biotinta é inserida dentro de uma seringa plástica descartável e então é colocado de forma pneumática ou mecânica sobre o substrato. Na Figura 3.6 é possível observar os tipos de bioimpressora existentes. A bioimpressora por extrusão, com pistão, foi utilizada para conduzir o presente estudo e está em maior detalhamento na Figura 3.7 (DERAKHSHANFAR et al., 2018).

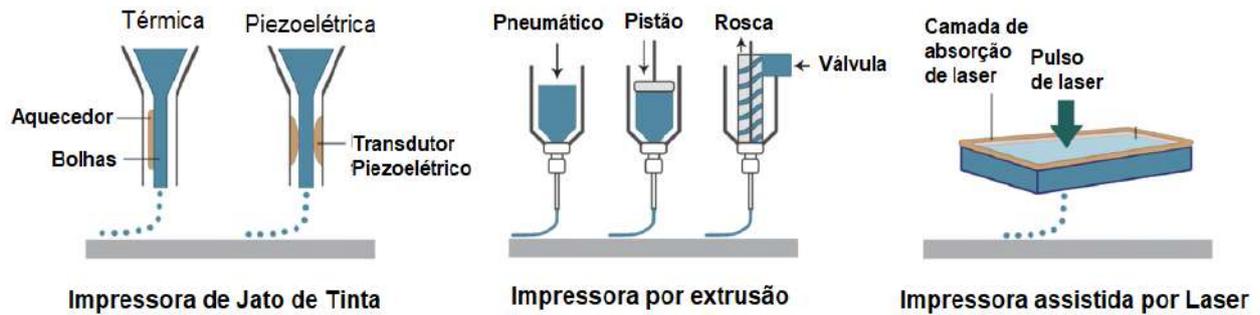


Figura 3. 6 Desenho esquemático dos tipos de bioimpressoras existentes no mercado (Imagem adaptada de Gungor-Ozkerim, 2018).



Figura 3. 7 Desenho esquemático da parte ativa do tipo de bioimpressora que foi utilizada no presente estudo (Imagem adaptada de Gungor-Ozkerim, 2018).

O sistema conta com um pistão que deposita aproximadamente 150–300 μm de diâmetro de material, e além disso proporciona um controle mais direto do fluxo da biotinta. O material, no entanto, não deve se solidificar demais, pois isso pode acarretar em problemas para a impressão. É possível dizer que há uma capacidade de controle espacial quando se utiliza tal técnica, no entanto, a pressão que é gerada pode ser agressiva para as células, uma vez que existe a probabilidade de que durante o processamento haja a ruptura da membrana celular, ocasionando na destruição da mesma. Por exemplo, ao imprimir um material muito sólido é preciso que se aumente a pressão no pistão, e isso pode levar à morte celular em decorrência dessa pressão exacerbada (GUNGOR-OZKERIM et al., 2018).

Dentre as inúmeras vantagens dessa técnica podemos ressaltar a habilidade de imprimir com tintas que possuem alta viscosidade, com populações densas de células, até mesmo

esferóides dentro de arcabouços em 3D, além de obter uma distribuição anisotrópica. As desvantagens dessa abordagem constituem em baixa resolução, potencial entupimento da seringa, e indução de estresse celular. A indução de ligações cruzadas para melhora das propriedades físicas seria por meio de calor, indução química ou por meio de luz (fotoativada)(MORONI et al., 2018).

2.4 Hidrogéis

Hidrogéis são polímeros reticulados, que formam redes tridimensionais, e possuem a capacidade de reter água sem alteração de sua estabilidade dimensional. Desde a década de 1960, após um estudo pioneiro envolvendo hidrogéis de poli(2-hidroxietil metacrilato) - HEMA, por suas propriedades hidrofílicas e também por serem altamente biocompatíveis eles têm chamado atenção da comunidade científica (HOFFMAN, 2002).

Esse tipo de material é comumente empregado nas mais diversas áreas de pesquisas, sendo bem versátil. Entre essas áreas pode-se citar a química, ciência dos materiais, higiene pessoal e agricultura. São geralmente utilizados como reserva de água, além de auxiliar na liberação controlada de produtos de interesse (DEMITRI et al., 2013)(SANNINO; DEMITRI; MADAGHIELE, 2009).

Os hidrogéis são redes poliméricas capazes de absorver de 10 a 20% de líquido até milhares de vezes seu peso seco. Podem ser quimicamente estáveis ou podem degradar e eventualmente se desintegrar. Os hidrogéis podem ser classificados de diversas formas e uma delas é a sua reticulação:

a) Hidrogéis quimicamente reticulados

Hidrogéis denominados permanentes ou géis químicos são géis que possuem reticulações com ligações covalentes em suas composições. (HOFFMAN, 2002). Por conta dessas ligações, os hidrogéis químicos possuem resistência mecânica superior aos hidrogéis físicos. Esse tipo de hidrogel pode ser obtido por:

Radiação

Hidrogéis podem ser reticulados por radiação, e é uma técnica amplamente utilizada na literatura. Por não utilizar nenhum agente reticulante químico, o risco de toxicidade é menor, mantendo a biocompatibilidade do polímero (RAHMAN; MUBARAK; TAREQ, 2010).

Agentes reticulantes

Um agente reticulante é uma molécula com grupos funcionais reativos, com massa muito menor que as cadeias poliméricas, que irão formar pontes entre elas (BERGER et al., 2004). Um reticulante bastante abordado na literatura é o glutaraldeído, porém para utilização em biotintas está fora de questão por se tratar de um composto citotóxico dependendo de sua concentração (GOUGH; SCOTCHFORD; DOWNES, 2002).

A genipina também tem chamado atenção da comunidade científica por ser um eficiente agente de ligação cruzada em polímeros que possuem grupo amina na composição, como por exemplo a quitosana e a gelatina, sendo menos tóxico que o glutaraldeído. Esse agente é obtido a partir da geniposide, um glicosídeo obtido dos frutos de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides Ellis* (CUI et al., 2014).

Enzimas

Há um grande interesse em reticulação enzimática por conta das condições amenas nas quais ela se desenvolve: geralmente esse tipo de reação necessita de pH neutro, meio aquoso e temperatura moderada. Por serem, de uma forma geral, enzimas específicas para o tipo de reação buscada, reações secundárias são minimizadas, trazendo mais uma vantagem no uso desse tipo de reticulador (MOREIRA TEIXEIRA et al., 2012).

b) Hidrogéis fisicamente reticulados

São chamados de reversíveis ou geis físicos quando as suas redes são mantidas por meio de emaranhados moleculares e/ou forças secundárias, como forças iônicas, ligações de hidrogênio ou forças hidrofóbicas. Por serem compostos por ligações de interação fraca, são hidrogéis reversíveis, já que alterações como mudança de pH, ou temperatura são capazes de desestruturar suas zonas de junção (HOFFMAN, 2002).

Dentre os processamentos de hidrogéis físicos destaca-se:

Ciclos de congelamento e descongelamento

Ao congelar e descongelar um polímero, pode ser obtida sua reticulação física através da formação de microcristais em sua estrutura. A estrutura do hidrogel pode ser alterada pelos ciclos de congelamento, temperatura e também por sua composição. Na Figura 3.7 observa-se

as zonas cristalinas e amorfas de um hidrogel obtido por esse processo (FIGUEROA-PIZANO et al., 2018).

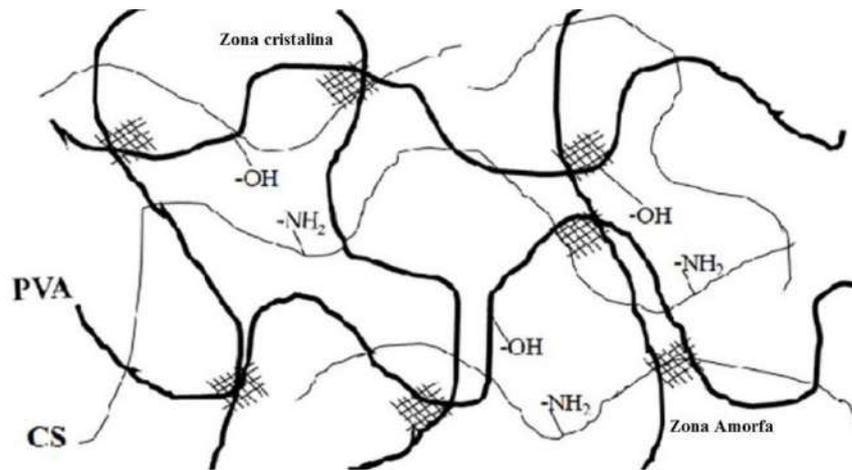


Figura 3. 8 Observa-se um hidrogel de PVA-Quitossana obtido por esse processamento. Observa-se as zonas cristalinas, onde estão os microcristais e as zonas amorfas. Adaptado de ADDIN, 2005

Interação Iônica e Complexos Coacervados

Quando um polieletrólito é combinado com um íon multipartidário de carga oposta, ele pode formar um hidrogel físico conhecido como hidrogel 'ionotrópico'. Além disso, quando polieletrólitos de cargas opostas são misturados, eles podem geificar ou precipitar a dependendo de suas concentrações, da força iônica e do pH da solução. Os produtos dessa reticulação iônica são conhecidos como complexos polieletrólitos ou coacervados (Figura 3.9 e 3.10) (HOFFMAN, 2002).

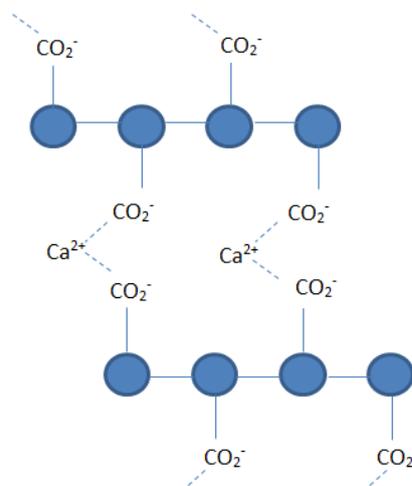


Figura 3. 9 Grupos aniônicos (COO⁻) interagindo com o íon Ca²⁺reticulando. Imagem obtida do site theorganicsolution

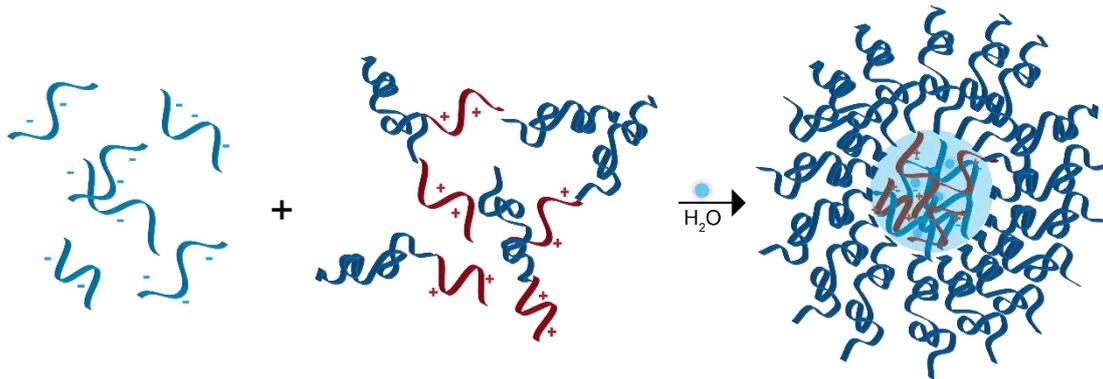


Figura 3. 10 Um poliânion de encontro a um policátion, gerando um complexo coacervado. Imagem obtida do site webofscience utilizando como palavra-chave “coacervado”.

Ligações de hidrogênio

Polímeros que possuem grupos carboxílicos em sua composição, ao terem seus pH's reduzidos, podem dar origem a esse tipo de hidrogel. A Figura 3.11 exemplifica esse tipo de interação para a formação desse tipo de gel físico.

O intumescimento também é uma característica importante quando se trata de hidrogéis e é um importante parâmetro para sua aplicação biomédica, uma vez que a presença de água sobre a superfície do material diminui a energia livre interfacial dentro do ambiente fisiológico, levando a um aumento nas propriedades biológicas (BARBUCCI; LEONE; BARBUCCI, 2009).

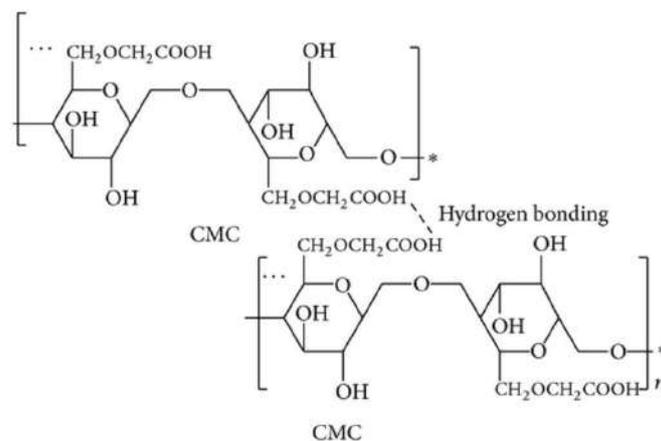


Figura 3. 11 Formação do hidrogel entre Carboximetilcelulose e alginato de sódio. Imagem obtida de ADDIN, 2005.

A quantidade de água que cada hidrogel é capaz de absorver depende de muitos fatores e entre eles cita-se a sua reticulação, a natureza da solução, e a estrutura do hidrogel em si (se é poroso ou não). O fator preponderante para o intumescimento, é a densidade de reticulação, que é determinada pela quantidade de ligações cruzadas em um determinado volume. Isso determina a distância entre duas ligações cruzadas dentro da mesma cadeia, e quanto menor a distância entre elas, maior a densidade de reticulação (BAE; WANG; KURISAWA, 2013).

2.5 Gelatina e Quitosana

É desejável que a biotinta ideal promova um ambiente bom para que as células possam migrar e se apalhar facilmente, por isso os hidrogéis são tão interessantes dentro desse contexto. De acordo com GUNGOR-OZKERIM et al., 2018, um hidrogel bastante vantajoso é a gelatina, que é produzida via a desnaturação do colágeno e pode ser proveniente de ossos, tendões ou peles de animais via hidrólise ácida ou básica. A gelatina possui uma distribuição não uniforme de 18 aminoácidos, aproximadamente. A glicina se faz presente na maior parte da estrutura, que se apresenta em forma de hélice (IRWANDI et al., 2009). A Figura 3.12 ilustra a estrutura química da gelatina.

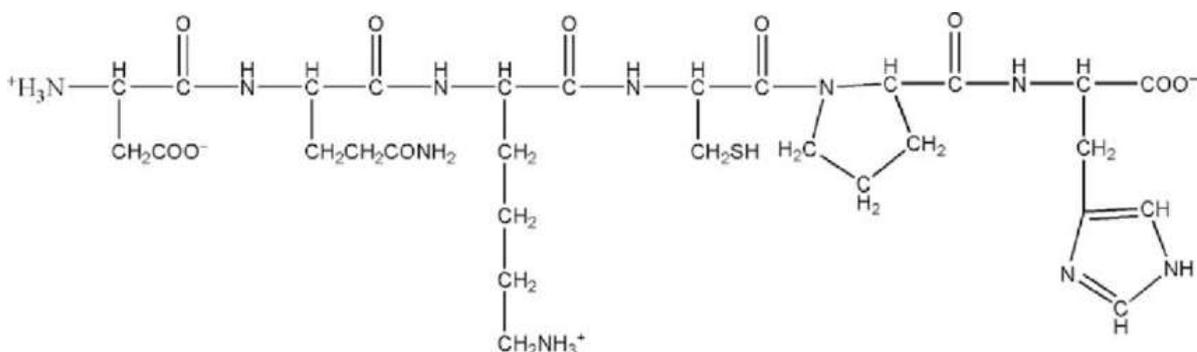


Figura 3. 12 Estrutura química da gelatina. Imagem de DEVI et al., 2016.

Esse material possui tantas propriedades versáteis que é aplicado na indústria alimentícia, na agricultura, na confecção de papéis, fotografia, indústria cosmética entre outras utilizações. Sua reologia, tensão superficial e propriedades de emulsão podem ser modificadas para atender o uso para qual será destinado (BULCKE et al., 2000).

A gelatina forma uma solução que é capaz de adquirir diferentes texturas frente às variadas temperaturas, e também dependendo da sua concentração podem ficar mais ou menos espessas. É um dos polímeros mais amplamente utilizados dentro das aplicações biomédicas por serem bastante biocompatíveis, biodegradáveis, por possuírem baixa antigenicidade, por terem grupos ativos acessíveis, por ao se degradarem não formarem subprodutos prejudiciais, pelo seu fácil processamento e baixo custo. Por todas essas vantagens e, em especial, sua afinidade celular, a gelatina é um material versátil e de eleição para aplicação nos mais diversos tecidos (KLOTZ et al., 2016).

A gelatina, por ser termosensível, é capaz de ser modelada e reticulada durante a bioimpressão por diferença de temperatura, o que auxilia a manter a forma da estrutura que foi impressa. Entretanto a gelificação induzida puramente pela temperatura é lenta e instável. Por conta disso, existem várias modificações da gelatina, introduzindo outros polímeros com grupos fotopolimerizáveis, permitindo que haja a formação das ligações cruzadas posteriormente com a irradiação de luz UV após a bioimpressão (PEPELANOVA, *et al.*, 2018).

Van Den Bulcke e colaboradores foram os primeiros pesquisadores a descrever a gelatina de metacrilóila, o GelMA, e ela se mostrou, desde então, um dos hidrogéis mais versáteis que estão disponíveis para cultura de célula em 3D e para a bioimpressão. O GelMA é um hidrogel semi-sintético que une a biocompatibilidade e versatilidade da gelatina com o controle das propriedades mecânicas, a partir da reticulação dos grupos metacril (PEPELANOVA, *et al.*, 2018). Estudos recentes têm mostrado que os hidrogéis de GelMA são biotintas promissoras para construir diversas arquiteturas em 3D utilizando técnicas de manufatura aditivas de fotopolimerização por luz UV (YING, 2018). No entanto, o seu custo elevado ainda constitui uma desvantagem.

A quitosana é um polímero natural, biodegradável e biocompatível obtido a partir da desacetilação parcial da quitina (GUNGOR-OZKERIM et al., 2018). É um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza e um polímero muito versátil, que pode ser utilizado na agricultura, tratamento de água, indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica, de cosméticos e de biomateriais. Nessa última aplicação, a quitosana pode se apresentar como gel, filme, membrana polimérica ou nanofibra (RUFATO et al., 2018). Observa-se na Figura 3.13 a estrutura química da quitosana.

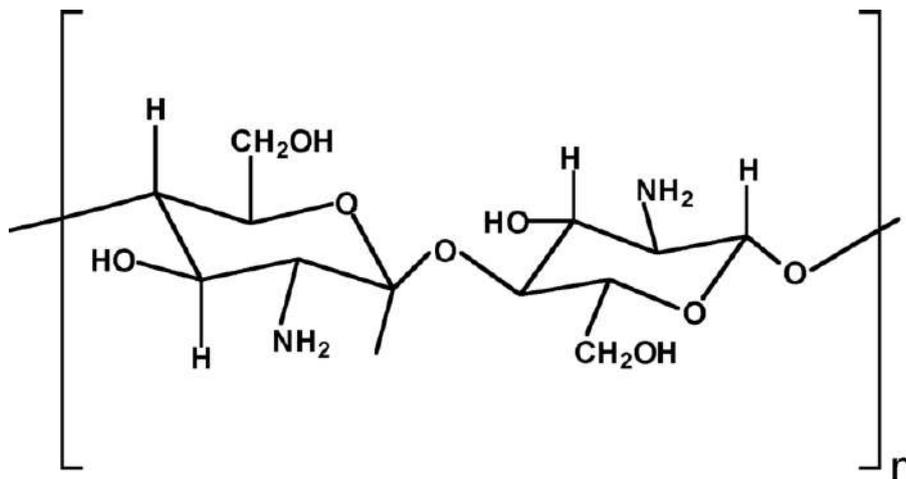


Figura 3. 13 Estrutura química da quitosana, onde n é o número de unidades monoméricas.

Por suas propriedades antimicrobianas e curadoras, a quitosana é amplamente utilizada na regeneração tecidual, principalmente de pele, por ser capaz de absorver os fluidos da ferida e controlar a hidratação da região afetada (RUFATO et al., 2018). Bioquimicamente, a quitosana possui muitas vantagens, além de ser um material com grandes propriedades hemostáticas, também é capaz de ativar fibroblastos, induzir a produção de citocinas, estimular a migração de células gigantes, assim como a síntese de colágeno do tipo IV (FAN et al., 2016) (BEHRENS et al., 2014). A quitosana funciona como fonte de liberação lenta de monômeros N-acetilglicosamina, pois quando entra em contato com a lisozima sérica é despolimerizada, e produz essa molécula, auxiliando o processo de cicatrização e favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa (COSTA SILVA; DOS SANTOS; FERREIRA, 2006).

As propriedades dos dois materiais foram unidas para regeneração de pele. Um estudo fez um polieletrólito de quitosana e gelatina para bioimpressão por microextrusão, com a finalidade de regenerar o tecido tegumentar e avaliar os parâmetros de bioimpressão. Para tal, fixaram a porcentagem de quitosana em 2,5% e variaram a de gelatina em 2,5%; 5% e 7,5%. Os resultados desse material foram satisfatórios na questão de printabilidade e interação química, bem como nos testes de viabilidade celular e adesão. Comprovou-se que, ao aumentar a quantidade de gelatina no material, a biocompatibilidade e viscosidade do mesmo também aumentava. No entanto, uma viscosidade excessiva não é desejável nesse tipo de bioimpressão. Ao aumentar a viscosidade é necessário aumentar a pressão exercida pelo pistão, causando estresse celular e aumentando a taxa de mortalidade, portanto a concentração de 5% de gelatina foi tida como ideal pelos pesquisadores, pois unia a biocompatibilidade, com reologia e viscosidade ideais para o tipo de bioimpressão empregado (NG; YEONG; NAING, 2016).

2.6 Associação de materiais

A bioimpressão vem sendo utilizada para recuperar, melhorar e regenerar tecidos danificados ou perdidos, no entanto, as propriedades mecânicas dos hidrogéis têm deixado a desejar. Por serem estruturas compostas por muita água em sua composição, possuem resistência insuficiente, comprometendo a estrutura dos arcabouços e, conseqüentemente, os resultados de regeneração tecidual (KANG et al., 2016).

Buscando solucionar essa limitação, diversos estudos se dedicaram a desenvolver hidrogéis carregados de células com polímeros termoplásticos, malhas de nano ou microfibras e materiais inorgânicos. Quando esses compostos são adicionados ao hidrogel as propriedades mecânicas melhoradas. Contudo, apesar dos hidrogéis híbridos serem mecanicamente resistentes, existem desvantagens que precisam ser levados em conta, como: controle limitado sobre a arquitetura 3D, produtos de degradação tóxicos e propriedades mecânicas insuficientes em comparação com o tecido ósseo nativo (FEDOROVICH et al., 2011)(FEDOROVICH et al., 2012).

Em 2017 foi desenvolvido um sistema de hidrogel reforçado com uma microestrutura impressa em impressora 3D de ácido polilático – PLA, um termoplástico biodegradável, que teve resultados muito interessantes em termos de rigidez estrutural, demonstrando rigidez superior até mesmo à do osso (HEO et al., 2017). Uma estrutura ortogonal de PLA com filamentos impressos de 200 µm de espessura e 250 µm de altura de camada foi produzida em impressora 3D do tipo FDM (processo de extrusão de material) e, em seguida, impregnada em hidrogel de GelMA. Em conjunto, esse material foi capaz de prover a estruturação ao arcabouço e também estimular a adesão celular, seu espraiamento, proliferação e diferenciação osteogênica. Isso demonstra que sistemas híbridos podem ser eficientes no desenvolvimento de dispositivos para regeneração óssea.

Estudos sobre a regeneração hepática também enfrentaram problemas a respeito da manutenção da integridade estrutural dos arcabouços, já que os hidrogéis não forneciam tais propriedades mecânicas requeridas. Para sanar essa situação foi feita uma moldura com termoplástico (Policaprolactona) associada ao hidrogel para melhorar a estabilidade do microambiente 3D, com isso foi possível desenvolver 3 tipos celulares diferentes, e obter um pré tecido (LEE et al., 2016).

A policaprolactona é poliéster alifático amplamente utilizado na engenharia tecidual, e é possível observar sua estrutura química na Figura 3.14. Por seu ponto de fusão ser relativamente baixo quando comparado com os demais termoplásticos biodegradáveis, em torno de 60 °C, é um dos polímeros mais utilizados em conjunto com a bioimpressão, havendo relatos na literatura de que ele vem sendo empregado para regeneração de fígado, nervos e bexiga (KIM et al., 2016) (LEE et al., 2016)(ZHANG et al., 2017b)(VIJAYAVENKATARAMAN et al., 2019).

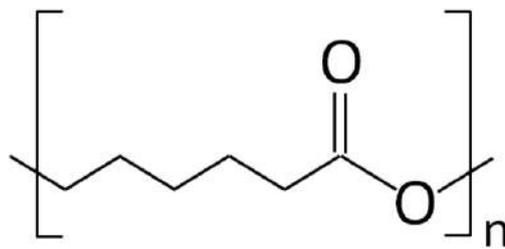


Figura 3. 14 Estrutura da unidade monomérica da policaprolactona, sendo n o número de unidades monoméricas.

Ao se tratar de bioimpressão, portanto, esse termoplástico é o polímero que mais adequado para realizar molduras que reforcem arcabouços produzidos pela técnica de bioimpressão, aumentando a resistência mecânica das peças obtidas.

2.7 Caracterização dos materiais

Quando há decréscimo de propriedades mecânicas ou massa no material que compõe um arcabouço, existe a degradação do mesmo. A estabilidade desses materiais é influenciada por diversos fatores, e condições presentes dentro do corpo, mas também é guiada por sua composição química, possíveis aditivos, impurezas e/ou processos de esterilização. Quanto à regeneração óssea, os polímeros que compõe os arcabouços, devem ser intencionalmente degradáveis, como é o caso do PCL, para que, futuramente, dêem lugar à matriz óssea mineralizada. É de grande importância, portanto, um teste que seja capaz de prever o comportamento do material (ISO-10993-9).

A degradação de polímeros sintéticos em um ambiente biológico é um processo complexo, que, de forma geral, ocorre por erosão de sua superfície ou um processo envolvendo a massa interna do material. Os dois processos são caracterizados por: (1) adsorção de líquidos na superfície do polímero, (2) difusão de líquidos dentro dos materiais, resultando em um enfraquecimento de ligações secundárias, (3) reação química entre o líquido e as ligações

covalentes, levando à quebra de cadeias, que se manifesta em fragmentação do material e (4) difusão dos produtos de degradação pela superfície do material. Caso esse polímero seja um natural, onde haja uma reação catalisada por enzima e essa possua um papel fundamental na degradação, assume-se que a degradação é feita em dois passos: primeiro um complexo enzima-substrato é formado, acompanhado pela decomposição desse complexo em produtos de reação com a regeneração da enzima (ISO-10993-9).

A lisozima é uma enzima que é encontrada em diversos fluidos do corpo humano, incluindo no soro humano, em uma concentração de 4-13 mg/L, se mantendo ativa em pH entre 6,0 e 9,0, e é capaz de degradar quitosana, clivando as ligações de glicosídeos da quitosana (LONČAREVIĆ; IVANKOVIĆ; ROGINA, 2017).

Os hidrogéis são redes tridimensionais, porosas, hidrofílicas e têm como sua principal característica a capacidade de absorver água ou fluidos biológicos (HOFFMAN, 2002). A partir dessa característica inerente, há um aspecto importante, que é a capacidade de retenção de líquidos da matriz de hidrogel (RUFATO et al., 2018). O grau de absorção pode estar associado à diversos parâmetros como salinidade, pH, temperatura, força iônica do hidrogel (AOUADA et al., 2005).

O valor máximo de grau de inchamento pode estar relacionado à entrada do meio no hidrogel, que ocasiona o estiramento das cadeias poliméricas até que elas atinjam um estado relaxado. O grau de inchamento no equilíbrio ocorre quando as forças de hidratação (estiramento da rede tridimensional do hidrogel pela absorção de líquido) e as forças elásticas da reticulação atingem seu limite. (OLIVEIRA et al., 2014).

Dentro de sua estrutura 3D, que é formada por interações intra e intermoleculares entre grupos dos polímeros e seguimentos de cadeia, está a definição das suas propriedades físicas, químicas e mecânicas. O interesse nesse tipo de material não se deu unicamente por sua capacidade de absorver fluidos, mas essa é uma característica bastante interessante do ponto de vista de regeneração tecidual. O percentual de água presente no sangue é de aproximadamente 90%, e se hidrogéis possuem uma grande capacidade de absorvê-la, eles, ao entrar em contato com o sangue, podem agir como agente hemostático (FAN et al., 2016).

Uma pesquisa feita em 2014 por BEHRENS et al., 2014, abordou a utilização de um hidrogel de quitosana como agente hemostático, baseando-se no potencial de absorção dos mesmo para captar o soro sanguíneo e facilitar a formação do coágulo. Nesse estudo verificou-

se que a quitosana é um agente hemostático eficaz e que facilitou a formação do coágulo sanguíneo no local, acelerando o processo de regeneração dos tecidos.

Para investigar as propriedades de absorção de fluidos quando a quitosana é ligada à gelatina, foi realizado um teste de absorção em saliva artificial, água e solução simuladora de fluidos corpóreos

III- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materials

Para a confecção dos arcabouços foram utilizados:

1. Policaprolactona (PCL), em pellets. Procedência: Sigma – Aldrich, M_n : 70,000 – 90,000 g/mol; grau de hidrólise: 98%, Código: 1001419114, lote # MKBK2903V;
2. Quitosana de baixo peso molecular, em pó. Procedência: Sigma – Aldrich, lote STBJ0773, código 448869;
3. Gelatina tipo A obtida de pele suína, em pó. Procedência: Sigma – Aldrich, lote SLCB3384 código G2500;
4. NaOH, em pérolas. Procedência: Vetec Química Fina, Ltda lote: 1002643, código: 001137.09;
5. NaCl, em pó. Procedência: Vetec Química Fina, Ltda lote: 0906704, código: 000106.09 ;
6. NaHCO_3 , em pó. Procedência: Vetec Química Fina, Ltda lote: 0503707, código: 306;
7. K_2CO_3 , em pó. Procedência: Vetec Química Fina, Ltda lote: 1107289, código: 000127.08;
8. Ácido acético glacial P.A. Vetec Química Fina, Ltda lote: 1000039, código: 000154.06;
9. HCl P.A. Vetec Química Fina, Ltda lote: 1106432 , código: 000141.06.

4.2 Obtenção dos arcabouços de PCL e hidrogel

A obtenção do arcabouço dividiu-se em duas etapas: a primeira foi dedicada à construção do modelo computacional da peça e a segunda etapa foi a impressão propriamente dita.

4.2.1 Design da estrutura 3D

O modelo computacional dos arcabouços foi feito no programa SolidWorks®. Cada peça da moldura de PCL possuía um diâmetro de 0,3 mm, sendo a altura das camadas também de 0,3 mm. A distância entre cada filamento da peça foi de 0,5 mm, sendo o comprimento e largura totais da peça de 8,3 mm. A altura da peça variou de acordo com o número de camadas que foi empregado, variando de 0,6 mm a 1,8 mm. Nas Figuras 4.1 e 4.2 observa-se o desenho do arcabouço em um corte superior e um corte lateral.

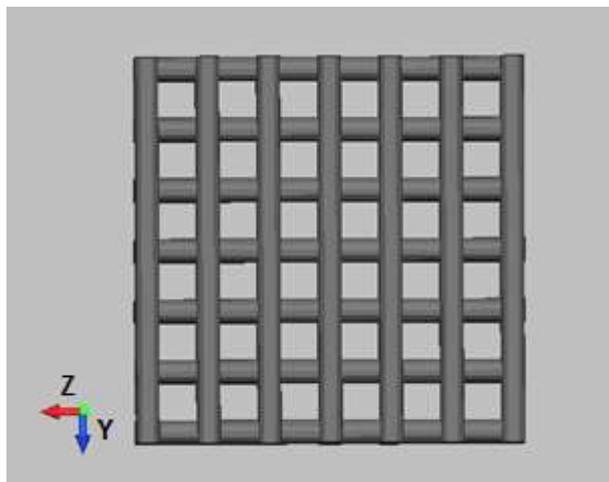


Figura 4. 1 Visão superior do design do arcabouço de PCL

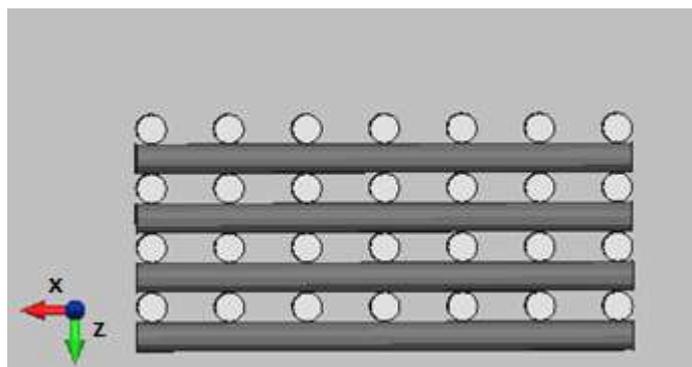


Figura 4. 2 Visão lateral do design do arcabouço de PCL.

A peça em hidrogel, por sua vez, foi projetada para preencher a moldura de PCL, possuindo uma espessura de filamento de 0,5 mm e altura de 0,3 mm. A distância entre cada filamento foi 0,3 mm, possuindo um comprimento e largura de 8,3 mm. Nas Figuras 4.3 e 4.4 observa-se as visões superiores e laterais do design do arcabouço de hidrogel.

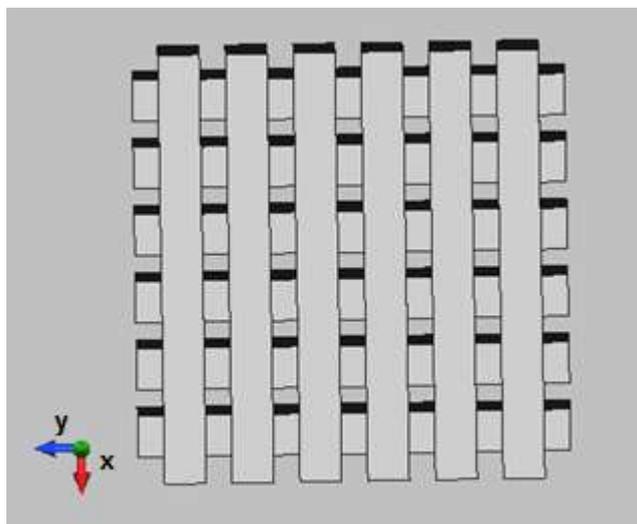


Figura 4. 3 Visão superior do design do arcabouço de hidrogel.

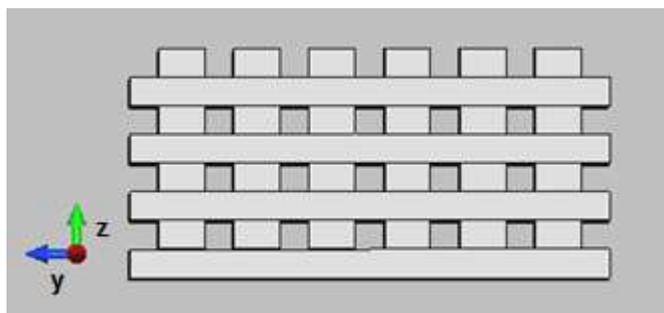


Figura 4. 4 Visão lateral do design do arcabouço de hidrogel.

Para realizar a impressão da peça, dentro do Slic3r® foi necessário adicionar um arcabouço como parte do outro e definir duas ferramentas de impressão. Na Figura 4.6 tem-se os arcabouços adicionados dentro do programa Slic3r®, montando a peça final que foi impressa.

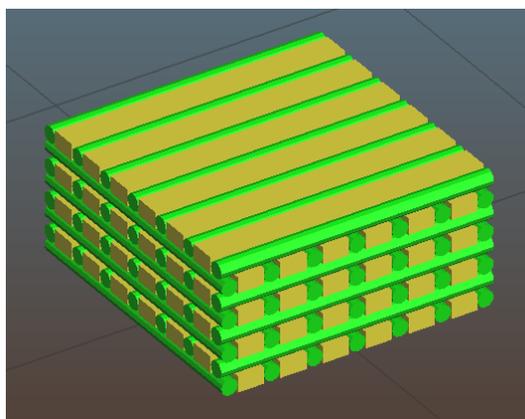


Figura 4. 5 Observa-se ambos arcabouços (de PCL e hidrogel) adicionados como parte no programa Slic3r®.

4.2.2 Obtenção da tinta de biomaterial

Para a obtenção do polieletrólito de quitosana e gelatina, 2,5% m/v de quitosana foi dissolvida em ácido acético e agitado mecanicamente por 3 horas até a obtenção de um gel homogêneo. 5% m/v de gelatina foi dissolvida em tampão de carbonato-bicarbonato, cujo pH foi ajustado para 7,4 pela adição de algumas gotas HCl 1 mol/L e com o auxílio de um pHmetro, e agitado a 40 °C até o pó de gelatina ser completamente dissolvido. O tampão de carbonato-bicarbonato foi composto por cloreto de sódio (NaCl) (0,58%), bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (0,38%) e carbonato de potássio (K₂CO₃) (0,028%).

Após esse procedimento, com o auxílio de um pHmetro, o pH do gel de quitosana foi aumentado para acima de 4,7 para iniciar a formação do polieletrólito. Um volume igual de gelatina foi adicionado ao gel de quitosana, gota a gota, sob constante agitação mecânica, com posterior adição de NaOH (gota a gota) à blenda de gelatina-quitosana até o pH da mistura alcançar ~6,5 para iniciar a reticulação pH-dependente (NG; YEONG; NAING, 2016). Ao final adicionou-se 0,15 mL de ciclopirox olamina de 10 mg/mL para cada mL de solução para evitar a proliferação de fungos. Na Figura 4.6 se observa o aspecto do gel obtido após o processo.



Figura 4. 6 Aspecto do hidrogel de quitosana e gelatina obtido logo após o processamento

4.2.3 Ajuste dos parâmetros de impressão

Os parâmetros de impressão foram ajustados em duas etapas: os parâmetros do termoplástico (PCL) e os do hidrogel, e para tal, utilizou-se o programa de fatiamento Slic3r®.

Para a impressão do termoplástico utilizou-se a temperatura de 60 °C para o bico de impressão de 0,4 mm e de 77 °C para o bico de impressão de 0,25 mm. Essas temperaturas foram escolhidas baseando-se na temperatura de fusão do PCL, que é em torno de 60 °C, e cuidadosamente escolhidas para serem as menores possíveis, porém ainda garantir uma fluidez mínima para permitir a printabilidade da peça. A altura de camada foi de 0,3 mm, utilizando a primeira camada com a mesma altura. O infill escolhido foi de 20% e foram feitas duas saias com a distância de 6 mm da peça. A velocidade de impressão empregada foi de 30 mm/s. O diâmetro do filamento foi adaptado para a bioimpressora empregada, sendo o diâmetro interno do canhão onde os *pellets* eram depositados, portanto, de 11 mm. O fator de extrusão empregado foi de 1,2 e o diâmetro do bico de impressão foi de 0,3 para o bico de 0,25 e de 0,4 para o bico de 0,4.

Para a impressão do hidrogel, no entanto, foi necessário realizar algumas adaptações ao programa, que não foi criado para esse tipo de impressão. Primeiramente, realizou-se um teste de velocidade x fator de extrusão para definir qual seria a maior velocidade possível para trabalhar mantendo a printabilidade da peça, no qual foi definido que a velocidade 5 mm.s⁻¹ e o fator de extrusão 1 foram satisfatórios para a impressão do arcabouço de hidrogel. A temperatura de impressão foi de 23 °C, a altura de camada foi de 0,3 mm, utilizando a primeira camada com a mesma altura. O infill escolhido foi de 20% e o diâmetro do filamento, seguindo a mesma lógica da impressão com PCL, foi de 10 mm e o diâmetro do bico foi de 0,4 mm.

4.2.3.1 Velocidade X Fator de extrusão

Buscando obter a otimização dos parâmetros de impressão do hidrogel, foi realizado um ensaio de velocidade X fator de extrusão. Nesse ensaio foi utilizado um hidrogel genérico para mimetizar o hidrogel de quitosana-gelatina, uma vez que esse composto possui consistência muito similar a um hidrogel ideal para a bioimpressão. O gel genérico foi adicionado à seringa e impresso variando a velocidade e fatores de extrusão do sistema.

Primeiramente, utilizando o software SolidWorks®, modelou-se uma peça em forma de zig-zag. Na Figura 4.7 abaixo tem-se o design da peça utilizada para realizar a impressão.

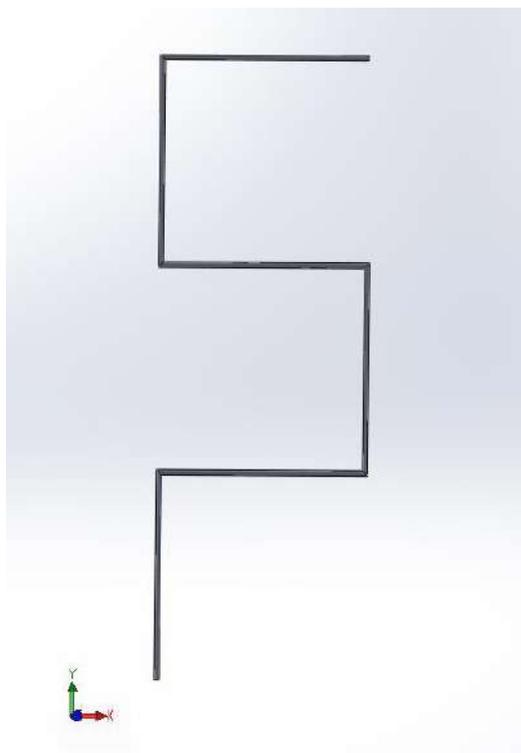


Figura 4. 7 Design escolhido para realização do teste de velocidade X fator de extrusão. O diâmetro da peça é de 0,3 mm.

Após obter o desenho da peça, realizou-se o fatiamento da peça no programa Slic3r®, no qual buscou-se variar os fatores de extrusão em função da velocidade. Foi gerado um G-Code para cada velocidade com fatores de extrusão diversos.

A velocidade variou entre 5 mm/s a 1 mm/s, com intervalos de 1 mm/s. O fator de extrusão em todas as velocidades, partiu do 1, variando para menos, em intervalos de 0,1. O fator de extrusão mínimo atingido para cada velocidade teve como critério capacidade de imprimir completamente a peça planejada no SolidWorks®, sendo o próximo fator incapaz de imprimir ou capaz de realizar apenas a impressão parcial da peça. Fatores que não permitiram a impressão completa da peça, ou que não imprimiram, foram desconsiderados. Cada velocidade e fator de extrusão foi fotografado e para obtenção do diâmetro médio dos filamentos de hidrogel e da área depositada foi feito um tratamento de imagem pelo software Image J.

Para medir a área dos filamentos, cobriu-se a mesma com uma cor de destaque, e após isso, foi colocada em 8 bits. Foi feito o seu histograma e foi escolhida uma faixa de cinza na qual somente a imagem desejada estivesse em destaque. Foi estabelecida uma medida real na foto e então a imagem obtida foi medida nos pontos demonstrados na Figura 4.8.

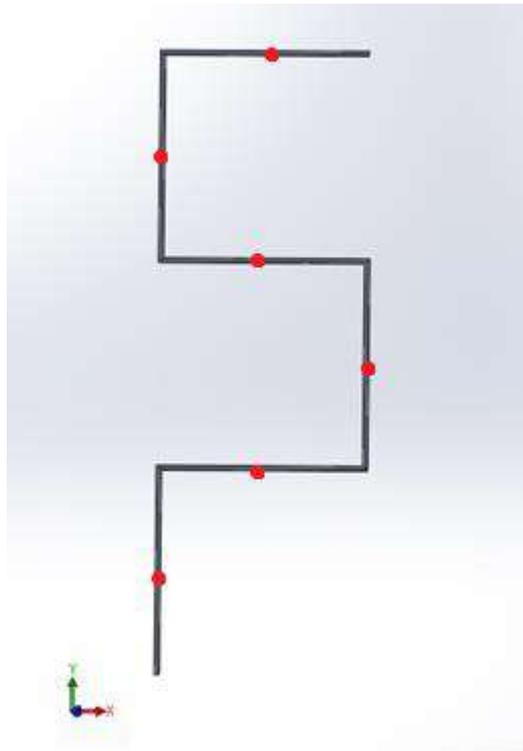


Figura 4. 8 Figura esquemática demonstrando como foram obtidos os pontos medidos no ImageJ para obtenção do diâmetro médio impresso.

Com a medida real estabelecida, foi possível também utilizar a ferramenta de análise de partícula para definir a área de cada peça impressa.

4.2.4 Impressão da peça

Após a definição dos parâmetros de impressão foi realizada a impressão da peça em si, importando o G-code gerado pelo fatiador para o computador no qual a bioimpressora foi conectada. A bioimpressora utilizada no presente estudo foi a Genesis II™ da empresa 3D Biotechnology Solutions apresentada na Figura 4.8, e o software utilizado para a impressão foi o Pronterface, da empresa IMADE3D.

Após as impressões as dimensões dos arcabouços impressos com o bico de 0,25 (n=10) e 0,4 (n=10) foram medidas com o auxílio de um paquímetro, com a exceção dos filamentos, que eram muito delgados para esse tipo de medição. Então, os arcabouços foram fotografados com o auxílio de uma lupa e após isso, medidos com o software ImageJ e, com base nos resultados, foi definido o melhor bico para a impressão de todos os arcabouços.



Figura 4. 9 Foto da bioimpressora Genesis II™ utilizada no presente estudo para realizar a impressão dos arcabouços híbridos.

4.3 Caracterização da tinta de biomaterial e dos arcabouços híbridos

Após a impressão dos arcabouços procedeu-se a caracterização dos mesmos pelas técnicas a seguir descritas

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos arcabouços de PCL e de quitosana-gelatina foi avaliada com auxílio de um Microscópio Eletrônico de Varredura Tescan VEGA3 – República Checa, usando aceleração de 5 a 15 KV do núcleo multiusuário de microscopia do PEMM/COPPE/UFRJ. As amostras usadas foram secas durante 24 horas em dessecador e não foram recobertas com ouro.

4.3.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As composições químicas e estruturais dos arcabouços e do hidrogel foram analisadas por FTIR. Para a obtenção dos espectros foi utilizado o equipamento Spectrum 100 (Perkin-Elmer) do Laboratório multiusuário de caracterização de Materiais de PEMM/COPPE, usando cristal

de ZnSe e refletância total atenuada (ATR). As análises foram conduzidas na faixa de 4000 – 550 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras por amostra.

4.3.3 Ensaio de degradação *in vitro*

Foram conduzidos dois tipos de teste de degradação: (1) somente com solução simuladora de fluido corpóreo e (2) com adição de lizosima. Para ambos os testes as amostras foram secas previamente em dessecador pelo período de 24 horas.

4.3.3.1 Ensaio de degradação com solução simuladora de fluido corpóreo

Os testes de degradação *in vitro* dos arcabouços foram conduzidos de acordo com a Norma ISO 10993 parte 6.1 (1994). Os arcabouços de PCL/Quitosana-Gelatina foram imersos em 7,7 mL de solução simuladora de fluido corpóreo, contendo:

- Cloreto de sódio (NaCl) – 0,58%
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3) – 0,38%
- Carbonato de potássio (K_2CO_3) – 0,028%

O grupo controle foi conduzido com saliva artificial, obtida na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, contendo:

- Fosfato de potássio dibásico (K_2PO_4) – 0,45%
- Fosfato de sódio dibásico (Na_2PO_4) – 0,34%
- Bicarbonato de potássio (KHCO_3) – 1,54%
- Cloreto de Sódio (NaCl) – 0,6%
- Cloreto de Magnésio (MgCl_2) – 0,014%
- Ácido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) – 0,0010%
- Cloreto de Cálcio (CaCl_2) – 0,5%
- Benzoato de sódio – 0,5%
- Sorbitol – 10%
- Carboximetilcelulose – 0,7%
- Nipagim – 0,18%

Os testes foram realizados em pH 7,4. O pH da solução foi ajustado para 7,4 (pH de solução fisiológica), com o auxílio de um pHmetro, pela adição de ácido láctico. O pH da saliva artificial já se encontrava em 7,4.

Arcabouços de duas camadas foram mantidos imersos em saliva e nas soluções de fluido corpóreo durante os tempos de 24h, 72h, uma semana, duas semanas, três semanas e quatro semanas em incubadora (Shaker - Mod. MSM 130/B, MS Mistura) à 37 °C, com agitação de 50 rpm. O ensaio foi realizado em duplicata (n=2) e com um grupo controle para cada tempo escolhido. Em tempo predeterminado as amostras foram removidas do meio e secas em dessecador. As amostras foram pesadas antes (M₁) e após degradação *in vitro* (M₂). O grau de degradação (ΔM) foi determinado como perda de peso em relação ao peso inicial da amostra conforme mostra a Equação 1, onde M₁ é a massa inicial, obtida antes da realização do ensaio, assim que o arcabouço deixou o dessecador, e M₂ é o peso obtido após o teste de degradação.

$$\Delta M = 100x \frac{M_1 - M_2}{M_1} \quad (\text{Equação 1})$$

4.3.3.2 Ensaio de degradação enzimática

Os testes de degradação enzimática foram desempenhados de acordo com o estudo de FLORES-HERNÁNDEZ et al., 2018 realizando pequenas adaptações. Para tal, foram utilizadas as mesmas composições de saliva artificial e solução de fluido corpóreo com o mesmo pH.

O teste foi feito em ambas soluções com a adição de 5 µg. mL⁻¹. Foram usados os mesmos tempos e condições do teste de degradação com solução simuladora de fluido corpóreo, à exceção do número de amostras, que foi feito com amostra única, devido à restrita quantidade de enzima disponível. Foi feito dois grupos controle para cada tempo, no qual, em um, havia somente saliva com o arcabouço e, no outro, somente o tampão com o arcabouço. O grau de degradação foi calculado de acordo com a Equação 2.

Após os ensaios de degradação, as amostras foram submetidas à análise de energia dispersiva para observar se houve modificação de sua composição após a degradação.

4.3.4 Ensaio de absorção de fluidos

Para avaliar a capacidade que os arcabouços possuem de absorver líquidos foi realizado ensaio de absorção de fluidos. Para isso foram impressos arcabouços com 4 camadas de altura, e, para que toda a água contida em seu interior fosse removida, todos foram colocados durante o período de 24 horas em um dessecador com sílica. Após esse processo, os arcabouços (N=3) foram pesados e colocados em saliva artificial, obtida na Faculdade de Farmácia de UFRJ, água

e solução simuladora de fluidos corpóreos, todos a 37° C e pH 7,4, pelos períodos de 1; 2,5; 5;10; 30; 60; 90; 120; 150 e 180 minutos. Após esses períodos de tempo preestabelecidos, os arcabouços foram novamente pesados e a absorção de fluidos (AF) obtida pela Equação 2.

$$AF = 100x \frac{M_2 - M_1}{M_1} \quad (\text{Equação 2})$$

4.3.5 Ensaio de Desidratação

Para avaliar o tempo em que os arcabouços são capazes de perder completamente a água, foram realizados dois ensaios de desidratação: um em dessecador e outro em estufa não ventilada a 37 °C. Para tal, foram impressos arcabouços com 2 camadas de altura (N=3), e para obter um parâmetro de total desidratação, os arcabouços foram colocados em dessecador por um período de 24 horas, sendo pesados após esse tempo e então depositados em uma solução simuladora de fluido corpóreo por 30 minutos. Após isso, os arcabouços foram pesados novamente, colocados em um vidro relógio e depositados em um dessecador/estufa não ventilada a 37°C. As amostras foram pesadas nos tempos de 1; 2,5 e 5 minutos inicialmente, depois foram pesadas em um intervalo de 5 minutos, até atingir massa constante e similar à obtida ao tirar a amostra do dessecador para realizar o teste.

A taxa de desidratação foi calculada pela Equação 1. Onde M_1 é o peso do arcabouço após ser retirado da solução simuladora de fluido corpóreo e ser levemente seco em papel absorvente, e M_2 é o peso das amostras após a realização do teste a cada tempo pré-determinado.

4.3.6 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Os elementos químicos presentes nos arcabouços foram identificados por meio de análise da área das amostras e mapeamento em MEV/EDS JEOL JSM 6460-LV. Os arcabouços foram analisados em suas superfícies e antes e após 3h decorridas do ensaio de absorção de fluidos realizados com saliva, solução simuladora de fluido corpóreo e água, com a finalidade de observar uma possível variação na intensidade dos picos referentes aos sais presentes no meio em que o arcabouço permaneceu. Também foram conduzidas análises de EDS após os ensaios de degradação, para observar se houve modificação composicional após o teste.

4.3.7 Ensaio biológicos *in vitro*

4.3.7.1 Cultura de células

As células escolhidas para o estudo foram as MG63, derivadas de osteossarcoma e as mesmas foram expandidas de acordo com um método modificado para MSCs humanas (VINARDELL et al., 2009). As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado com Dulbecco de alta glicose, GlutaMAX (hgDMEM), suplementado com 10% v / v de soro bovino fetal (SFB), penicilina (100U.ml⁻¹) / estreptomicina (100µg.ml⁻¹) (Sigma-Aldrich) e anfotericina B 2,5 µg.ml⁻¹ (Sigma-Aldrich) - mediana XPAN - a 37 ° C, 20% de pO₂. As células foram tripsinizadas, contadas, semeadas na densidade de 2.10⁴ células cm² em frascos triplos de 175 cm² (Thermo Fisher Scientific) e cultivadas em meio XPAN até a passagem 2.

4.3.7.2 Condições de cultura *in vitro*

Antes da cultura celular, os arcabouços foram esterilizados com óxido de etileno por 24 horas. Foram colocados dentro de placas de 24 poços e semeados com uma gota de 150 µl contendo 2x10⁴ células. A condição de cultura osteogênica aplicada neste estudo é definida como cultura de células em meio osteogênico (OM), GlutaMAX de Eagle modificado com Dulbecco com alta glicose (hgDMEM) suplementado com 10% v / v de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100U .ml⁻¹) / estreptomicina (100 µg.ml⁻¹) (todas Sigma-Aldrich) e 2,5 µg.ml⁻¹ de anfotericina B (Sigma Aldrich), 0,5% de dexametasona, 1% de β-Glicerolfosfato e 0,029% de ácido ascórbico (Sigma Aldrich) a 5% de pCO₂.

4.3.7.3 Análise de citotoxicidade

Após 24 horas do inóculo celular, as monocamadas em subconfluência foram submetidas aos ensaios de citotoxicidade pela metodologia de MTT que avalia o extrato. Após isso as amostras foram lavadas com 200 µL de PBS estéril, e então se adicionou 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL). A placa foi incubada pelo período de duas horas, e posteriormente retirou-se toda a solução de MTT da placa, adicionando 100 µL de DSMO puro aos poços. A placa foi agitada no agitador de placa por 5 minutos, aguardando mais 5 para estabilizar a solução e então os arcabouços foram retirados dos poços e a absorbância do sobrenadante foi lida a 540 nm, no Leitor de Microplacas Synergy 2 BioTek.

4.3.7.4 Análise da Morfologia celular

Para avaliar a morfologia e a adesão das células ao material ao final da cultura de 24 horas, foi realizada microscopia eletrônica de varredura. Após cultura, as amostras foram fixadas com solução Karnovsky – 4% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído em tampão Cacodilato 0,1M – pós-fixadas com tetróxido de ósmio e passaram por processo de desidratação com imersão em álcool, com diferentes concentrações (15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Após esse processo, foi feito o ponto crítico das amostras (Laboratório de Cultura de Células/ Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas) seguido da metalização com ouro, realizada no laboratório de Microscopia Eletrônica (PEMM/COPPE/UFRJ).

O equipamento utilizado para obtenção das imagens foi o Microscópio Eletrônico de Varredura Tescan VEGA3 – República Checa, usando aceleração de 5 a 15 KV do núcleo multiusuário de microscopia do PEMM/COPPE/UFRJ. Todas as amostras foram, previamente, recobertas com ouro e observadas a 15 kV. As imagens obtidas foram fotografadas e, então, seguiu-se a avaliação da morfologia celular, bem como a avaliação da adesão celular.

IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ajuste dos parâmetros de impressão

5.1.1 Impressão da moldura de Policaprolactona (PCL)

Para avaliar a precisão e a reprodutibilidade das peças de PCL impressas, foram medidas as dimensões dos arcabouços. Os valores das dimensões das peças em comparação com o modelo virtual são mostrados na Fig. 5.1. Os arcabouços impressos mostraram uma pequena diferença dimensional positiva em comparação com o modelo CAD projetado para o bico de 0,4 mm e uma diferença negativa para o bico de 0,25 mm (Fig. 5.1).

Essas diferenças entre modelo virtual e peça impressa podem ocorrer devido a diferenças do diâmetro dos bicos de impressão, no qual o bico de 0,25 mm serve como uma barreira física que impede a deposição do termoplástico, enquanto o bico de 0,4 mm permite uma maior

deposição de material, quando se mantém os mesmos parâmetros de impressão para ambas as condições. E, também, pode ocorrer por conta de uma característica inerente da impressão 3D: a mudança de trajetória do bico de impressão.

Quando o modelo CAD é fatiado para gerar o G-Code, o software busca um caminho que tende a gerar maior economia de material e construção mais rápida de cada peça, e então, a mudança repentina de trajetória no bico de impressão pode causar interrupção da linha de impressão deslocando pequenas quantidades de material fundido e, por consequência, alterando as dimensões da peça nas três direções (x, y e z) (MOHAMED; MASOOD; BHOWMIK, 2015). Tal cenário favorece o bico de 0,25 mm, fazendo com que a peça impressa se aproxime dimensionalmente da peça projetada, mas como é possível notar da Figura 5.2, ainda gera uma pequena diferença negativa. E quando se trata do bico de 0,4 mm, faz com que haja uma diferença positiva de dimensão.

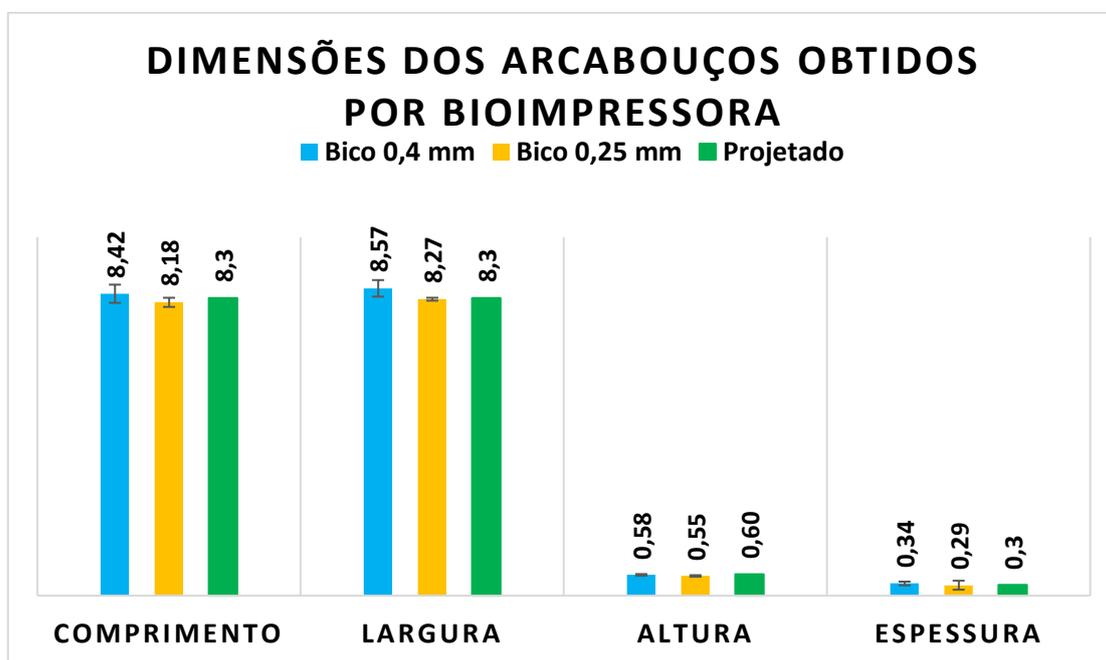


Figura 5. 1 Dimensões das amostras medidas em comprimento, largura, altura e espessura de filamento dos arcabouços obtidos via bioimpressora expressos em milímetros.

Ao considerar o desvio padrão das peças, é possível ver que os dois bicos são capazes de produzir peças similares à projetada no CAD. No entanto, o bico escolhido para imprimir os demais arcabouços foi o de 0,25 mm pois seu desvio padrão foi inferior ao bico de 0,4 mm na maioria das dimensões apresentadas.

5.1.2 Velocidade x Fator de Extrusão

Na Figura 5.2 há 3 fotografias do hidrogel impresso à mesma velocidade (1 mm.s^{-1}) com diferentes fatores de extrusão: 0,7; 0,8 e 1,0.

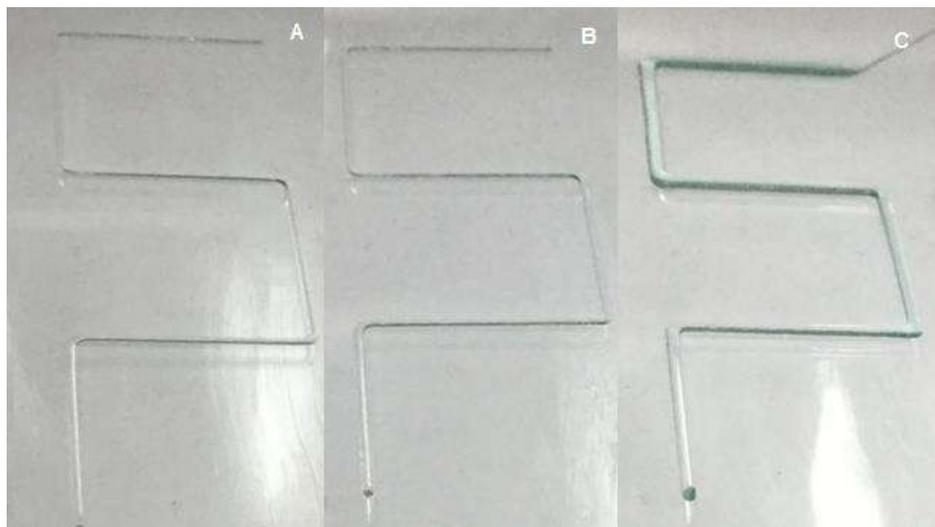


Figura 5. 2 Imagem demonstrativa do teste de velocidade x fator de extrusão. Na figura A, aplicou-se o fator de extrusão de 0,7, na B 0,8 e na C 1,0.

O fator de extrusão é um parâmetro dentro dos fatiadores que calcula a taxa em que o material será impresso, está relacionado à velocidade e à quantidade de material que passa pelo bico. Na figura 5.2.A se observa um filamento delgado, similar à figura 5.2.B, porém menos espesso que a figura 5.2.C. Isso demonstra que o fator de extrusão tem um impacto significativo na impressão de hidrogel no que tange a fidelidade de forma.

Quanto aos resultados de velocidade e fator de extrusão é possível observar que ao variar velocidade e manter o mesmo fator de extrusão, nota-se que para as velocidades menores, o filamento impresso foi mais espesso. Isso se deve ao fato de que o gel, nas velocidades mais baixas, teve um tempo maior para se depositar no mesmo percurso em comparação com as velocidades mais altas. O gráfico apresentado na Figura 5.3 mostra os valores de área em relação aos fatores de extrusão a velocidades constantes, no qual é possível ver o comportamento descrito anteriormente, com exceções que podem ter ocorrido devido a entupimentos na seringa pela deposição de hidrogel.

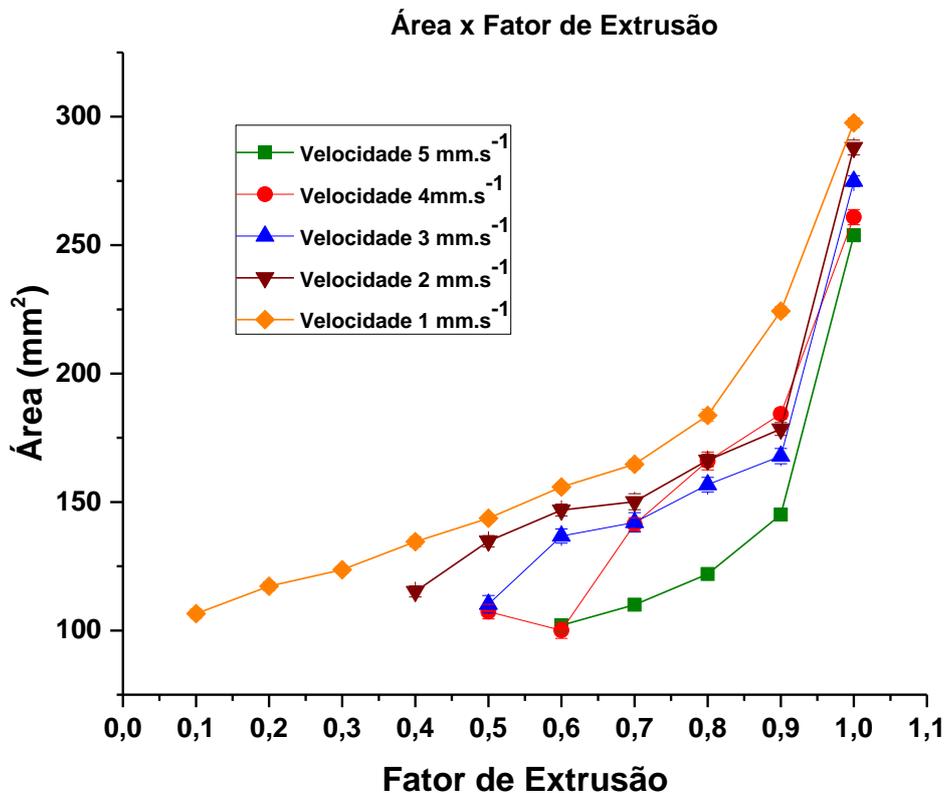


Figura 5. 3 Gráfico de área x fator de extrusão à velocidade constante.

Ao manter a mesma velocidade e modificar o fator de extrusão, observa-se que quanto menor a velocidade, maior a capacidade da bioimpressora em imprimir com fatores de

extrusão cada vez menores. Por exemplo, na velocidade 5 mm.s⁻¹, o fator de extrusão mínimo foi de 0,6. Ao analisar a velocidade 1, no entanto, o fator de extrusão varia de 1 até 0,1, e esse último teste apresentou uma peça completa. Isso demonstra que quanto menor a velocidade de impressão, maiores as quantidades de fatores de extrusão aplicáveis à bioimpressão.

Ao observar a área dos filamentos na velocidade 1 mm.s⁻¹, observa-se que não houve variações significativas de área, para o intervalo escolhido, o que leva a crer que velocidades mais baixas são menos sensíveis à técnica e menos sensíveis a variações de fatores de extrusão. E também pode-se notar o aumento quase linear do intervalo dos fatores de extrusão de 0,2 a 0,7, uma tendência que é observada em velocidades mais baixas (abaixo de 3 mm.s⁻¹).

Analisando as áreas de velocidade 5 mm.s⁻¹, observa-se o contrário do observado na velocidade 1 mm.s⁻¹. Ou seja, variações de 0,1 no fator de extrusão causam variações significativas na área do filamento impresso e com isso conjectura-se que velocidades maiores são mais sensíveis a mudanças no fator de extrusão, tornando-as mais sensíveis à técnica.

Ao observar os perfis das curvas observa-se um aumento de área para as velocidades menores. Para a velocidade 4 mm.s^{-1} , com o fator de extrusão de 0,6, observa-se uma área inferior à velocidade 5 mm.s^{-1} , e conjectura-se que possa ter havido entupimento na seringa no momento da extrusão de gel, fato esse, amplamente descrito na literatura e muito associado como um dos principais contratempos na bioimpressão (DERAKHSHANFAR et al., 2018)(RAGHUNATH et al., 2018)(BOSE et al., 2018).

Na Figura 5.4 tem-se o diâmetro médio de filamento depositado pela bioimpressora em diferentes fatores de extrusão e em velocidade constante. O perfil observado é semelhante ao das áreas, e percebe-se que sob velocidades mais altas é possível imprimir filamentos mais finos. A velocidade de 5 mm.s^{-1} se mostrou ideal para imprimir a peça projetada, pois foi a mais rápida com o diâmetro médio de filamento de 0,31 mm.

Conforme há a diminuição da velocidade, se observa que há mais fatores de extrusão que imprimem a peça com espessuras em torno de 0,3 mm, endossando a ideia de que velocidades menores são, realmente, menos sensíveis à técnica. O menor diâmetro de filamento impresso foi de 0,20, com o fator de extrusão 0,6 e velocidade 5 mm.s^{-1} enquanto o maior diâmetro impresso foi de 0,46, com o fator de extrusão 1 e velocidade 1 mm.s^{-1} .

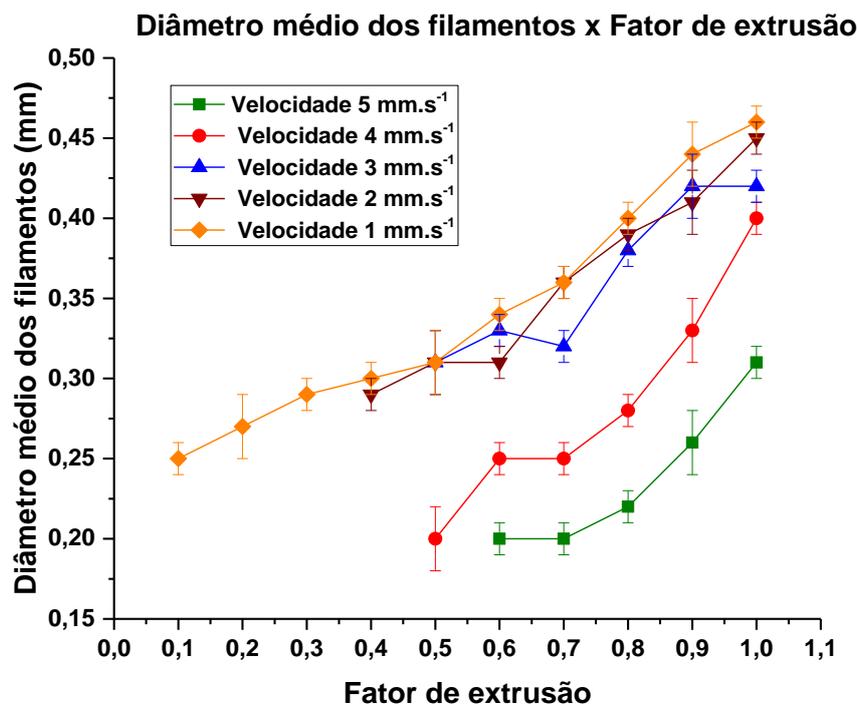


Figura 5. 4 Gráfico de fator de extrusão x diâmetro médio de filamento de gel depositado (em mm) sob diferentes velocidades. Diâmetro projetado: 0,3 mm.

Após o ajuste dos parâmetros de impressão, o arcabouço híbrido de PCL e hidrogel de quitosana/gelatina foi obtido via bioimpressora 3D. A Figura 5.5 mostra a avaliação macroscópica da visão superior dos arcabouços, que foram produzidos com sucesso.

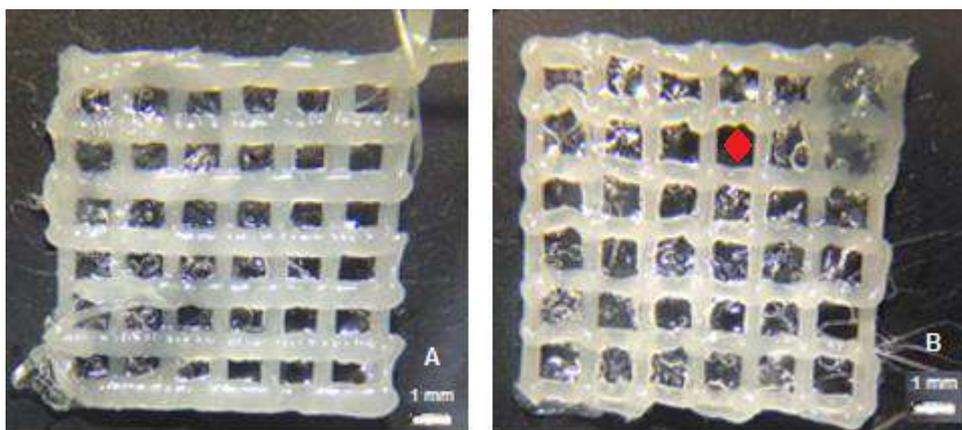


Figura 5. 5 Figura A: se observa o arcabouço com a moldura de PCL impressa com o bico de 0,4. Figura B: se observa o arcabouço impresso com o bico de 0,25. O losango vermelho sinaliza um ponto com ausência de hidrogel.

A região translúcida refere-se à deposição do hidrogel de quitosana/gelatina. Observa-se que a região marcada pelo losango vermelho parece não estar preenchida. Isso, deve ter ocorrido, provavelmente, em decorrência do ressecamento do hidrogel, ocasionando um ponto de tensão e um destacamento do filme nessa região.

5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 5.6 apresenta duas micrografias obtidas por MEV da superfície do arcabouço de PCL/quitosana-gelatina impresso de acordo com os parâmetros otimizados nos itens anteriores (PCL impresso com o bico de 0,25, a 30 mm.s^{-1} , fator de extrusão 1,2 e temperatura de 77°C ; hidrogel impresso com velocidade de 5 mm.s^{-1} , com fator de extrusão 1 e temperatura de 23°C). Na Figura 5.6.B se vê o arcabouço por uma visão de fundo. Conforme é visto, o arcabouço apresenta uma arquitetura compatível com o modelo digital, além de que, se observa também, que o hidrogel está presente em todos os poros da moldura de PCL em forma de filme. As micrografias mostram que a deposição do material pela bioimpressora não afeta a integridade de PCL e do hidrogel, e que, apesar da temperatura do PCL chegar a até 77°C , o hidrogel não é degradado, nem a moldura.



Figura 5. 6 Na micrografia A se observa o arcabouço de uma visão frontal, as estrelas demonstram pontos onde não se vê hidrogel são pontos de tensão. Na micrografia B se vê o arcabouço de uma visão de fundo, observando sua estruturação de eixo 0-90°.

Na Figura 5.7 observa-se duas micrografias. Na Figura 5.7.A há um defeito no filme de hidrogel, o que confirma o que foi inferido anteriormente sobre o ressecamento do hidrogel ocasionar um ponto de tensão e causar um defeito no arcabouço (também mostrado na Figura 5.6, com as estrelas brancas), entretanto, a partir disso, foi possível observar dentro do poro da moldura e verificar que os filamentos eram depositados corretamente, conforme mostrado anteriormente na Figura 5.6.B. De fato, a bioimpressora foi capaz de imprimir os filamentos, camada a camada, sem gerar defeitos de impressão na moldura. A amostra impressa possui 6 camadas, e nota-se que há profundidade e que os filamentos estão alinhados um em cima do outro. Na micrografia 5.7,B, com o aumento de 650 vezes, vê-se que a camada de hidrogel que é depositada dentro da moldura forma um filme muito delgado após o processo de desidratação. A partir dessa imagem também foi calculada a espessura do filme de hidrogel, que foi de 1,582 μm com um desvio-padrão de 0,444 μm .

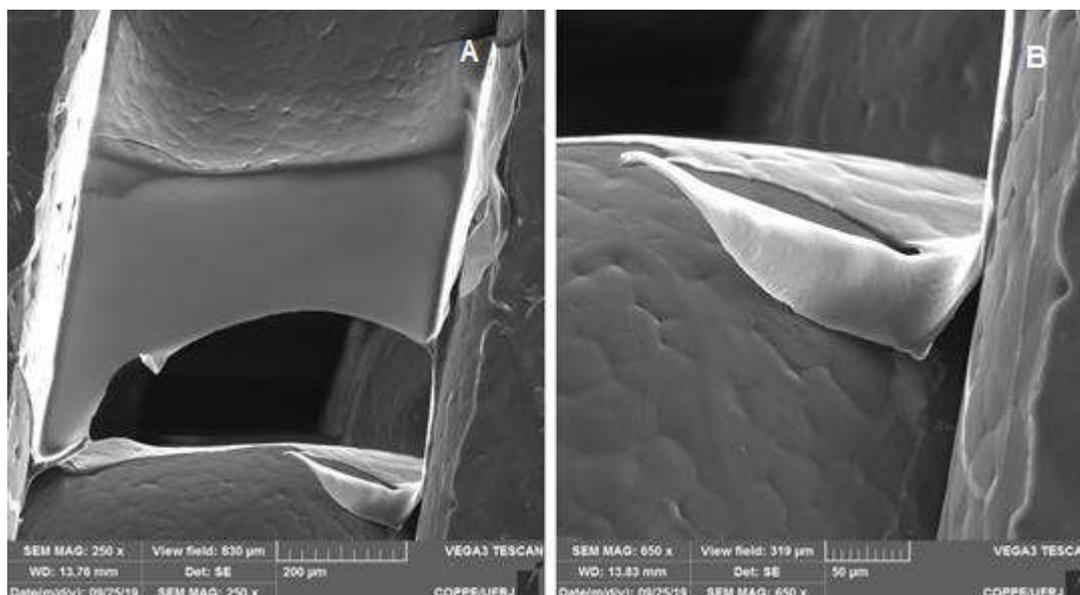


Figura 5. 7 Na micrografia A observa-se um poro da moldura de PCL coberto parcialmente com um filme de hidrogel. A figura b ilustra a espessura do mesmo filme.

Na Figura 5.8 observa-se a interface entre o filme de hidrogel e a estrutura de PCL, mostrando a forma como o hidrogel se adere à moldura. Na micrografia apresentada na Figura 5.8.A nota-se que o hidrogel é depositado e se espalha sobre a moldura até, aproximadamente, à metade do filamento de PCL. Na micrografia demonstrada na Figura 5.8.B se observa um ponto de fratura do filme, onde há um desprendimento do termoplástico. A fratura é reta e não causou defeitos na área do poro.

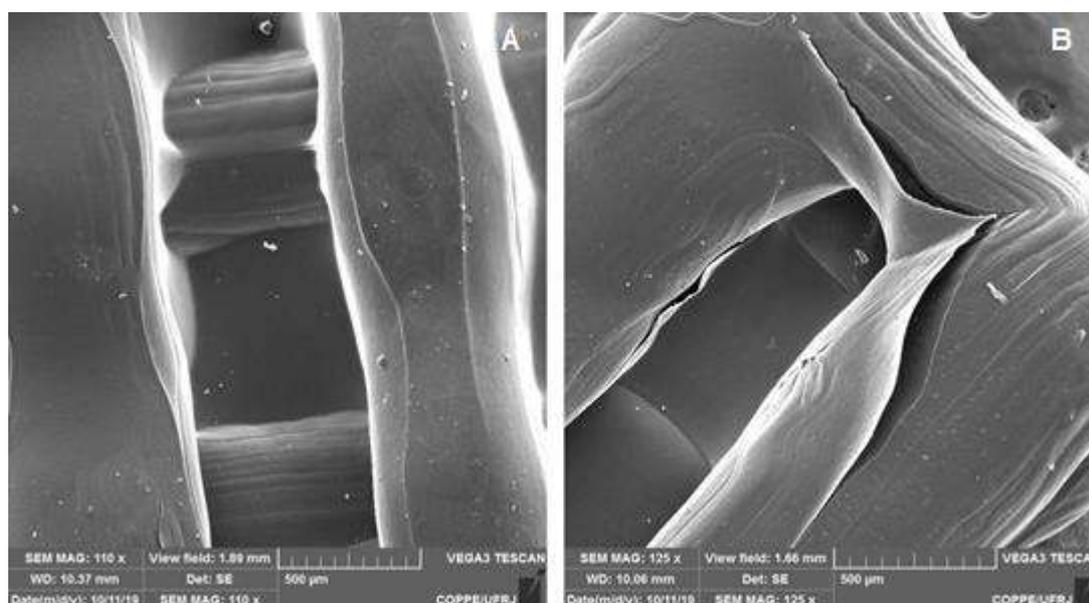


Figura 5. 8 Na figura A se nota o padrão de deposição do hidrogel sobre a moldura de PCL. Na figura B observa-se uma área onde o filme se desprendeu da moldura.

5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 5.9 se apresenta o espectro de FTIR para o hidrogel, a quitosana pura e a gelatina pura com espectro do infravermelho na faixa 500-4000 cm^{-1} . Na Figura 5.10 se observa o mesmo gráfico, com destaque para o espectro na faixa de 800-2000 cm^{-1} .

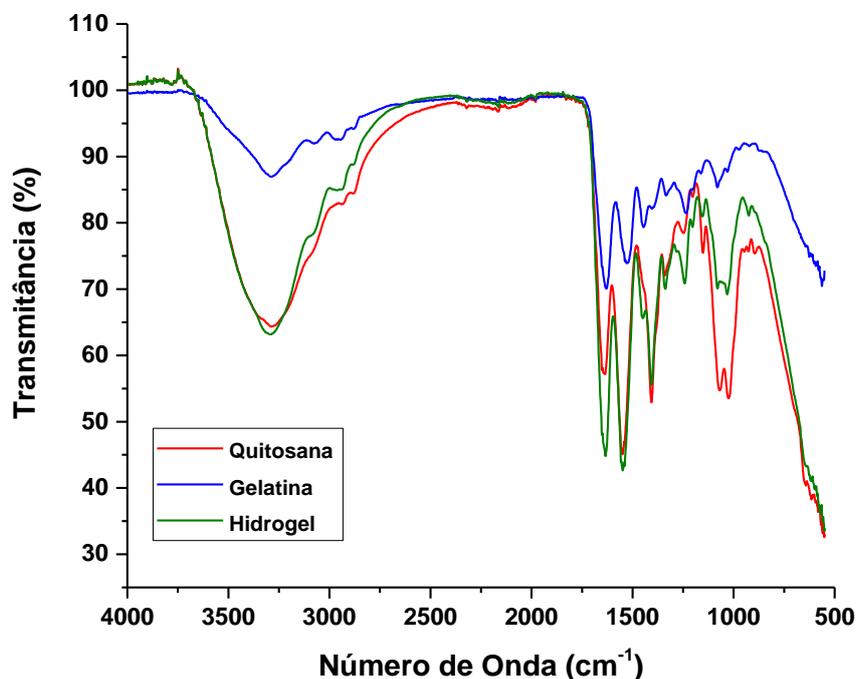


Figura 5. 9 Espectro de FTIR para o hidrogel, a quitosana pura e a gelatina pura com espectro do infravermelho na faixa de 500-4000 cm^{-1} .

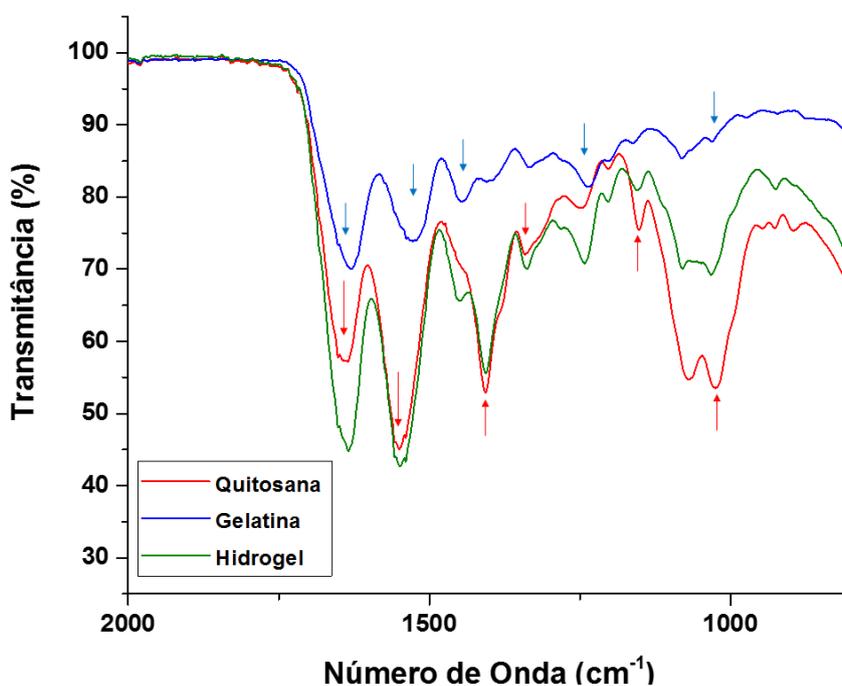


Figura 5. 10 Destaque da Figura 5.9 para o espectro de 800-2000 cm^{-1} . As setas indicam as bandas características da quitosana e da gelatina.

Na Tabela 2 apresentam-se os valores das bandas de absorção características da quitosana e também os dos obtidos no presente estudo para a quitosana e o hidrogel. De acordo com a literatura, em 1645 cm^{-1} há uma banda característica da ligação de Amida I, que se mostra no gráfico apresentado na Figura 5.9 em 1634 cm^{-1} para a quitosana pura, e também, se apresenta no mesmo ponto para o hidrogel, demonstrando que essa ligação não foi alterada após as interações com a gelatina. Os valores correspondentes às ligações de Amida II, flexão de N-H e flexão de $-\text{CH}_2$ quase não sofreram modificações, demonstrando que as interações nesse tipo de ligação são fracas. A absorção da banda, na curva de quitosana, em torno de 1341 cm^{-1} associada a deformação simétrica de CH_3 mostra, ao observar a absorção da banda na curva do hidrogel, em 1337 cm^{-1} que houve deslocamento da ligação. Isso mostra que houve interação com a gelatina nesse ponto. Um leve deslocamento também é observado, na mesma curva, na banda em 1151 cm^{-1} e em 1026 cm^{-1} , ao comparar com a do hidrogel, que se encontra em 1153 cm^{-1} e 1031 cm^{-1} , respectivamente, que se devem ao alongamento assimétrico de das ligações C-O-C ou ao alongamento de C-N e à vibração do alongamento da ligação C-O. Logo, ao comparar os espectros da quitosana e o hidrogel é notável em 3 pontos o deslocamento da banda de absorção do hidrogel em relação a quitosana, enquanto os demais pontos se mantêm.

Tabela 2 Bandas de absorção no infravermelho características da quitosana com seus valores encontrados na literatura e os obtidos no presente estudo para a quitosana e o hidrogel (LAWRIE et al., 2007).

NÚMERO DE ONDA(CM^{-1})			
LITERATURA	Quitosana	Hidrogel	Tipo de Ligação
1645	1634	1634	Amida I
1414	1406	1405	Flexão $-\text{CH}_2$
1150	1151	1153	Alongamento assimétrico de C-O-C e alongamento C-N
1026	1025	1031	Vibração esquelética do alongamento C-O

Na Tabela 3 estão listadas as principais bandas de absorção no infravermelho características da gelatina e seus valores em comparação aos do hidrogel e quitosana obtidos pela análise.

Tabela 3 Bandas de absorção no infravermelho características da gelatina com seus valores encontrados na literatura e os obtidos no presente estudo para a gelatina e o hidrogel (NG; YEONG; NAING, 2016) (IBRAHIM et al., 2011).

NÚMERO DE ONDA (CM^{-1})	
-------------------------------------	--

LITERATURA	Gelatina	Hidrogel	Tipo de Ligação
1628	1631	1636	C=O
1446	1446	1450	Amida II
1539	1539	1556	Amina
1243	1237	1242	Amida III
1031	1030	1032	CH3 – amida

Na banda de absorção do alongamento da ligação C-N, da ligação amida primária e C=O não sofreram nenhum tipo de deslocamento. Em contrapartida, na banda de absorção de amida secundária foi verificado um leve deslocamento da banda para o hidrogel, sendo verificado o mesmo comportamento para a banda de amida terciária e amina, sendo esses, provavelmente, os pontos de interação da gelatina com a quitosana.

Essas interações descritas anteriormente também são relatadas no estudo de NG; YEONG; NAING, 2016 que observa as mesmas modificações de bandas. Eles justificam que as ligações de hidrogênio formadas entre as moléculas de quitosana e gelatina são as responsáveis por esse deslocamento e outros estudos sobre filmes desses mesmos compostos reafirmam esse argumento (CHENG et al., 2003; YIN et al., 2005, 1999). Perante tais resultados, é possível afirmar que houve a formação de um complexo coacervado, que possui características tanto da quitosana quanto da gelatina.

5.4 Ensaio de Degradação

Buscando mimetizar o ambiente do corpo humano, utilizou-se a solução simuladora de fluido corpóreo comparando-a com a saliva. Na Figura 5.11 observa-se o perfil de degradação das amostras em saliva e em tampão.

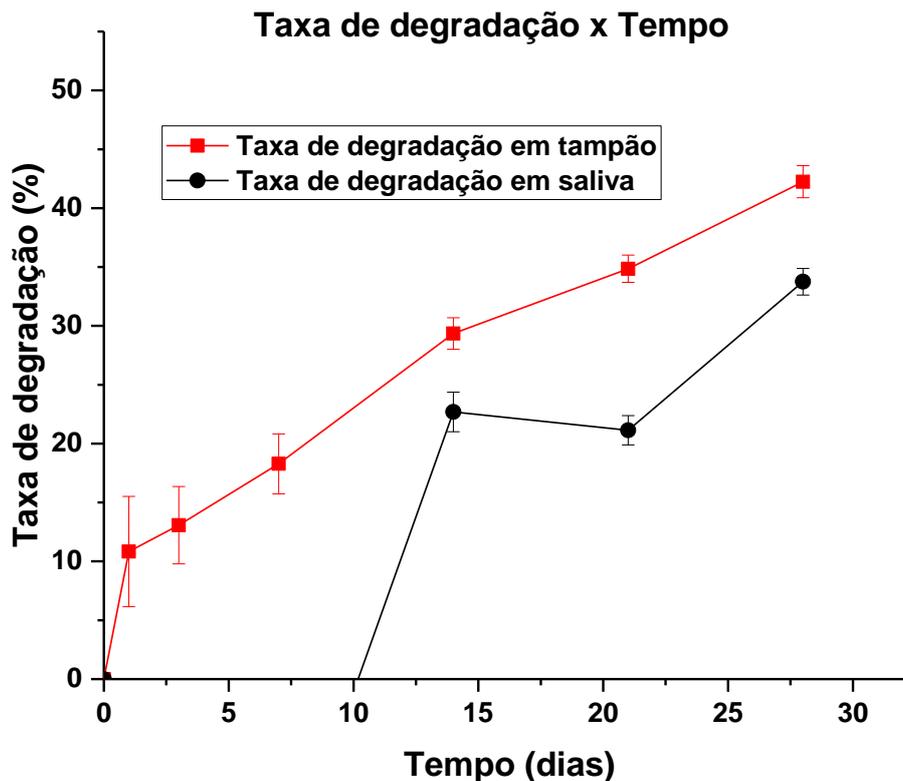


Figura 5. 11 Gráfico do perfil de degradação dos arcabouços em tampão e em saliva em função do tempo.

Nos primeiros dias (1, 3 e 7), para as amostras em saliva, houve um aumento de massa.. Isso pode ter ocorrido pela difusão de líquido para dentro do material, o que ocasionou em um fluxo de íons presentes na solução para o interior do hidrogel, resultando no aumento de massa após o arcabouço ser seco. Nos demais dias, houve uma abrupta perda de massa, levando a degradação em saliva para valores em torno de 22% na segunda e terceira semanas, e para 33% na quarta, o que sugere que o material tenha entrado no terceiro estágio de degradação, com quebra de ligações principais e degradação do material.

Na Figura 5.12 observa-se o perfil de degradação enzimática das amostras em função do tempo.

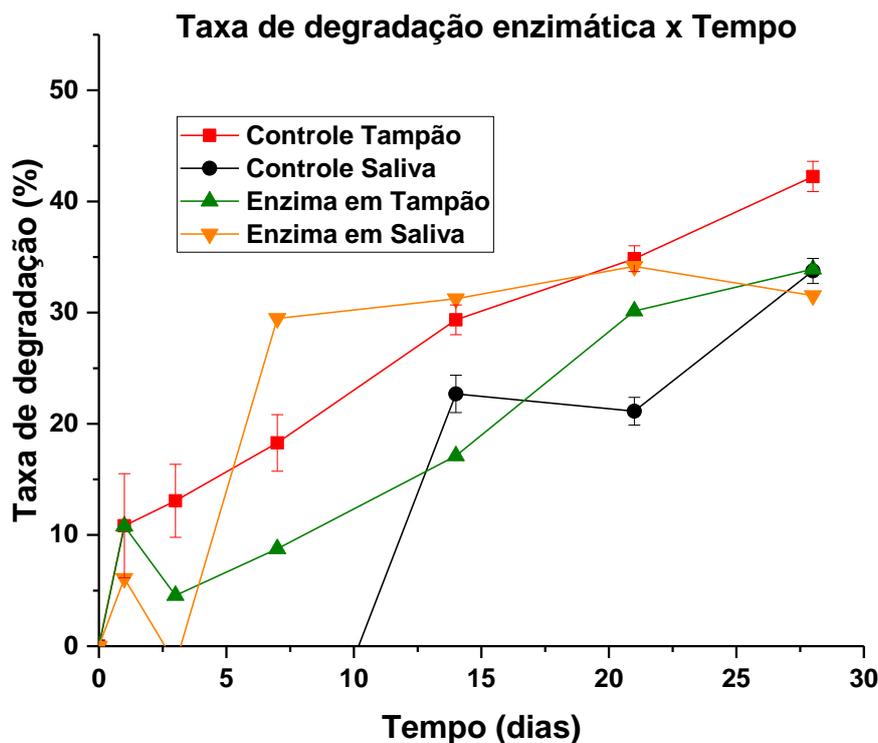


Figura 5. 12 Gráfico do perfil de degradação enzimática dos arcabouços em tampão e em saliva em função do tempo, com seus respectivos controles.

Para o teste enzimático em tampão foi observado um perfil gradual de degradação enzimática, com características similares à curva de degradação convencional em tampão. Houve uma perda de massa gradual conforme os dias passaram, culminando em uma degradação em torno de 34% ao final de 4 semanas. O teste enzimático em saliva também exibiu um resultado com características parecidas às do controle, e também em menor escala, como aconteceu com o primeiro caso. Houve um pequeno aumento de massa, para posteriormente perder massa de forma significativa. O teste em saliva também obteve um pico de degradação de 34% ao final de 3 semanas mantendo esse valor ao final de 4 semanas.

Em um estudo realizado na presença da enzima em água e em tampão de PBS (LONČAREVIĆ; IVANKOVIĆ; ROGINA, 2017) foi observado que em tampão a degradação foi ditada pela dissolução da quitosana e pela clivagem de ligações principais. Em água houve apenas a dissolução da quitosana, porém não identificaram inatividade da enzima, o que mostra que o processo de degradação da quitosana acontece por essas duas vias.

No estudo de FLORES-HERNÁNDEZ et al., 2018, os autores fizeram filmes de quitosana reforçados com fibras de queratina, e realizaram um teste de degradação na presença de lisozima, nos tempos de 1 a 21 dias. A quitosana começou a ser degradada na primeira

semana, obtendo seu máximo de degradação em 3 semanas. Eles obtiveram resultados variando entre 16% a 76% de degradação, no qual os filmes que possuíam as fibras mais longas foram os que demonstraram ter a menor degradação.

Foi realizada uma análise de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) para investigar esse comportamento de ganho de massa das amostras em saliva, também foi feita a mesma análise nos arcabouços após os testes de degradação em água e em tampão. Os resultados comparativos podem ser observados na Figura 5.13 e na Tabela 4.

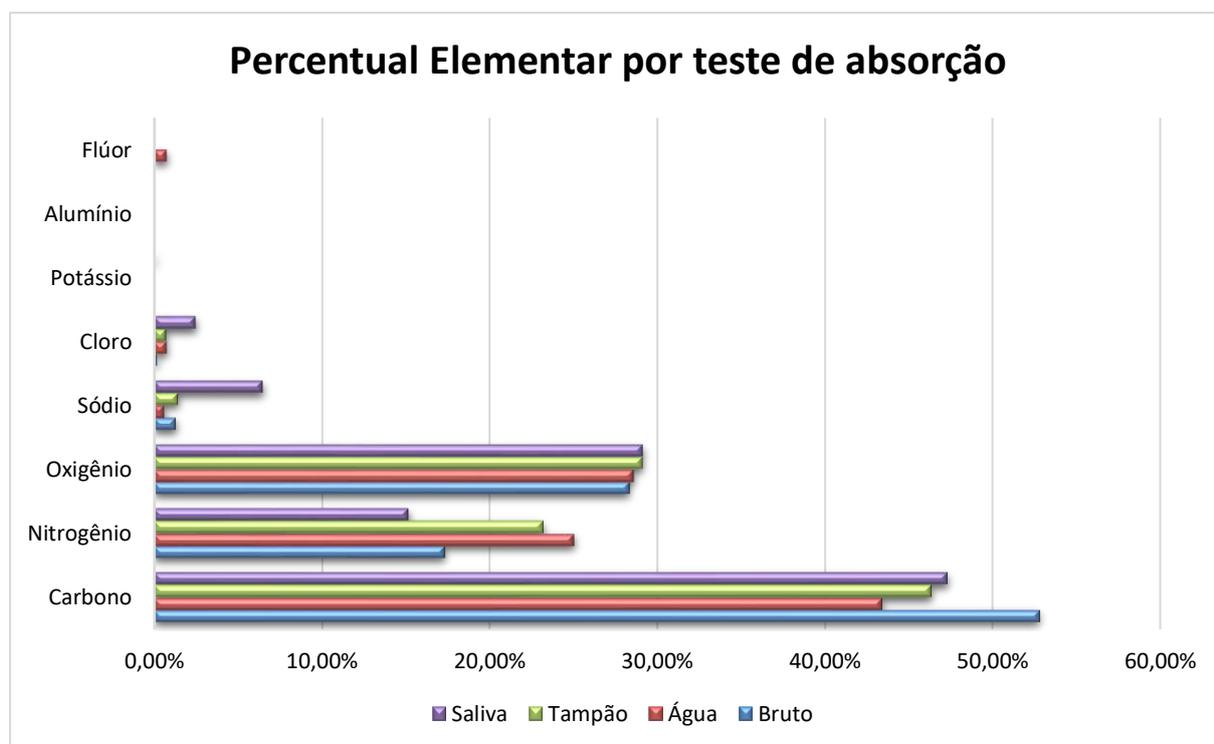


Figura 5. 13 Gráfico dos percentuais elementares em função do tipo de ensaio de absorção realizado.

Tabela 4 Elementos presentes na análise de EDS com seus pesos percentuais, para os arcabouços após o teste de absorção em cada um dos fluidos apresentados. O arcabouço bruto, sem nenhum tipo de análise também está presente para efeito de comparação.

ELEMENTO	BRUTO	ÁGUA	TAMPÃO	SALIVA
CARBONO	52,81%	43,39%	46,34%	47,34%
NITROGÊNIO	17,33%	25,03%	23,20%	15,21%
OXIGÊNIO	28,35%	28,60%	29,12%	29,16%
SÓDIO	1,31%	0,60%	1,45%	6,49%
CLORO	0,20%	0,77%	0,74%	2,51%
POTÁSSIO	0,00%	0,00%	0,00%	0,10%

ALUMÍNIO	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
FLÚOR	0,00%	0,77%	0,00%	0,00%

5.5 Teste de Absorção de Fluidos

Na Figura 5.14 observa-se que o arcabouço mantém a mesma estrutura em diferentes tempos de absorção, demonstrando que é capaz de manter a morfologia após até, pelo menos, 180 minutos após ser disposto em um meio completamente líquido.

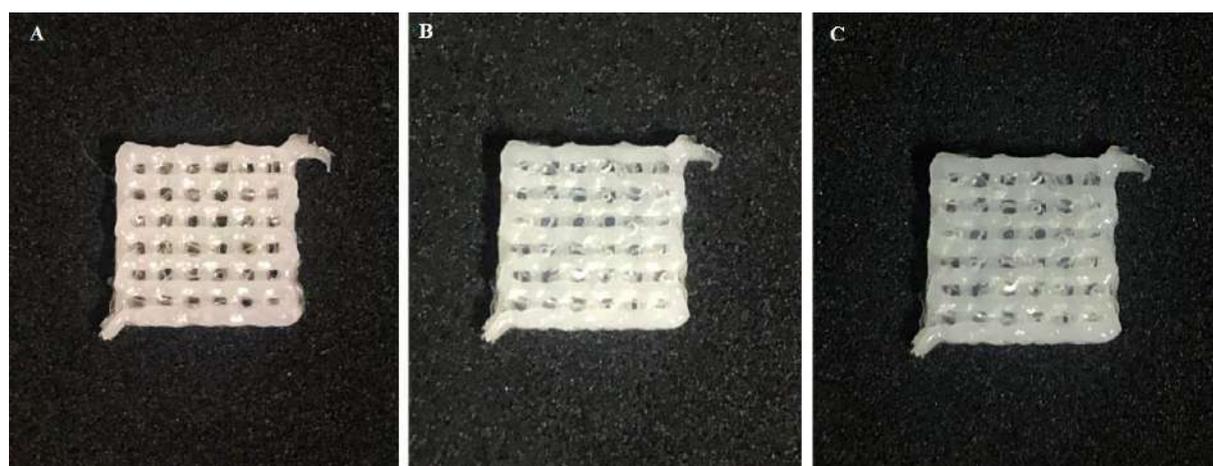


Figura 5. 14 Na figura A tem-se o arcabouço seco em dessecador por 24 horas. Na Figura B observa-se o arcabouço após o tempo de 10 minutos em saliva. Na Figura C verifica-se o mesmo arcabouço após 180 minutos no mesmo fluido.

Na Figura 5.15 tem-se o gráfico de grau de absorção em função do tempo decorrido para os primeiros 25 minutos de absorção. Conforme é possível ver, há um grande aumento de massa, caracterizando um alto grau de absorção em todos os três fluidos estudados, e em particular, na água. No primeiro minuto, há uma absorção de fluido de 35% em saliva, 43 % em solução simuladora de fluido corpóreo e 65% em água.

Em 2,5 minutos observa-se o pico de absorção da curva de saliva, em 107%, e após os primeiros dez minutos observa-se uma estabilização da curva, em média de 89% com um desvio padrão de 6%. Na Figura 5.16 há o perfil de absorção durante todo o período de teste e pode-se observar melhor o comportamento global de absorção nos três fluidos.

Ao observar o comportamento da amostra na água, se vê que em 2,5 minutos ainda não houve o pico de absorção, que se dá em 10 minutos, em 162% de absorção. Após isso a porcentagem se mantém, em média, em 142%, com um desvio padrão de 6%. O comportamento

absortivo em tampão, se assemelha com o da água em questão de tempo para atingir o potencial, que também se dá em 10 minutos, atingindo uma média de 101% com um desvio padrão de 5,8%.

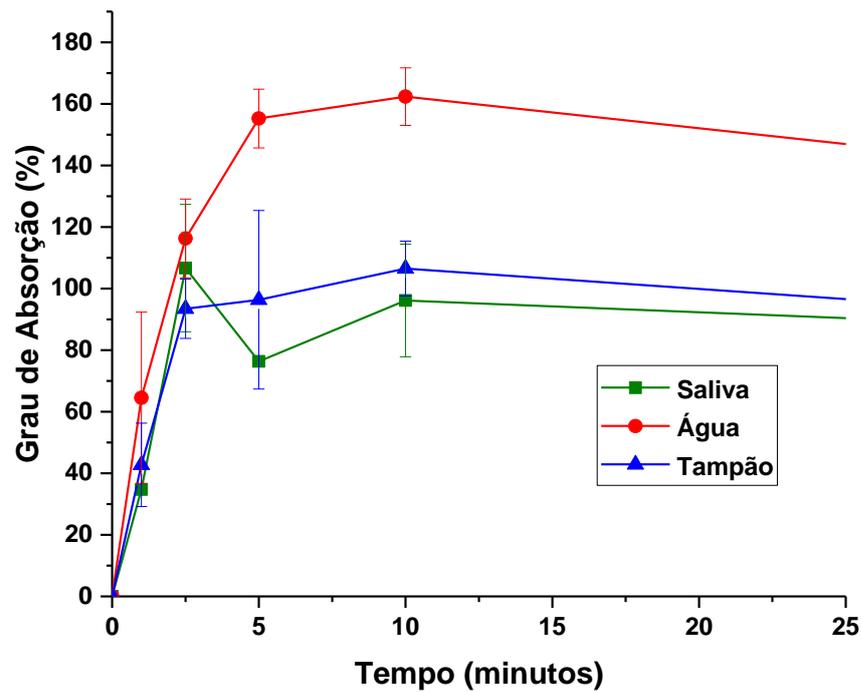


Figura 5. 15 Perfil de absorção dos arcabouços em saliva, água e tampão nos tempos de 0 a 25 minutos.

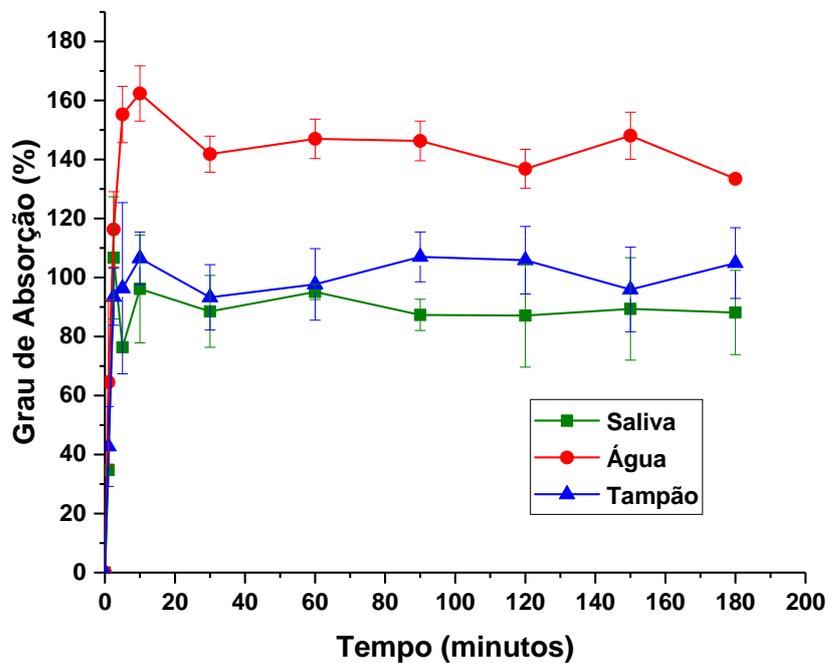


Figura 5. 16 Perfil de absorção dos arcabouços em saliva, água e tampão nos tempos de 0 a 180 minutos.

A amostra possui um bom potencial de absorção, absorvendo mais de 85% de fluidos para todas as soluções avaliadas. O teste também demonstrou que a absorção, após 10 minutos não varia significativamente, estando por volta de 6% de variação. Logo, o arcabouço é capaz de absorver 85%, 142% e 101% de seu peso em saliva, água e solução simuladora de fluido corpóreo, respectivamente. O que demonstra que há potencial absorptivo, e que pode ter um comportamento hemostático.

A saliva artificial, é um fluido muito mais complexo que a água e a solução simuladora de fluido corpóreo, e menos complexo que o plasma sanguíneo. Ao comparar os resultados obtidos com os do estudo anteriormente citado, de BEHRENS et al., 2014, é razoável conjecturar que a absorção em saliva, seria inferior à do tampão e também à da água por questão da interação iônica entre os sais presentes na mesma e pela presença da carboximetilcelulose. Também é possível ver que o potencial hemostático da quitosana é pouco afetado quando ela se liga à gelatina, uma vez que o grau de absorção se manteve em torno de 85% em um meio intermediário entre a água e a solução de soro sanguíneo.

Apesar da literatura afirmar que hidrogéis de quitosana e gelatina são capazes de absorver de 20 a 40 vezes o seu próprio peso (FAN et al., 2016), uma das razões pelas quais o arcabouço produzido absorve menos é a presença de PCL em sua composição. O peso da moldura, muito provavelmente, é o responsável por grande parte do peso percentual da amostra, e ela absorve muito menos que o hidrogel, fazendo com que uma parcela do peso do arcabouço seja praticamente invariável, interferindo na absorção final do hidrogel.

A Figura 5.17 apresenta o espectro por espectroscopia EDS da superfície do hidrogel presente no arcabouço antes da realização dos ensaios de absorção.

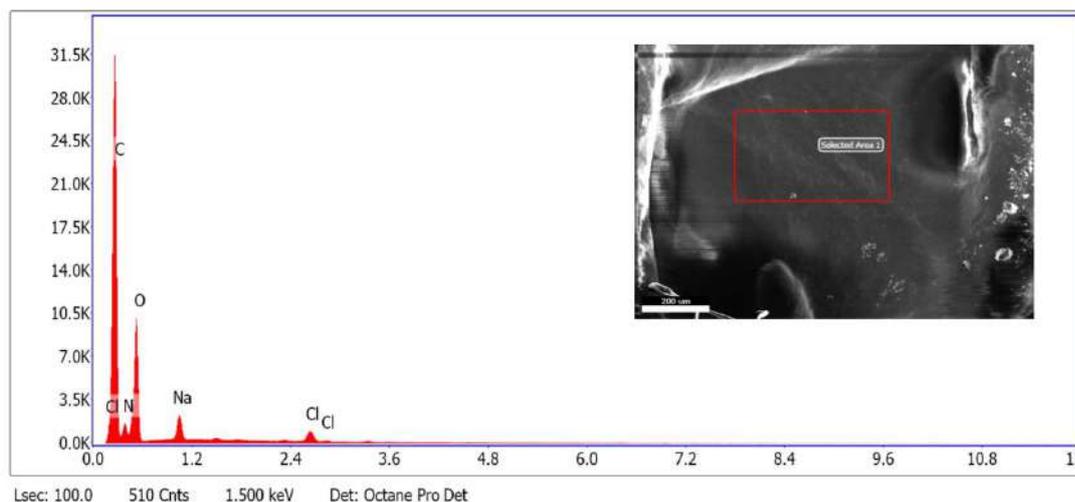


Figura 5. 17 Espectro por EDS da superfície do hidrogel do arcabouço antes do ensaio de absorção.

Na Tabela 4 se apresenta os elementos presentes no hidrogel de gelatina e quitosana. Há uma grande quantidade de carbono, nitrogênio e oxigênio, tanto em peso como em percentual, representando juntos 98,49% dos elementos que compõem a amostra. Isso já era esperado devido às estruturas químicas tanto da quitosana quanto da gelatina (Figuras 3.11 e 3.12) que possuem muitos átomos desses elementos.

Tabela 5 Elementos presentes na análise de EDS, antes dos ensaios de absorção, com seus pesos percentuais, percentual atômico e o erro associado.

ELEMENTO	% PESO	% ATÔMICO
C	46,39	52,81
N	17,76	17,33
O	33,18	28,35
Na	2,21	1,31
Cl	0,46	0,20

No que diz respeito aos átomos de Na e Cl, que representam os outros 1,51% dos átomos da amostra, a solução utilizada para dissolver a gelatina, na produção do hidrogel, possuía NaCl (cloreto de sódio), NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) e K₂CO₃ (carbonato de potássio) e também as alterações de pH foram realizadas com soluções diluídas de HCl (ácido clorídrico) e NaOH (hidróxido de sódio) que podem ter contribuído para o aumento das concentrações finais desses elementos .

Na Figura 5.18 se apresenta o espectro por EDS da superfície do hidrogel após 3 horas do ensaio de absorção em saliva e na Tabela 3 estão apresentados os valores percentuais de peso, percentual atômico e o erro associado, no qual é possível ver, além dos elementos descritos anteriormente na Tabela 2, a presença K, e um notável aumento no peso percentual de Na e Cl. Pressupõe-se que o hidrogel tenha absorvido esses íons presentes livremente na saliva e, conseqüentemente, aumentado seus pesos percentuais e percentuais atômicos na amostra, após 3 horas de contato direto com esse meio rico em sais de K, Na e Cl.

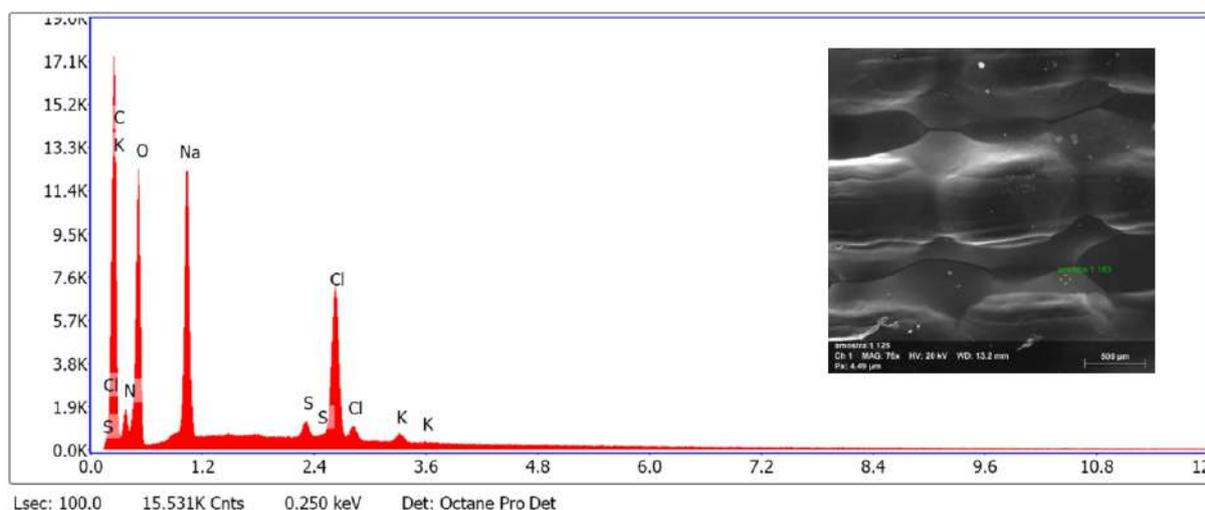


Figura 5. 18 Espectro por EDS da superfície do hidrogel do arcabouço depois de 3 horas do ensaio de absorção em saliva.

Tabela 6 Elementos presentes na análise de EDS com seus pesos percentuais, percentual atômico e o erro associado após o ensaio de absorção de 3 horas em saliva.

ELEMENTO	% PESO	% ATOMICO
C	38,92	47,34
N	14,58	15,21
O	31,93	29,16
Na	10,21	6,49
Cl	3,67	2,51
K	0,28	0,10

Analisando a Tabela 6, nota-se que há um aumento significativo no percentual atômico de sódio na saliva e no tampão. Como ambos são ricos em íons sódio, é provável que esses íons tenham sido absorvidos pelo hidrogel no processo de absorção de fluido, conforme é característico da quitosana. Sua estrutura química rica em $-NH_2$ e $-OH$ é capaz de quelar íons fornecendo alta capacidade de adsorção e seletividade (KANDILE; NASR, 2009). No entanto, na água, foi observado o comportamento inverso, o que leva a crer que em meios menos ricos em sais, ou com uma porcentagem inferior à sua, a amostra libera os íons presentes em si para o ambiente, da mesma forma que acontece em um processo osmótico.

No caso dos íons cloro, houve aumentos em todos os fluidos estudados. Para o potássio houve aumento apenas na saliva, o que pode ser explicado pela grande quantidade desse elemento em sua composição. Não foi observado alumínio, o que já era esperado, pois não houve degradação da amostra (os íons alumínio aparecem quando é selecionada a superfície

do arcabouço e há algum local com degradação, aparecendo o fundo do porta amostra) e os íons flúor somente aparecem em água, devido a fluoretação do abastecimento.

Esse resultado corrobora com o teste de degradação em saliva, que demonstra que até a primeira semana, há um aumento de peso do arcabouço. Isso pode ser explicado por esta análise, que demonstra que houve aumento de peso percentual e de percentual atômico nos sais de Na, K e Cl, logo, o aumento massa constatado na primeira semana de degradação em saliva provavelmente, se deve à absorção dos sais presentes no meio, já que hidrogéis de quitosana também são utilizados como matriz de absorção de íons metálicos (KANDILE; NASR, 2009).

5.6 Teste de desidratação

Os perfis de desidratação podem ser vistos na Figura 5.19 que ilustra um gráfico com a taxa de desidratação em função do tempo. De acordo com a figura, ambos os métodos resultam em um processo de desidratação eficaz, e rápido, capazes de realizar a total desidratação do material entre 25 e 30 minutos. A princípio, nos primeiros minutos, o método de desidratação em sílica é mais rápido que a estufa, no entanto, após os 5 primeiros minutos há inversão nesse comportamento. A partir de então, a estufa se mostra mais rápida em alcançar a massa constante, realizando isso 5 minutos antes da sílica. Ao comparar a desidratação com a absorção, se nota que o material é capaz de se hidratar muito rapidamente, e também é capaz de se desidratar com rapidez semelhante, no entanto o potencial hidrofílico ainda supera a taxa de desidratação tanto em rapidez quanto em percentual.

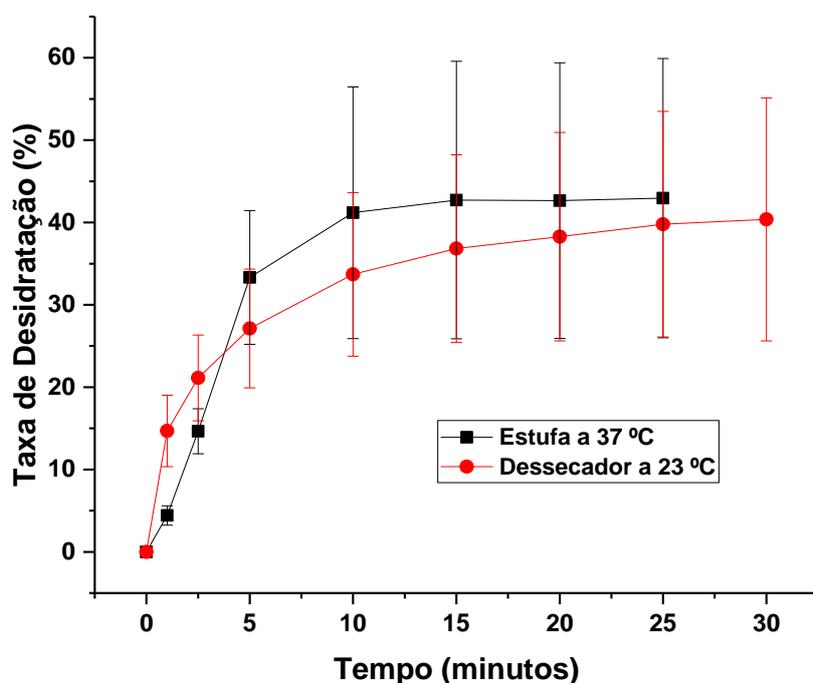


Figura 5. 19 Perfil de desidratação dos arcabouços em sílica e em estufa, a 37 °C no período de 0 a 30 minutos.

5.7 Ensaios biológicos *in vitro*

a) MTT

O ensaio MTT se baseia na medida do dano induzido pelo material ao metabolismo celular de glicídeos através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e, por fim, a viabilidade celular é quantificada a partir da redução do MTT (coloração amarela solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) pela atividade dessas enzimas. Logo, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. A partir disso também é possível presumir o metabolismo celular.

Na Tabela 7 estão apresentados os valores médios de concentração celular de acordo com absorbâncias obtida e na Tabela 8 estão os valores percentuais de viabilidade celular.

Tabela 7 Concentração celular média por amostra.

	Absorbância (nm)		Concentração celular (n° de células)	
	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão
Arcabouços	0,184	0,040	8932,039	1946,192
Controle Celular	0,412	0,013	20000	617,86

Tabela 8 Porcentagem média de viabilidade celular.

	Controle celular		Arcabouços	
	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão
Porcentagem	100%	3,09%	44,66%	9,73%

Apesar da porcentagem média da viabilidade celular ter sido baixa, o material não é considerado tóxico, pois, de acordo com a literatura, o PCL é um polímero amplamente utilizado em estudos e é considerado bastante biocompatível (KANDILE; NASR, 2009, VIJAYAVENKATARAMAN et al., 2019, KUNDU et al., 2013, ZHANG et al., 2017, KIM et al., 2016) assim como a quitosana, que é muito utilizada em regeneração de pele (FAN et al., 2016; MAO et al., 2003; YIN et al., 2005; RUFATO et al., 2018) e também como a gelatina (FAN et al., 2016; QIAO et al., 2017; DECLERCQ et al., 2014).

Como pode ser observado na Figura 5.20 há um acúmulo de formazan em algumas regiões do arcabouço, e uma leve modificação na coloração da amostra, que de branca, assumiu um tom violeta. A partir dessa figura pode-se notar que nem todo formazan produzido foi lido pelo equipamento, e que, provavelmente, somente as concentrações de sais que se encontravam nas regiões mais superficiais do arcabouço foram capazes de se soltar do hidrogel e ir para o sobrenadante. Portanto, somente as células que estavam em regiões mais superficiais foram contadas durante a análise. Conjectura-se que houve uma migração celular para o interior do arcabouço, e que o formazan lá produzido ficou retido no interior do mesmo impassível de ser contabilizado pela técnica empregada.

Isso demonstra que o ensaio por MTT, tradicionalmente, não é adequado para realizar ensaios citotóxicos em arcabouços como os do presente estudo, pois não são capazes de abranger o interior da amostra, produzindo resultados que não são compatíveis com a natureza do material.

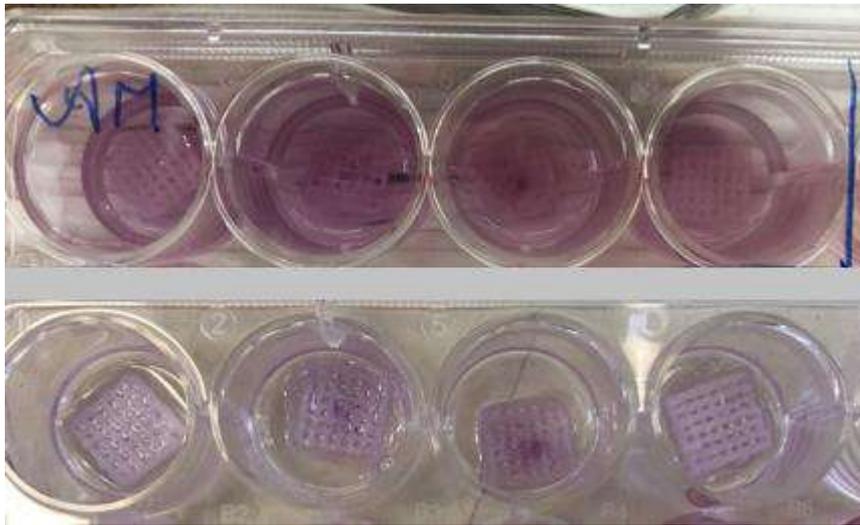


Figura 5. 20 Na imagem acima observa-se os arcabouços imediatamente após a reação com o DMOS. Na imagem abaixo observa-se os arcabouços após a retirada do sobrenadante.

Na Figura 5.21 há uma micrografia feita após o teste do MTT no qual mostra que as células ficaram aderidas ao material.

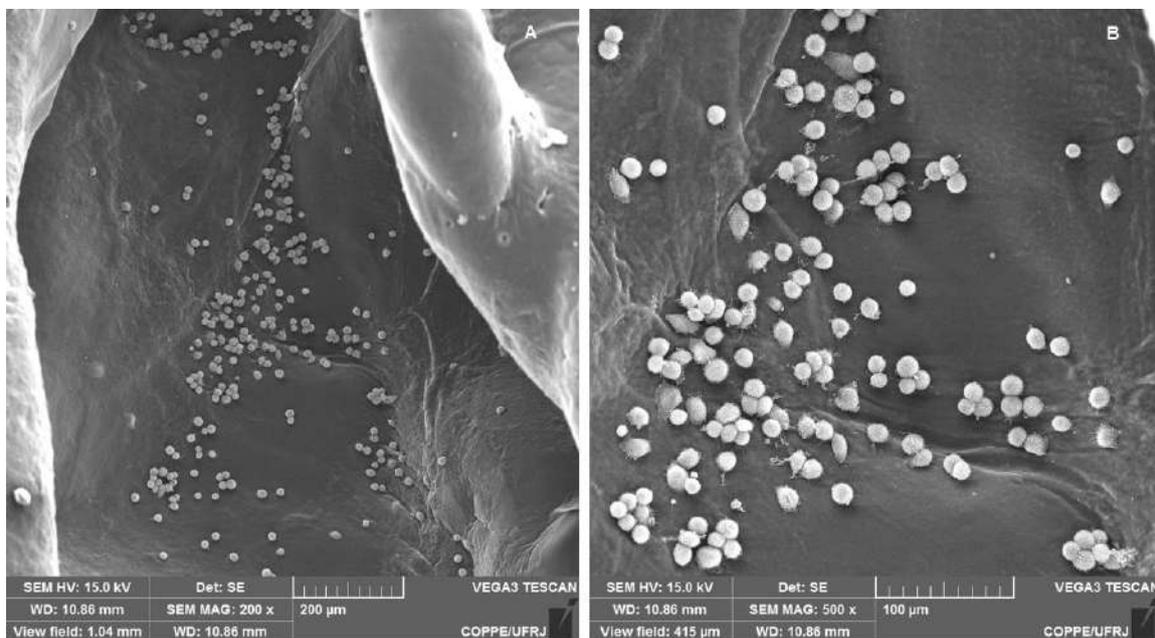


Figura 5. 21 Micrografia das amostras após o teste de MTT. Na figura A mostra as células aderidas ao material mesmo após o teste. Na Figura B se vê a mesma região, em um aumento maior.

Nessa figura se vê que as células, após 24 horas, apresentaram espriamento em alguns pontos, e por essa característica de adesão, conclui-se que as mesmas permaneceram no material.

b) Adesão Celular

As células MG63 são células derivadas de osteosarcoma humano que podem ser utilizadas como modelo para mimetizar osteoblastos imaturos, e por possuírem morfologia e funcionalidade semelhantes a eles, são bem aplicadas em ensaios de adesão celular (AV; HIFUMI; BIOM, 2016).

Na Figura 5.22 há duas micrografias que mostram a distribuição das células pela amostra. Vê-se que elas tiveram preferência pelas áreas cobertas pelo hidrogel, mantendo-se nas regiões centrais do filme. Conforme a literatura mostra, a topografia do ambiente em que as células se encontram é muito importante na sua adesão e migração (ANSELME; PLOUX; PONCHE, 2010). Em decorrência dessa preferência celular por topografias em formato côncavo, conjectura-se que as células tenham migrado e aderido nas áreas centrais do filme por conta da presença desse tipo de topografia nesses locais (PIEUCHOT et al., 2018). Na eletromicrografia A se vê um ponto, marcado pela seta vermelha maior, onde o filme realiza uma dobra, realizando, de fato, a curvatura côncava, e se vê também um aglomerado celular, o que corrobora com o que foi explicado anteriormente.

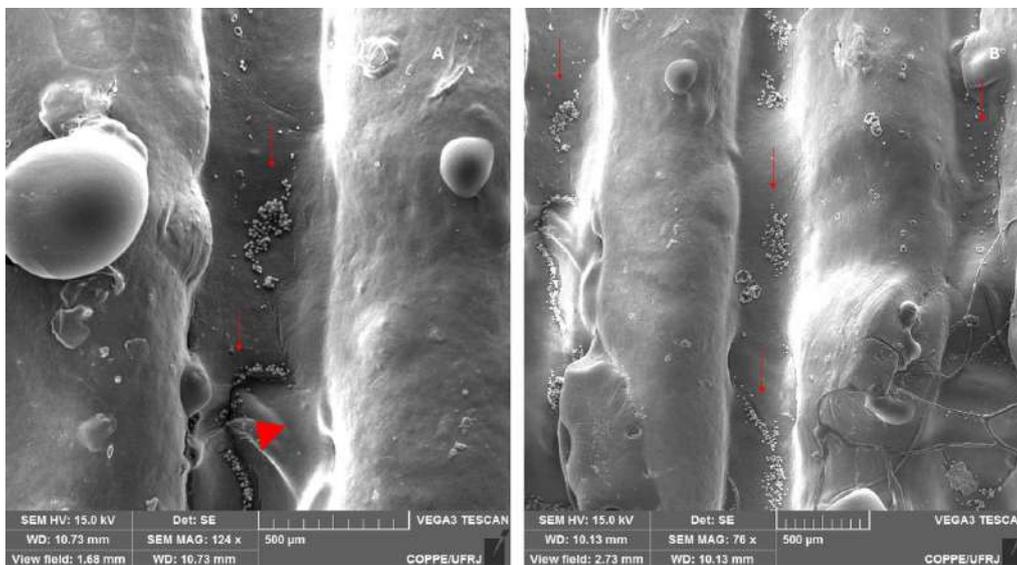


Figura 5. 22 Eletromicrografia do ensaio de adesão celular de 4 horas na figura A e 24 horas na figura B. As setas vermelhas marcam os locais de aglomerados celulares

Na Figura 5.23 há uma micrografia de após cultura de 4 horas, A, e após cultura de 24 horas, B. Na figura A se vê células com formato mais arredondado, com poucos filipódios. Na cultura com 24 horas já é possível observar que já existe espriamento e as células já estão lançando filipódios.

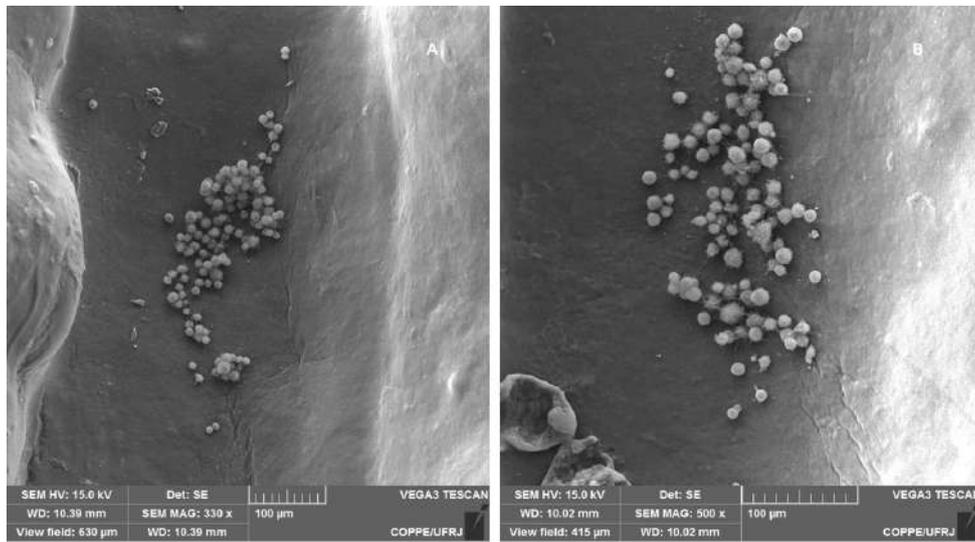


Figura 5. 23 Na figura A se vê uma micrografia de cultura de 4 horas. Na B há uma micrografia de cultura de 24 horas.

Na Figura 5.24 há duas micrografias em maior aumento do ensaio de 4 horas.

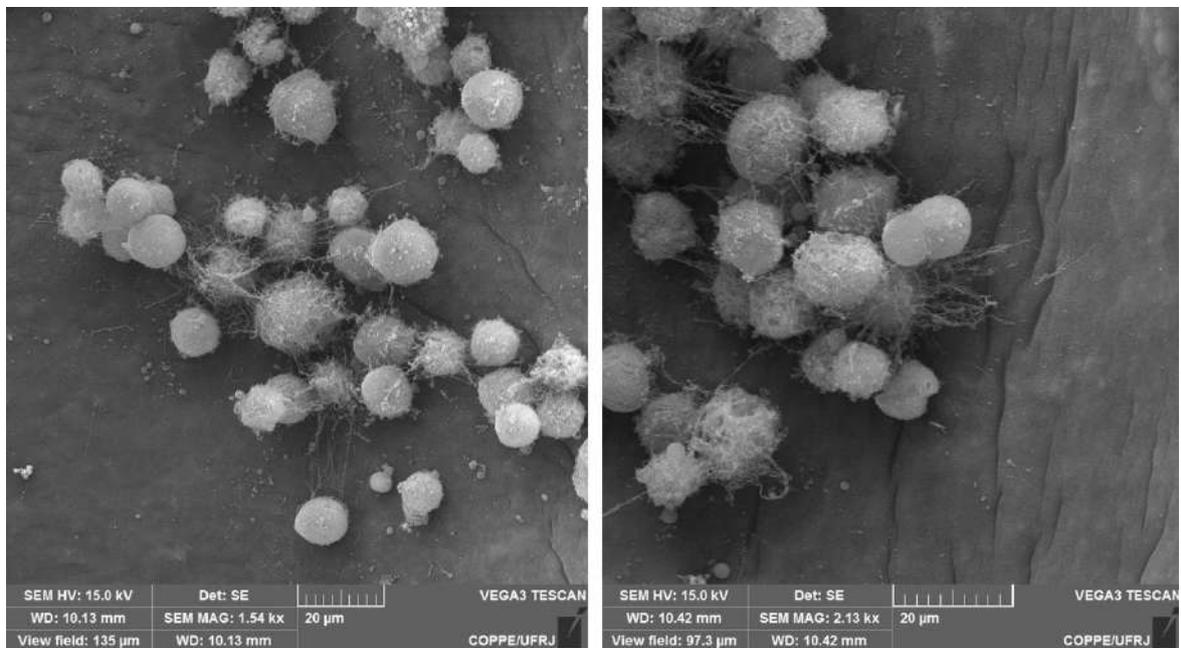


Figura 5. 24 Ensaio celular de 4 horas em maior aumento

Na Figura 5.25 realizou-se um aumento maior para as células de 24 horas de cultura, para avaliar a morfologia, que demonstra espriamento e aparecimento de filipódios.

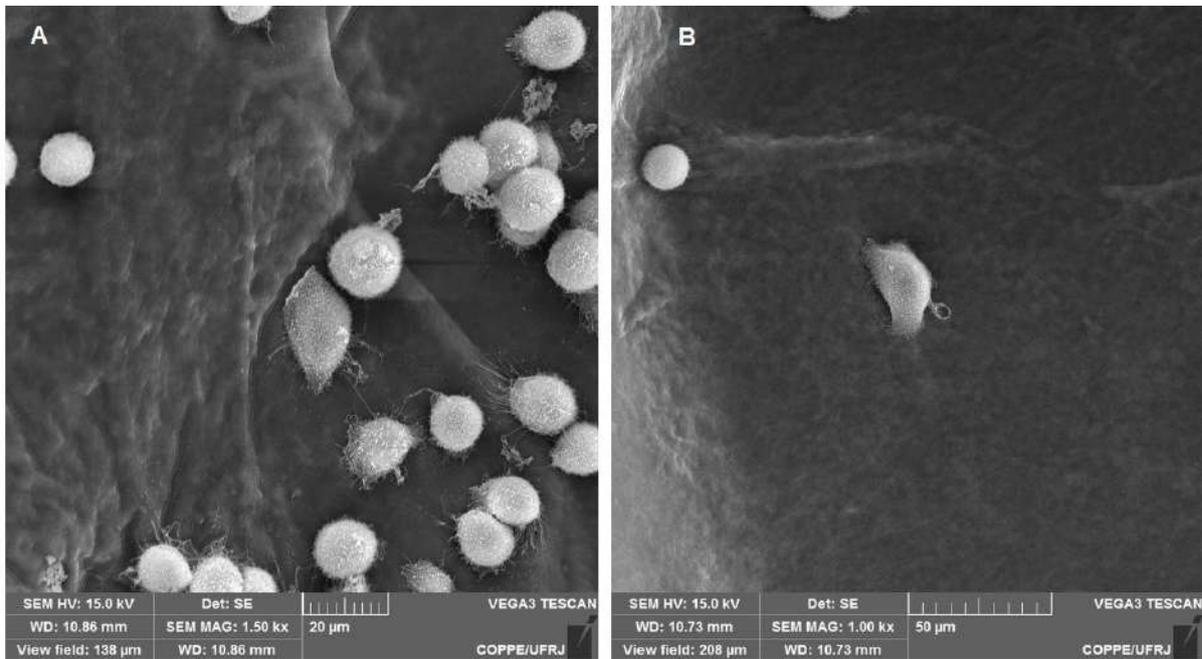


Figura 5. 25 Micrografia das células após cultura de 24 horas. Na figura A vê-se células arredondadas, algumas secretando matriz, e outras iniciando o espraiamento. Na figura B se observa uma célula já espraiada

V- CONCLUSÃO

O teste de velocidade x fator de extrusão permitiu concluir que velocidades menores são menos sensíveis à variações de fatores de extrusão, enquanto velocidades maiores são mais propensas a grandes variações na quantidade de gel depositado para a bioimpressora analisada. Também se conclui que velocidades maiores são capazes de imprimir filamentos mais delgados em comparação com velocidades menores. Para o presente estudo, a velocidade de 5 mm/s¹ demonstrou ser a mais adequada para a impressão do hidrogel de quitosana-gelatina.

Ao notar o resultado do teste de degradação *in vitro* e do ensaio de absorção, vê-se que provavelmente o grupo controle com saliva do ensaio de degradação absorveu e manteve os sais presentes na saliva em sua superfície antes de degradar. Essa hipótese é reforçada ao observar os resultados de EDS, que demonstram um aumento de massa de Na, K e Cl. Logo, conclui-se que o arcabouço é capaz de absorver e adsorver sais em sua superfície até o momento de sua degradação e que meios mais ricos em sais tendem a aumentar o tempo de vida do hidrogel presente no arcabouço.

Houve interação química entre a quitosana e a gelatina, formando um complexo coacervado. É possível concluir também que a associação com a gelatina não anula o potencial hemostático da quitosana, uma vez que a gelatina também é hidrofílica e o arcabouço é capaz de absorver rapidamente a água do meio. O arcabouço produzido possui um bom potencial hemostático, sendo capaz também de captar os íons presentes no meio.

Foi possível produzir, por meio de um arcabouço híbrido, uma alternativa provavelmente mais barata ao uso da GelMA, que demonstra um bom potencial para regeneração óssea, já que a análise de adesão demonstrou interação celular e a presença de células espreiadas em tempos de 24 horas.

VI- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolvimento de método para avaliar a citotoxicidade em arcabouços que possuam hidrogel em sua composição, que seja compatível com a natureza do material, uma vez que o ensaio de MTT não respondeu conforme o esperado;
- Acréscimo de células à composição da tinta de biomaterial aqui abordada, transformando-a em uma biotinta;
- Avaliação da proporção quitosana-gelatina buscando otimizar as propriedades de bioprintabilidade associada com a biocompatibilidade;
- Acréscimo de fatores de crescimento;
- Estudos *in vitro* buscando tempos maiores de cultura celular para observar a biomineralização sobre o material, possibilitando realizar a caracterização da matriz produzida.
- Como o material demonstrou potencial para liberação e captação de íons, realizar estudos de liberação controlada de biomoléculas seria uma alternativa interessante.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELME, K.; PLOUX, L.; PONCHE, A. Cell/material interfaces: Influence of surface chemistry and surface topography on cell adhesion. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 24, n. 5, p. 831–852, 2010.

AOUADA, F. A. et al. Optical and morphological characterization of polyacrylamide hydrogel and liquid crystal systems. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 9, p. 2134–2141, 2005.

ATALA, A. et al. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. **Lancet**, v. 367, n. 9518, p. 1241–1246, 2006.

AV, N.; HIFUMI, S.; BIOM, E. Poliméricas Recobertas Com Gelatina. p. 1–6, 2016.

BAE, K. H.; WANG, L. S.; KURISAWA, M. Injectable biodegradable hydrogels: Progress and challenges. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 40, p. 5371–5388, 2013.

BALA, Y. et al. Pore network microarchitecture influences human cortical bone elasticity during growth and aging. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 63, p. 164–173, 2016.

BALL, A. N. et al. The challenges of promoting osteogenesis in segmental bone defects and osteoporosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 6, p. 1559–1572, 2018.

BARBUCCI, R.; LEONE, G.; BARBUCCI, R. Polysaccharide Based Hydrogels for Biomedical Applications. **Hydrogels**, p. 25–41, 2009.

BEHRENS, A. M. et al. Blood-aggregating hydrogel particles for use as a hemostatic agent. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 701–708, 2014.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, n. 1, p. 403–430, 2011.

BIANCO, P. Stem cells and bone: A historical perspective. **Bone**, v. 70, p. 2–9, 2015.

BILLINGHAM, R. E.; MEDAWAR, P. B. The Freezing, Drying and Storage of Mammalian Skin. **Journal of Experimental Biology**, v. 29, n. 3, p. 454–468, 1952.

BOSE, S. et al. Additive manufacturing of biomaterials. **Progress in Materials Science**, v. 93, p. 45–111, 2018.

BRITTBURG, M. et al. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 889–895, 1994.

BULCKE, A. I. VAN DEN et al. Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. p. 31–38, 2000.

CHARDACK, W. M. et al. Experimental studies on synthetic substitutes for skin and their use in the treatment of burns. **Annals of surgery**, v. 155, p. 127–139, 1962.

CHENG, M. et al. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2871–2880, 2003.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 3 Suppl 3, p. 131–139, 2008.

COSTA SILVA, H. S. R.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776–785, 2006.

CUI, L. et al. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 31–38, 2014.

DAVEY, R. A.; FINDLAY, D. M. Calcitonin: Physiology or fantasy? **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 5, p. 973–979, 2013.

DECLERCQ, H. A. et al. The role of scaffold architecture and composition on the bone formation by adipose-derived stem cells. **Tissue Engineering - Part A**, v. 20, n. 1–2, p. 434–444, 2014.

DEMITRI, C. et al. Potential of Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels as Water Reservoir in Agriculture. v. 2013, 2013.

DERAKHSHANFAR, S. et al. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 2, p. 144–156, 2018.

- DEVI, N. et al. Gelatin and Gelatin–Polyelectrolyte Complexes: Drug Delivery. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials**, n. June 2018, p. 3557–3569, 2016.
- DOHERTY, A. H.; GHALAMBOR, C. K.; DONAHUE, S. W. Evolutionary physiology of bone: Bone metabolism in changing environments. **Physiology**, v. 30, n. 1, p. 17–29, 2015.
- EVEN-RAM, S.; ARTYM, V.; YAMADA, K. M. Matrix Control of Stem Cell Fate. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 645–647, 2006.
- FAN, L. et al. Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 427–434, 2016.
- FEDOROVICH, N. E. et al. Organ printing: The future of bone regeneration? **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 12, p. 601–606, 2011.
- FEDOROVICH, N. E. et al. Biofabrication of osteochondral tissue equivalents by printing topologically defined, cell-laden hydrogel scaffolds. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 18, n. 1, p. 33–44, 2012.
- FIGUEROA-PIZANO, M. D. et al. Effect of freeze-thawing conditions for preparation of chitosan-poly (vinyl alcohol) hydrogels and drug release studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 476–485, 2018.
- FLORES-HERNÁNDEZ, C. G. et al. Chitosan–Starch–Keratin Composites: Improving Thermo-Mechanical and Degradation Properties Through Chemical Modification. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 5, p. 2182–2191, 2018.
- GOUGH, J. E.; SCOTCHFORD, C. A.; DOWNES, S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 1, p. 121–130, 2002.
- GRABOWSKI, P. Physiology of Bone. **Endocrine Development**, v. 28, p. 33–55, 2015.
- GREEN, H.; KEHINDE, O.; THOMAS, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 11, p. 5665–5668, 1979.
- GROLL, J. et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, v. 11, n. 1, 2019.

GUNGOR-OZKERIM, P. S. et al. Bioinks for 3D bioprinting: An overview. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 5, p. 915–946, 2018.

HAUGE, E. M. et al. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. **J Bone Miner Res**, v. 16, n. 9, p. 1575– 1582., 2001.

HEO, D. N. et al. Enhanced bone tissue regeneration using a 3D printed microstructure incorporated with a hybrid nano hydrogel. **Nanoscale**, v. 9, n. 16, p. 5055–5062, 2017.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. v. 54, p. 3–12, 2002.

HÖLZL, K. et al. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, 2016.

HUBACEK, J. et al. Tissue reaction after implantation and in situ polymerization of hydrophilic gel. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 1, n. 4, p. 387–394, 1967.

IBRAHIM, M. et al. Molecular spectroscopic analyses of gelatin. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 81, n. 1, p. 724–729, 2011.

IRWANDI, J. et al. Extraction and characterization of gelatin from different marine fish species in Malaysia. **International Food Research Journal**, v. 16, n. 3, p. 381–389, 2009.

JEJURIKAR, A. et al. Degradable alginate hydrogels crosslinked by the macromolecular crosslinker alginate dialdehyde. **Journal of materials chemistry**, v. 22, p. 9751–9758, 2012.

JI, S.; GUVENDIREN, M. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. APR, p. 1–8, 2017.

KANDILE, N. G.; NASR, A. S. Environment friendly modified chitosan hydrogels as a matrix for adsorption of metal ions, synthesis and characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 4, p. 753–759, 2009.

KANG, H. et al. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 3, p. 312–319, 2016.

KIM, B. S. et al. Three-dimensional bioprinting of cell-laden constructs with polycaprolactone protective layers for using various thermoplastic polymers. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, p. 1–14, 2016.

KLOTZ, B. J. et al. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels : Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. **Trends in Biotechnology**, v. xx, p. 1–14, 2016.

KUNDU, J. et al. An additive manufacturing-based PCL–alginate–chondrocyte bioprinted scaffold for cartilage tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 11, p. 1286–1297, 2013.

KYLE, S. et al. ‘Printability’ of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art’. **Advanced Healthcare Materials**, v. 6, n. 16, p. 1–16, 2017.

LAWRIE, G. et al. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2533–2541, 2007.

LEE, J. W. et al. Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering. **Biofabrication**, v. 8, n. 1, p. 15007, 2016.

LEE, V. et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 20, n. 6, p. 473–484, 2014.

LONČAREVIĆ, A.; IVANKOVIĆ, M.; ROGINA, A. Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterisation of Degraded Chitosan Scaffolds. **JOURNAL OF TISSUE REPAIR AND REGENERATION**, v. 1, n. 1, p. 12–22, 2017.

MACCHIARINI, P. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **The Lancet**, v. 372, n. 9655, p. 2023–2030, 2008.

MALDA, J. et al. Engineering hydrogels for biofabrication. **Advanced Materials**, v. 25, n. 36, p. 5011–5028, 2013.

MAO, J. et al. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 64, n. 2, p. 301–308, 2003.

MCBETH, C. et al. 3D bioprinting of GelMA scaffolds triggers mineral deposition by primary human osteoblasts. **Biofabrication**, v. 9, n. 1, 2017.

MOHAMED, O. A.; MASOOD, S. H.; BHOWMIK, J. L. Optimization of fused deposition modeling process parameters: a review of current research and future prospects. **Advances in Manufacturing**, v. 3, n. 1, p. 42–53, 2015.

MOREIRA TEIXEIRA, L. S. et al. Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1281–1290, 2012.

MORONI, L. et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 384–402, 2018.

NG, W. L.; YEONG, W. Y.; NAING, M. W. Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. **International Journal of Bioprinting**, v. 2, n. 1, p. 53–62, 2016.

OLIVEIRA, R. N. et al. Mechanical properties and in vitro characterization of polyvinyl alcoholnano- silver hydrogel wound dressings. **Interface Focus**, v. 4, n. 1, 2014.

OZAWA, H.; HOSHI, K.; AMIZUKA, N. Current Concepts of Bone Biomineralization. **Journal of Oral Biosciences**, v. 50, n. 1, p. 1–14, 2008.

PIEUCHOT, L. et al. Curvotaxis directs cell migration through cell-scale curvature landscapes. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. **Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures**, 1949.

QIAO, C. et al. Molecular interactions in gelatin/chitosan composite films. **Food Chemistry**, v. 235, p. 45–50, 2017.

QUERIDO, W. et al. Ultrastructural and mineral phase characterization of the bone-like matrix assembled in F-OST osteoblast cultures. **Calcified Tissue International**, v. 89, n. 5, p. 358–371, 2011.

RAGHUNATH, M. et al. TEDD Annual Meeting with 3D Bioprinting Workshop. **Chimia**, v. 72, n. 1, p. 76–79, 2018.

RAHMAN, A.; MUBARAK, A. K.; TAREQ, S. M. Preparation and Characterization of Polyethylene Oxide (PEO)/Gelatin Blend for Biomedical Application: Effect of Gamma Radiation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 117, n. 4, p. 2075–2082, 2010.

RAMBHIA, K. J.; MA, P. X. **Biomineralization and Bone Regeneration**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

RHEINWATD, J. G.; GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation keratinizin colonies from single cell is. **Cell**, v. 6, n. 3, p. 331–343, 1975.

RIYAJAN, S. A.; NUIM, J. Interaction of green polymer blend of modified sodium alginate

and carboxymethyl cellulose encapsulation of turmeric extract. **International Journal of Polymer Science**, v. 2013, 2013.

ROBBINS, S.; LAURYSSSEN, C.; SONGER, M. N. Use of Nanocrystalline Hydroxyapatite with Autologous BMA and Local Bone in the Lumbar Spine: A Retrospective CT Analysis of Posterolateral Fusion Results. **Clinical Spine Surgery**, v. 30, n. 3, p. E192–E197, 2017.

ROUS, P. An experimental comparison of transplanted tumor and transplanted normal tissue capable of growth. **Journal of Experimental Medicine**, v. 12, n. 3, p. 344–366, 1910.

RUFATO, K. B. et al. Hydrogels Based on Chitosan and Chitosan Derivatives for Biomedical Applications. **IntechOpen**, p. 1–40, 2018.

SANNINO, A.; DEMITRI, C.; MADAGHIELE, M. Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. p. 353–373, 2009.

SANTOS, S. V.; MOURA, T. F. A. L.; RAFFIN, F. N. Spray drying parameters optimization for chitosan microparticles as insulin carrier. n. October 2003, 2016.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 205, p. 299–308, 1986.

TARE, R. S. et al. Isolation, Differentiation, and Characterisation of Skeletal Stem Cells from Human Bone Marrow In Vitro and In Vivo. **Bone Research Protocols**, v. 816, p. 83–99, 2011.

TEIXEIRA, B. N. et al. Evaluation of bone marrow stem cell response to PLA scaffolds manufactured by 3D printing and coated with polydopamine and type I collagen. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 107, n. 1, p. 37–49, 2018.

VACANTI, J. P. et al. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 23, n. 1, p. 3–9, 1988.

VERBORGT, O. et al. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: Complementary roles in bone remodeling regulation? **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 5, p. 907–914, 2002.

VIJAYAVENKATARAMAN, S. et al. Conductive Collagen/PPy-b-PCL hydrogel for

bioprinting of neural tissue constructs. **International Journal of Bioprinting**, v. 5, n. 2.1, 2019.

WEBSTER, J. P. Refrigerated skin grafts.pdf. **Annals of Surgery**, v. 120 (4), p. 431–449, 1944.

WILLIAMS, D. et al. A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D bioprinting. **Bioprinting**, v. 9, n. February, p. 19–36, 2018.

WOOD, K. J. et al. **81 - Concepts and Challenges in Organ Transplantation: Rejection, Immunosuppression, and Tolerance**. Fifth Edit ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018.

YANNAS, I. V. et al. Wound tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. **Science**, v. 215, n. 4529, p. 174–176, 1982.

YIN, Y. et al. A preliminary study on chitosan/gelatin polyelectrolyte complex formation. **Journal of Materials Science**, v. 40, n. 17, p. 4649–4652, 2005.

YIN, Y. J. et al. Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. **Polymer International**, v. 48, n. 6, p. 429–432, 1999.

YING, G. L. et al. Aqueous Two-Phase Emulsion Bioink-Enabled 3D Bioprinting of Porous Hydrogels. **Advanced Materials**, v. 30, n. 50, p. 1–9, 2018.

ZHANG, B. et al. High-resolution 3D Bioprinting System for Fabricating Cell-laden Hydrogel Scaffolds with High Cellular Activities. **Procedia CIRP**, v. 65, p. 219–224, 2017a.

ZHANG, K. et al. 3D bioprinting of urethra with PCL/PLCL blend and dual autologous cells in fibrin hydrogel: An in vitro evaluation of biomimetic mechanical property and cell growth environment. **Acta Biomaterialia**, v. 50, p. 154–164, 2017b.