



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

MARIANA HARUE TANIGUCHI NAGAHARA

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS CONSTITUÍDOS DE
POLISSACARÍDEOS PARA A OBTENÇÃO DE ESTRUTURAS
CONDRAIS POR MANUFATURA ADITIVA**

CAMPINAS
2019

MARIANA HARUE TANIGUCHI NAGAHARA

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS CONSTITUÍDOS DE
POLISSACARÍDEOS PARA A OBTENÇÃO DE ESTRUTURAS
CONDRAIS POR MANUFATURA ADITIVA**

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Mestra em
Engenharia Química.

***Orientadora:* PROF^A DRA. ÂNGELA MARIA MORAES**

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA MARIANA
HARUE TANIGUCHI NAGAHARA, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
ÂNGELA MARIA MORAES.

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

M270d Nagahara, Mariana Harue Taniguchi, 1991-
Desenvolvimento de hidrogéis constituídos de polissacarídeos para a
obtenção de estruturas condrais por manufatura aditiva / Mariana Harue
Taniguchi Nagahara. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ângela Maria Moraes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Engenharia Química.

1. Hidrogel. 2. Polissacarídeos. 3. Estrôncio. I. Moraes, Ângela Maria,
1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of polysaccharide hydrogels for additive
manufacturing of chondral structures

Palavras-chave em inglês:

Hydrogel

Polysaccharides

Strontium

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Ângela Maria Moraes [Orientador]

Jorge Vicente Lopes da Silva

Carolina Caliári Oliveira

Data de defesa: 01-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7894-8916>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7000243322387322>

Folha de Aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado defendida por Mariana Harue Taniguchi Nagahara aprovada em 01 de agosto de 2019 pela banca examinadora constituída pelos seguintes doutores:

Profa. Dra. Ângela Maria Moraes (Orientadora)
FEQ / UNICAMP

Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva
Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer

Dra. Carolina Caliarí Oliveira
IN SITU TERAPIA CELULAR

ATA da Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.”

Marie Skłodowska-Curie

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a minha família, que sempre será meu porto seguro. Aos meus pais Ossamu e Rosana pela vida, pela formação educacional e pelos valores. Se sou alguém hoje é por causa e por vocês. Aos meus irmãos Rafael e Tifani por terem, também, contribuído para a minha formação como pessoa, por abrirem caminhos para mim e por servirem de exemplos, como irmãos mais velhos. À minha sobrinha, Sofia, pela leveza e alegria que uma criança trás e pela motivação na eterna caminhada para me tornar um ser humano melhor. Ao Igor e à Bárbara por terem complementado nossa família.

Aos meus amigos Mariana, Samuel, Camila, Ana Luiza, Ana Cláudia, Júlia, Luciane, Becker, Maurício, Mateus, Ana Elisa e Carol pela amizade e por saber que posso contar com vocês sempre.

Aos amigos do LEBC, LIMBIO e LEBP, Monize, Paula, Rafael Azoubel, Ciça, Ana, Renata, Camila Fonseca, Mateus, Rafael Maza, Camila Marcuz, Igor, Cristiane, Rafael Matsumoto, Luisa, Helberth, Marina e Juliano, pela convivência, pelos momentos de descontração e pela amizade, não poderia ter desejado melhor laboratório. Em especial à Monize, à Paula e ao Rafael pelo apoio nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, Prof. Dra. Ângela Maria Moraes, pela orientação e dedicação, pela paciência que teve comigo nesses últimos dois anos, por tudo que fez por mim e por ser uma inspiração profissional.

Ao Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva e Paulo Inforçatti Neto pelas contribuições que fizeram ao longo deste trabalho. Em especial ao Paulo pelo auxílio na operação da Fab@CTI e por todo o conhecimento compartilhado.

Aos professores Dr. Everson Alves Mirando e Dra. Sonia Maria Alves Bueno pelo compartilhamento de espaço e pelo uso das dependências dos seus laboratórios.

Ao Prof. Dr. Edvaldo Sabadini pela utilização do reômetro e aos seus alunos Manazael, Matheus e Renato pelo treinamento na operação do equipamento.

Às empresas Suzano Papel e Celulose, DuPont Danisco e CP Kelco pela doação de amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer, em especial ao Núcleo de Tecnologias Tridimensionais, pela parceria para utilização de suas instalações e aos seus funcionários que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento da etapa de impressão deste trabalho.

À UNICAMP, à FEQ e ao LRAC pelo uso das instalações e a todos os professores e funcionários que, de alguma forma, contribuíram e permitiram a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual também agradeço pelo apoio.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar este trabalho, por meio do projeto de número 430860/2018-8.

RESUMO

A cartilagem articular é um tecido conectivo responsável pela lubrificação e suporte de cargas mecânicas nas articulações, sujeito a sofrer lesões e gerar defeitos em sua estrutura. Porém, sua capacidade de reparo e regeneração é limitada. Como alternativa aos tratamentos convencionais, tem sido estudada a engenharia tecidual, a qual ofereceria uma solução mais definitiva para o problema, através da utilização de estruturas tridimensionais contendo células e fatores para promoção do crescimento celular. Essas estruturas podem ser produzidas por manufatura aditiva utilizando a estratégia de extrusão. Para isso pode-se utilizar polissacarídeos, como o alginato, que é capaz de reticular ionicamente, a nanocelulose e a goma xantana, que apresentam comportamento pseudoplástico mais significativo. Desta forma, teve-se por objetivo o estudo de hidrogéis contendo de 0,9 à 2% (m/v) de alginato (A-SF ou A-HF, correspondentes aos diferentes alginatos utilizados, Protanal SF 120 RB e HF 120 RB, respectivamente), 2,1% (m/v) de nanocelulose (C) e entre 0,8 e 2,5% (m/v) de goma xantana (X), visando a produção de estruturas condrais por impressão 3D. Não foi possível dispersar de forma eficiente a nanocelulose, porém utilizando-se alginato e xantana pôde-se produzir géis com propriedades reológicas promissoras para impressão, sendo que o aumento da concentração de xantana melhorou estas características. Na etapa de impressão, o hidrogel mais promissor continha 1% (m/v) de alginato e 2,5% (m/v) de xantana (A-SF_{1,0}X_{2,5}). Pelo uso da formulação A-SF_{1,0}X_{2,5}, mesmo quando esterilizada por calor úmido (A-HF_{1,0}X_{2,5}), foi possível obter estruturas com múltiplas camadas estáveis. Considerando-se sua aplicação como biotinta reticulável ionicamente, estudou-se ainda a reticulação do material estéril em diferentes condições de tempo de exposição a soluções com distintas concentrações de SrCl₂, assim como a toxicidade decorrente das condições de reticulação a células-tronco mesenquimais de polpa dentária. As condições de reticulação observadas como as mais apropriadas foram as que empregaram uma solução a 50 mmol/L de estrôncio e um período de exposição de 10 ou 30 minutos, de acordo com os resultados dos ensaios mecânicos e de citotoxicidade. Em conclusão, o uso de alginato e goma xantana mostrou-se promissor para a composição de biotinta reticulável com íons de estrôncio visando a impressão de tecidos.

Palavras chave: hidrogel, polissacarídeos, manufatura aditiva, biotinta, estrôncio.

ABSTRACT

The articular cartilage is a connective tissue responsible for the lubrication and support of mechanical loads in the joints, being susceptible to structural injuries and defects. However, its ability to repair and regenerate is limited. Tissue engineering has been extensively studied as an alternative to conventional treatments, given that it could offer a more definitive solution to the problem, by combining cells to scaffolds and growth factors. These structures can be produced by additive manufacturing using extrusion. The materials can be based on polysaccharides, such as alginate (A-SF or A-HF, corresponding to the different types of alginate used, Protanal SF 120 RB and HF 120 RB, respectively), which can ionically crosslink, nanocellulose (C) and xanthan gum (X), which exhibit more significant shear thinning behavior. Thus, in this work the study of hydrogels based on alginate (between 0.9 and 2% w/v), nanocellulose (2.1% w/v), and xanthan gum (between 0.8 and 2.5% w/v) was aimed to produce chondral structures by 3D printing. It was not possible to efficiently disperse the nanocellulose in the hydrogel. However, by using alginate and xanthan gum, gels with promising rheological properties for bioprinting could be produced. Also, the increase in xanthan gum concentration improved the rheology of the material. During printing, the most promising hydrogel contained 1% (w/v) of alginate and 2.5% (w/v) of xanthan gum (A-SF_{1.0}X_{2.5}). By using the formulation A-SF_{1.0}X_{2.5}, even when sterilized by steam heat (A-HF_{1.0}X_{2.5}), it was possible to obtain structures with multiple steady layers. Considering its application as an ionically crosslinkable bioink, the crosslinking of the sterile material to solutions with different concentrations of SrCl₂ under different exposure times was also analyzed, as well as the toxicity of the crosslinking conditions to dental pulp stem cells. The most appropriate crosslinking conditions were reached when using a 50 mmol/L strontium solution for 10 or 30 minutes, according to the results of the mechanical and cytotoxicity assays. In conclusion, the use of a hydrogel combining alginate to xanthan gum crosslinked with strontium proved to be promising as a bioink formulation for tissue bioprinting.

Key words: hydrogel, polysaccharides, additive manufacturing, bioink, strontium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama dos objetivos e das etapas de trabalho da dissertação.	24
Figura 2 – Representação da cartilagem articular: organização celular por zona (A); arquitetura das fibras de colágeno (B).	26
Figura 3 – Estrutura molecular do alginato.	40
Figura 4 – Esquema da ligação entre o íon de cálcio (círculo grande) e um par de cadeias guluronato do alginato (a) e do modelo da “caixa de ovos” para a formação do gel de alginato (b).	44
Figura 5 – Módulo de elasticidade de géis de alginato reticulados com íons de cálcio em função do comprimento médio dos blocos G.	45
Figura 6 – Representação estrutural da cadeia de β -1,4-glicano (celulose). O monômero, celobiose, está indicado entre colchetes.	49
Figura 7 – Módulo de armazenamento (G') em função da concentração de CMF a 25°C e frequência de 1 Hz ($\omega = 6,28$ rad/s).	51
Figura 8 – Influência da tensão de cisalhamento (ou taxa de deformação, γ) sobre a viscosidade (η) de suspensões de diferentes concentrações (%m/m) de CMF.	51
Figura 9 – Representação de estrutura química da goma xantana.	52
Figura 10 – Aspecto dos filmes de CMF com concentração de 0,05% (a) e 0,15% (b).	68
Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura da CMF com concentração de 0,05% (a) e 0,15% (b).	68
Figura 12 – Viscosidades reduzida e inerente em função da concentração para o alginato Protanal SF 120 RB (a) e Protanal HF 120 RB (b).	70
Figura 13 – Logaritmo da viscosidade reduzida em função da concentração para o alginato Protanal SF 120 RB (a) e Protanal HF 120 RB (b).	70
Figura 14 – Aspecto das suspensões contendo alginato, CMF e xantana nas formulações $A_{0,9}C_{2,1}X_0$ (a), $A_{0,9}C_{2,1}X_{0,8}$ (b), $A_{0,9}C_{2,1}X_{1,2}$ (c).	75
Figura 15 – Aspecto das soluções contendo alginato e xantana antes (a) e após (b) 5 minutos da inversão de tubo nas seguintes formulações: A-SF _{2,0} X _{1,0} (1); A- SF _{1,5} X _{1,5} (2); A-SF _{1,0} X _{2,0} (3); A-SF _{1,0} X _{2,5} (4) e A-SF _{1,0} X _{2,0} Ca (5).	77
Figura 16 – Aspecto da solução estéril contendo alginato e xantana antes (a) e após (b) 5 minutos da inversão de tubo para a formulação A-HF _{1,0} X _{2,5}	78

Figura 17 – Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento das formulações contendo alginato e xantana.....	79
Figura 18 – Módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da tensão para as formulações A-SF _{1,5} X _{1,5} (a), A-SF _{1,0} X _{2,0} (b), A-SF _{1,0} X _{2,5} (c), A-SF _{1,0} X _{2,0} Ca (d) e A-HF _{1,0} X _{2,5} (e).....	82
Figura 19 – Módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da frequência de oscilação do rotor para as formulações A-SF _{1,5} X _{1,5} (a), A-SF _{1,0} X _{2,0} (b), A-SF _{1,0} X _{2,5} (c), A-SF _{1,0} X _{2,0} Ca (d) e A-HF _{1,0} X _{2,5} (e).	84
Figura 20 – Variação da tangente de perda em função da alteração da frequência de oscilação do rotor.....	85
Figura 21 – Viscosidade em função de diferentes taxas de cisalhamento ao longo do tempo para as formulações contendo alginato e xantana.....	86
Figura 22 – Aspecto da estrutura pré-definida (a) e de uma camada impressa das formulações não-estéreis A-SF _{1,5} X _{1,5} (b), A-SF _{1,0} X _{2,0} (c), A-SF _{1,0} X _{2,5} (d) e A-SF _{1,0} X _{2,0} Ca (e), com retângulos brancos evidenciando as bordas da estrutura impressa.	88
Figura 23 – Aspecto da impressão de quatro camadas das formulações não-estéreis A-SF _{1,5} X _{1,5} (a, d), A-SF _{1,0} X _{2,0} (b, e), A-SF _{1,0} X _{2,5} (c, f), com retângulos brancos de linhas pontilhadas evidenciando a região ampliada.	90
Figura 24 – Resultados do ajuste da taxa de deposição entre 0,0010 mm/mm (a), 0,0020 mm/mm (b), 0,0040 mm/mm (c) e 0,0060 mm/mm (d) para a formulação A-SF _{1,0} X _{2,5}	91
Figura 25 – Resultados do ajuste do <i>push out</i> entre 0,005 s (a, d), 0,010 s (b, e) e 0,015 s (c, f) para a formulação A-SF _{1,0} X _{2,5}	92
Figura 26 – Aspiração excessiva causada pelo alto tempo de <i>suck back</i>	93
Figura 27 – Aspecto ampliado da impressão de uma (a) e quatro (b) camadas da formulação A-SF _{1,0} X _{2,5} , após a otimização dos parâmetros.	94
Figura 28 – Aspecto ampliado da impressão de uma camada do material A-HF _{1,0} X _{2,5} com os bicos de diâmetro interno de 0,58 mm (a) e 0,41 mm (b).	94
Figura 29 – Aspecto da impressão de quatro camadas da formulação estéril A-HF _{1,0} X _{2,5} ampliada (a) e macroscópica (b).	95
Figura 30 – Aspecto das estruturas produzidas com oito camadas impressão das formulações A-SF _{1,0} X _{2,5} (a) e A-HF _{1,0} X _{2,5} (b), imagens ampliadas.	96

Figura 31 – Tensões de ruptura observadas para a formulação A-HF _{1,0} X _{2,5} em função do tempo e concentração de reticulação.....	98
Figura 32 – Deformações de ruptura observadas para a formulação A-HF _{1,0} X _{2,5} em função do tempo e concentração de reticulação.....	99
Figura 33 – Módulos de elasticidade da formulação A-HF _{1,0} X _{2,5} calculados empregando dados até 10% de deformação.	101
Figura 34 – Módulos de elasticidade da formulação A-HF _{1,0} X _{2,5} calculados empregando dados até 13% de deformação.	101
Figura 35 – Módulos de elasticidade mais adequados determinados para cada concentração testada.....	103
Figura 36 – Morfologia celular antes (a) e depois de 1 h em: 0,2 mol/L NaCl (b); 50 mmol/L SrCl ₂ (c); 100 mmol/L SrCl ₂ (d) e 200 mmol/L SrCl ₂ (e), todas as condições contendo SrCl ₂ também continham 0,2 mol/L de NaCl.....	104
Figura 37 – Morfologia celular antes (a) e depois de 30 minutos na presença de 50 mmol/L SrCl ₂ (b), α -MEM (c) e 10 minutos na presença de 50 mmol/L SrCl ₂ (d).	106
Figura 38 – Viabilidade celular de cada condição analisada.....	108
Figura 39 – Total de células de cada condição analisada.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Requisitos de formulações úteis como biotinta para aplicação na engenharia tecidual, em processos de bioimpressão.	35
Tabela 2 – Composição e parâmetros de sequência de alginatos de diversas fontes. F _G refere-se à fração molar de ácido gulurônico e N _{G>1} ao número médio de unidades consecutivas nos blocos G.	40
Tabela 3 – Valores dos parâmetros K e a a 25 °C.	43
Tabela 4 – Características dos diferentes tipos de nanocelulose.	50
Tabela 5 – Técnicas passíveis de uso na esterilização de hidrogéis e/ou de seus componentes.	55
Tabela 6 – Esterilização do alginato.	56
Tabela 7 – Formulações dos hidrogéis contendo CMF.	60
Tabela 8 – Formulações do hidrogel contendo alginato e xantana.	62
Tabela 9 – Análise de massa seca da CMF.	67
Tabela 10 – Viscosidade intrínseca ([η]) e massa molar viscosimétrica (M _v) dos alginatos na temperatura de 25 °C.	71
Tabela 11 – Viscosidade intrínseca ([η]) e massa molar viscosimétrica (M _v) na temperatura de 25 °C dos alginatos esterilizados por calor úmido.	73
Tabela 12 – Sumário das características de diferentes formulações de hidrogel verificadas visualmente.	78
Tabela 13 – Índice da Lei de Potência (n), índice de consistência (k) e tensão limite de escoamento das formulações contendo alginato e xantana.	79
Tabela 14 – Capacidade das formulações contendo alginato e xantana de recuperar a viscosidade após a aplicação de alta taxa cisalhante.	87
Tabela 15 – Intervalos de deformação utilizados por diferentes autores para o cálculo do módulo de elasticidade.	100
Tabela 16 – Critérios para avaliação qualitativa da citotoxicidade de extratos com base na morfologia celular, de acordo com a ISO 10993-5:2009.	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[η] – Viscosidade intrínseca

2D – Bidimensional

3D – Tridimensional

a – Constante associada ao par polímero-solvente à uma temperatura específica

A-HF – Alginato Protanal HF 120 RB

A-SF – Alginato Protanal SF 120 RB

c – Concentração polimérica

CA – Cartilagem articular

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDV – Calorimetria diferencial de varredura

CMF – Celulose microfibrilada

CNC – Celulose nanocristalina

DPSC – Célula-tronco de polpa dentária

DRX – Difração de raio X

E – Módulo de elasticidade

ECM – Matriz extracelular

f – Frequência em Hz

FEQ – Faculdade de Engenharia Química

F_G – Fração molar de ácido gulurônico

G – Ácidos α -L-gulurônico

G' – Módulo elástico

G'' – Módulo viscoso

GDL – D-glucono- δ -lactona

K – Constante associada ao par polímero-solvente à uma temperatura específica

k – Índice de consistência

K' – Constante de Huggins

K'' – Constante de Kraemer

LRAC – Laboratório de recursos analíticos e de calibração

M – Ácidos β -D-manurônico

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV-EC – Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

MFA – Microscopia de força atômica

M_v – Massa molar viscosimétrica

n – Índice da Lei de Potência

NCB – Nanocelulose bacteriana

$N_{G>1}$ – Número médio de unidades consecutivas nos blocos G

NT3D-CTI – Núcleo de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer

PO – Tempo de *push out*

R^2 – Coeficiente de determinação

SB – Tempo de *suck back*

SFB – Soro fetal bovino

t – Tempo de escoamento da solução polimérica

t_0 – Tempo de escoamento do solvente

$\tan \delta$ – Tangente de perda

TD – Taxa de deposição

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

X – Goma xantana

α -MEM – Meio essencial mínimo de Eagle modificado alfa

γ – Taxa de cisalhamento

η – Viscosidade

η_{esp} – Viscosidade específica

η_{ine} – Viscosidade inerente

η_r – Viscosidade relativa

η_{red} – Viscosidade reduzida

ω – Frequência em rad/s

SUMÁRIO

1	Introdução	19
2	Objetivo	24
3	Revisão bibliográfica	25
3.1	Cartilagem	25
3.2	Hidrogel	30
3.3	Manufatura aditiva	31
3.3.1	Biofabricação.....	31
3.4	Requisitos para bioimpressão de cartilagem	34
3.5	Alginato	39
3.6	Nanocelulose	48
3.7	Goma xantana	52
3.8	Esterilização.....	53
4	Materiais e metodologia	58
4.1	Materiais	58
4.2	Caracterização das matérias-primas	58
4.2.1	Análise de massa seca da celulose microfibrilada	58
4.2.2	Microscopia eletrônica de varredura da celulose microfibrilada	58
4.2.3	Determinação da massa molar viscosimétrica do alginato	59
4.3	Formulação dos hidrogéis.....	59
4.3.1	Géis não-estéreis	59
4.3.1.1	Formulações consistindo de alginato, CMF e goma xantana	59
4.3.1.2	Formulações consistindo de alginato e goma xantana.....	61
4.3.2	Esterilização das formulações de hidrogéis.....	61
4.4	Análise da estabilidade e do comportamento reológico dos materiais.....	62
4.5	Deposição das estruturas por manufatura aditiva.....	63

4.6	Análise da influência da concentração da solução reticulante e do tempo de reticulação	64
4.6.1	Efeito nas propriedades mecânicas.....	65
4.6.2	Efeito da toxicidade da solução reticulante	65
4.7	Análise estatística	66
5	Resultados e Discussão.....	67
5.1	Caracterização das matérias-primas	67
5.1.1	Análise de massa seca da celulose microfibrilada	67
5.1.2	Aspecto visual das fibras de CMF e analisado por microscopia eletrônica de varredura da celulose microfibrilada	67
5.1.3	Determinação da massa molar viscosimétrica do alginato	69
5.1.4	Efeito da esterilização nas propriedades dos polissacarídeos	71
5.1.5	Filtração.....	72
5.1.6	Calor úmido	72
5.2	Formulação dos hidrogéis.....	75
5.2.1	Formulações consistindo de alginato, CMF e goma xantana	75
5.2.1.1	Análise da estabilidade dos materiais	75
5.2.2	Formulações consistindo de alginato e goma xantana.....	76
5.2.2.1	Análise exploratória da estabilidade e do comportamento reológico dos hidrogéis obtidos.....	76
5.3	Análise das características reológicas das formulações mais promissoras	78
5.4	Deposição das estruturas por manufatura aditiva.....	88
5.5	Influência da concentração da solução reticulante e do tempo de reticulação nas propriedades mecânicas e na citotoxicidade dos hidrogéis.....	97
5.5.1	Efeito nas propriedades mecânicas.....	97
5.5.2	Análise da citotoxicidade da solução reticulante	103
6	Conclusão	110
7	Sugestões para trabalhos futuros	112

8 Referências bibliográficas	113
------------------------------------	-----

1 INTRODUÇÃO

A cartilagem é um tecido conectivo responsável pela transmissão eficiente de cargas através das articulações e, em alguns casos, por permitir a movimentação dos ossos (WATKINS e MATHIESON, 2009). Nesse caso a cartilagem é chamada de articular e compõe as articulações diartrodiais (FOX; BEDI e RODEO, 2009).

A cartilagem articular (CA) é composta basicamente por água, células denominadas condrócitos e pela matriz extracelular (ECM), que é porosa e permeável, formada por colágenos, proteoglicanos e, em menores proporções, lipídeos, fosfolipídeos, proteínas não colagenosas e glicoproteínas. A água compõe cerca de 80% da massa úmida do tecido, e apresenta íons inorgânicos, como sódio, cálcio, cloreto e potássio. Cerca de 30% da água está presente nos espaços intrafibrilares das fibras de colágeno, uma pequena porcentagem está nas regiões intracelulares e o restante está nos poros da matriz. Grande parte dessa água interfibrilar interage com os proteoglicanos da matriz, produzindo um gel altamente viscoso (FOX; BEDI e RODEO, 2009; WATKINS e MATHIESON, 2009). Essa estrutura dos componentes da cartilagem faz com que ela seja capaz de suportar altas cargas compressivas, no entanto, como a CA é um tecido avascular e que não possui vasos linfáticos ou nervos, sua capacidade de reparo e regeneração é limitada. Assim, lesões e defeitos nesse tecido devem ser devidamente tratadas para que não resultem em artrose precoce (BHOSALE e RICHARDSON, 2008).

A forma mais comum da artrose é a osteoartrite, na qual ocorre a degeneração da cartilagem com posterior degeneração óssea, causando falhas estruturais e funcionais na articulação (HUNTER e FELSON, 2006; WITTENAUER; SMITH e ADEN, 2013). O desenvolvimento da doença pode ser influenciado por diversos fatores, como: idade, lesões, ocupação, prática de atividades físicas de alto impacto, gênero, etnia, genética, obesidade, dieta alimentar e densidade óssea (HAQ; MURPHY e DACRE, 2003). Dentre os fatores citados, a idade é o mais comumente associado à osteoartrite, sendo que 30% da população com idade superior a 65 anos apresenta evidência radiográfica de osteoartrite no joelho. Ainda, a doença é a causa mais comum de incapacidade motora em adultos, figurando entre as dez primeiras doenças que causam redução de anos produtivos devido à

incapacidade, gerando fardos sociais e econômicos (WITTENAUER; SMITH e ADEN, 2013).

Variadas formas de tratamento da doença podem ser empregadas dependendo do grau de severidade da mesma, como por exemplo, mudança de estilo de vida em estágios iniciais, uso de fármacos para controle dos sintomas em estágio intermediário e nos estágios mais avançados pode-se recorrer à intervenção cirúrgica, porém, ainda não se tem uma solução definitiva (HUNTER e FELSON, 2006). Nesse sentido, recentemente tem-se se considerado com interesse o uso de estratégias associadas à engenharia tecidual como forma de prover alternativas adicionais de tratamento.

A definição inicial de engenharia tecidual surgiu em 1988, por proposição de Skalak e Fox (1988), porém sua definição mais conhecida foi estabelecida em 1993 por Langer e Vacanti (1993), como uma área interdisciplinar que aplica princípios de engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos para manter ou melhorar a funcionalidade tecidual (LANGER e VACANTI, 1993; SKALAK e FOX, 1988).

Dentro deste contexto da engenharia tecidual tem-se a abordagem da utilização de suportes ou *scaffolds*, que são estruturas tridimensionais às quais se podem adicionar células e fatores de diferenciação. Essas estruturas fornecerão o suporte estrutural e arquitetura adequados para a proliferação celular, permitindo que as células produzam matriz extracelular para substituir o *scaffold* na medida em que este se degrada. Esta abordagem representa uma solução definitiva, pois, através da engenharia tecidual, a cartilagem se regeneraria (HUTMACHER, 2000).

Os *scaffolds* apresentam a vantagem de poder ser produzidos de diferentes formas, entre as quais encontram-se técnicas convencionais como moldagem, liofilização, entre outras, e técnicas não convencionais como a manufatura aditiva. Além disso, podem ser produzidos a partir de polímeros sintéticos ou naturais e outros biomateriais, como policaprolactona, poliglicolídeos, colágeno, ácido hialurônico e quitina. Essa variedade de matérias-primas permite a produção de *scaffolds* com diversas propriedades, dependendo do tipo de aplicação desejada (HUTMACHER, 2000).

No caso da aplicação dos princípios da engenharia tecidual para a terapia

de tecidos cartilaginosos, polímeros naturais ou biopolímeros são amplamente utilizados para a constituição de estruturas que mimetizam a matriz extracelular, particularmente na forma de hidrogéis formados por cadeias poliméricas reticuladas capazes de reter altas quantidades de água. Assim, os hidrogéis podem promover o crescimento tecidual, fornecendo um ambiente tridimensional de cultivo celular em que as células mantêm suas características fenotípicas (BALAKRISHNAN e BANERJEE, 2011; JIN e DIJKSTRA, 2010).

A preferência por polímeros de fontes naturais se deve ao fato de que estes são, com frequência, capazes de regular a divisão, adesão, diferenciação e migração celular de forma mais eficiente do que os polímeros sintéticos. Os biopolímeros comumente utilizados são: ácido hialurônico, sulfato de condroitina, quitosana, alginato, agarose, fibrina, colágeno e seda (BALAKRISHNAN e BANERJEE, 2011).

O alginato pode ser facilmente reticulado na presença de íons bivalentes e comumente utiliza-se o cálcio (MØRCH *et al.*, 2006), porém a presença do mesmo pode ser prejudicial em articulações afetadas pela osteoartrite (BONEN e SCHMID, 1991; MARK *et al.*, 1992). Desta forma, pode-se reticular o alginato com íons de estrôncio, com os quais o alginato apresenta maior afinidade e, ainda, podem auxiliar no tratamento da osteoartrite (HAUG e SMIDSRØD, 1970; HENROTIN *et al.*, 2001).

No entanto, o alginato não apresenta propriedades mecânicas suficientemente apropriadas para a engenharia tecidual de cartilagem (LEE e MOONEY, 2012). Ademais, células suspensas no gel não aderem prontamente à matriz devido à sua limitada interação com o polissacarídeo (BALAKRISHNAN e BANERJEE, 2011). Por esse motivo, diversas combinações de constituintes têm sido relatadas objetivando o reforço mecânico ou o aumento da biocompatibilidade de biomateriais contendo alginato em sua formulação, como as descritas a seguir.

Li e Zhang (2005) combinaram quitosana e alginato para a produção de um *scaffold* e melhoraram as propriedades mecânicas da estrutura quando comparada ao *scaffold* constituído apenas de quitosana. Almeida e colaboradores (2016) funcionalizaram um *scaffold* de alginato com colágeno, observando melhoria na biocompatibilidade (ALMEIDA *et al.*, 2016; LI e ZHANG, 2005).

Biopolímeros (polímeros de fontes naturais) também têm sido estudados em formulações de biotintas, que são materiais poliméricos, normalmente hidrogéis, combinados com células e/ou moléculas biológicas utilizados para bioimpressão (MORONI *et al.*, 2018). A bioimpressão é um processo automatizado para a produção de estruturas bi ou tridimensionais para aplicações biológicas, que podem ou não conter células (MORONI *et al.*, 2018). Dentre as possíveis células empregadas, as células-tronco são comumente utilizadas devido à secreção de fatores específicos que auxiliam na regeneração de tecidos e, também, pela capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares que podem promover a substituição de tecidos, por exemplo, o osso e o cartilaginoso (WANG *et al.*, 2018). Entre as possíveis fontes de células-tronco, as provenientes da polpa dentária apresentam as seguintes vantagens: local de fácil coleta cirúrgica; alta eficiência de extração das células do tecido nativo e capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares (D'AQUINO *et al.*, 2008). Assim a combinação de bioimpressão com células-tronco, como as células-tronco de polpa dentária (DPSC), é de grande interesse no desenvolvimento de tratamentos com base na engenharia tecidual.

Neste sentido, Kundu e colaboradores (2015) empregaram um polímero sintético (policaprolactona) para reforçar mecanicamente o alginato e melhorar o desenvolvimento celular no *scaffold*. Markstedt e colaboradores (2015) combinaram nanocelulose com alginato na formulação de uma biotinta e obtiveram melhor capacidade de impressão do material e uma gama de propriedades mecânicas da estrutura pela variação da composição da mistura (ALMEIDA *et al.*, 2016; KUNDU *et al.*, 2015; LI e ZHANG, 2005; MARKSTEDT *et al.*, 2015).

Apesar das melhorias verificadas, ainda não se tem um material adequado para utilização como biotinta (GROLL *et al.*, 2018; GUNGOR-OZKERIM *et al.*, 2018; MORONI *et al.*, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2018). Assim, é importante que novas formulações e materiais sejam estudados.

Uma substância que ainda é pouco estudado em formulações de biotinta é a goma xantana. No entanto, este polissacarídeo é amplamente utilizado pela indústria farmacêutica devido às suas propriedades reológicas, para a produção de soluções viscoelásticas mesmo a baixas concentrações poliméricas em fase aquosa (KUMAR; RAO e HAN, 2018).

Estas mesmas propriedades tornam o uso da goma xantana interessante em aplicações biomédicas (KUMAR; RAO e HAN, 2018). Han e colaboradores (2012), por exemplo, utilizaram uma solução de goma xantana de concentração 1% (m/v) para injeção intra-articular em ratos, como forma de tratamento da osteoartrite. Os autores reportaram que a solução de xantana foi capaz de proteger a cartilagem e reduzir a progressão da osteoartrite induzida nos animais (HAN *et al.*, 2012).

Desta forma, este trabalho enfocou o estudo de formulações de hidrogéis compostos de alginato, nanocelulose e goma xantana e a avaliação das características do material, tendo em vista a produção de estruturas condrais por manufatura aditiva.

2 OBJETIVO

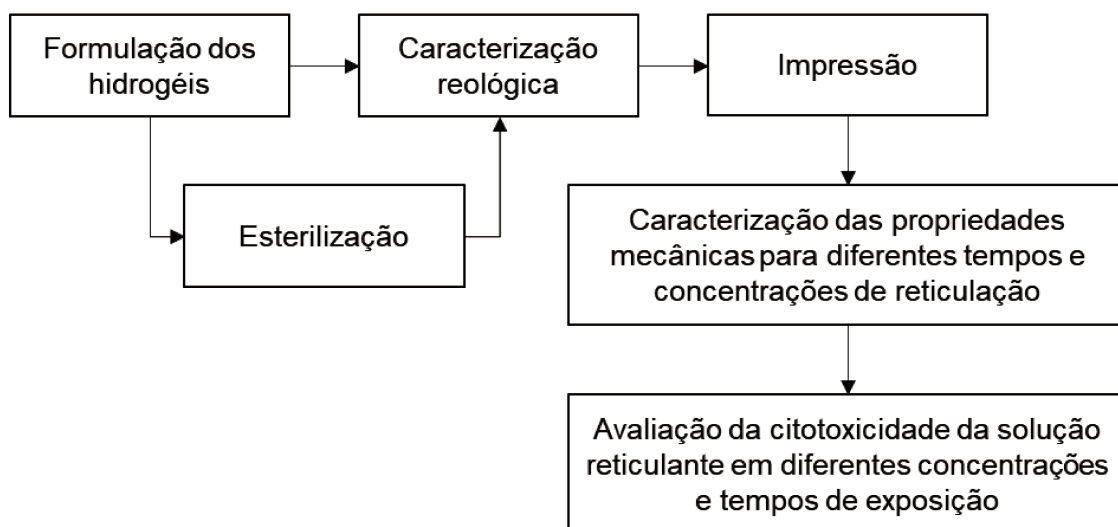
Neste trabalho objetivou-se a formulação e caracterização de hidrogéis à base de alginato, nanocelulose e goma xantana, utilizando-se o cloreto de estrôncio para reticulação do alginato, visando-se a aplicação na área de regeneração de cartilagem articular, mais especificamente, com foco no projeto de um produto passível de uso na impressão tridimensional de estruturas condrais estáveis e implantáveis contendo células viáveis.

Para tal, teve-se por meta atingir os seguintes objetivos específicos:

- a. Avaliar o efeito do processo de esterilização por calor úmido na massa molar do alginato;
- b. Verificar como as diferentes concentrações dos biopolímeros afetam as propriedades reológicas e o desempenho dos materiais no processo de bioimpressão;
- c. Comparar as formulações estéril e não estéril quanto às propriedades reológicas e à capacidade de impressão;
- d. Analisar o efeito do uso de diferentes condições de reticulação (tempo e concentração da solução) nas propriedades mecânicas do hidrogel e na manutenção da viabilidade de células-tronco mesenquimais.

Estes objetivos, bem como as etapas de realização do presente trabalho, estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 – Diagrama dos objetivos e das etapas de trabalho da dissertação.



3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cartilagem

A principal função da cartilagem articular é de lubrificar e suportar as cargas aplicadas às articulações durante atividades diárias, sendo capaz de resistir a inúmeros ciclos de carga apresentando nenhuma ou pouca evidência de dano ou degeneração. Este tecido apresenta espessura entre 2 e 4 mm (FOX; BEDI e RODEO, 2009). Quando uma carga é aplicada à cartilagem a mesma se deforma, gerando tensões de tração, cisalhamento e compressão ao longo da camada cartilaginosa. Isso ocorre através de uma perda de volume do tecido decorrente da exsudação do fluido de forma dependente à carga aplicada e ao longo do tempo, representando um comportamento viscoelástico (MOW e GUO, 2002).

Devido ao comportamento viscoelástico da cartilagem relacionado a este fluxo do fluido intersticial, fez-se necessária a definição de um modelo para descrever este comportamento e um método para medir as propriedades mecânicas intrínsecas de compressão desta matriz sólida, permeável e porosa que é a cartilagem. Assim, em 1980 Mow e colaboradores introduziram a teoria da mistura bifásica para modelar o comportamento da cartilagem articular (MOW e GUO, 2002).

Segundo o modelo do meio bifásico, a cartilagem é composta por duas fases, uma fluida e outra sólida, sendo que quando uma carga é aplicada sobre a cartilagem há um aumento local de pressão que faz com que o fluido intersticial flua para fora da ECM, gerando uma alta força de arraste friccional na matriz, a qual faz com que o fluido retorne à matriz quando a carga de compressão é removida. Esse fluxo de fluido intersticial é controlado pela permeabilidade da fase sólida, que está relacionada à porosidade, conectividade e densidade de carga da matriz extracelular. Desta forma, a relação entre essas duas fases gera a resistência compressiva da estrutura através das forças de repulsão eletrostática negativa presentes na cartilagem (FOX; BEDI e RODEO, 2009; MOW e GUO, 2002).

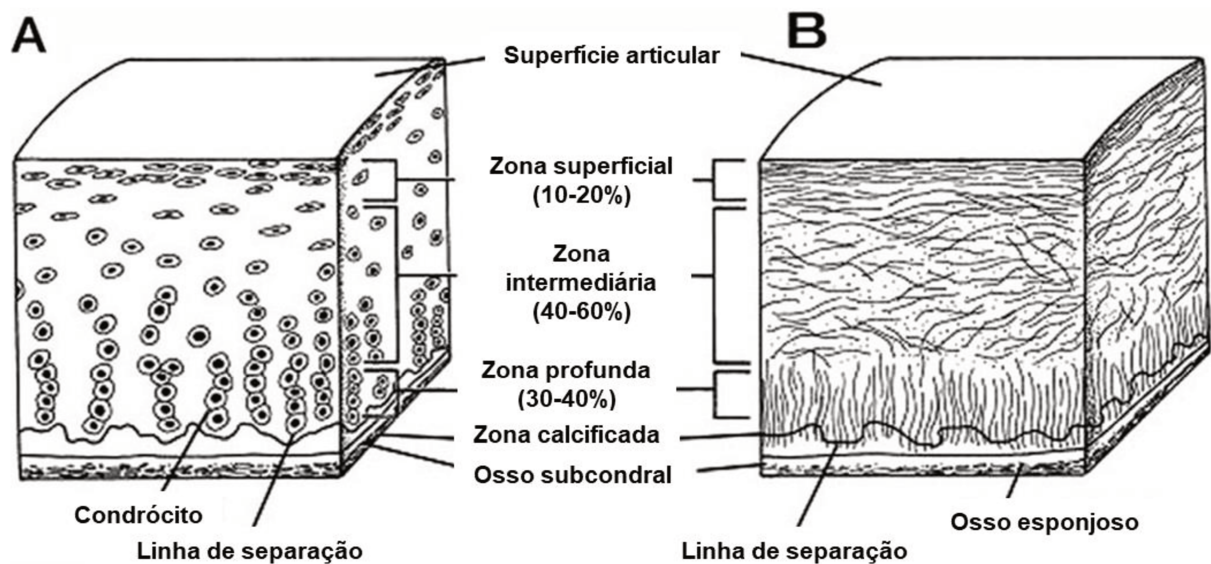
Esta habilidade de resistir a ciclos de compressão é comumente medida através de ensaios de compressão confinada, de compressão não confinada ou de indentação. Com a realização destes testes é possível determinar variados parâmetros, como o módulo agregado de equilíbrio compressivo, que está entre

0,1 e 2,0 MPa para todos os tipos de cartilagem articular, a permeabilidade hidráulica, entre $1,2$ e $6,2 \times 10^{-16} \text{ m}^4/\text{N.s}$, o módulo elástico de equilíbrio, entre 0,41 e 0,85 MPa, e o coeficiente de Poisson no equilíbrio, entre 0,06 e 0,18 (MOW e GUO, 2002).

As propriedades mecânicas apresentadas pela cartilagem articular se devem à sua composição e estrutura organizacional. A cartilagem é composta majoritariamente por água; colágeno, que pode ser do tipo I, II, VI, IX, X e XI, sendo o tipo II o mais abundante; e proteoglicanos, que são carregados negativamente. De forma simplificada, o colágeno é responsável por manter a integridade estrutural do tecido quando cargas de tração são aplicadas, enquanto a carga negativa dos proteoglicanos permite que a matriz atraia e retenha água, gerando a resistência hidrostática capaz de resistir a cargas de compressão (KUO; LI e TUAN, 2013).

A estrutura anisotrópica da cartilagem pode ser dividida em quatro zonas com diferentes propriedades, são elas: zona superficial; zona intermediária; zona profunda e zona calcificada (Figura 2).

Figura 2 – Representação da cartilagem articular: organização celular por zona (A); arquitetura das fibras de colágeno (B).



Fonte: Traduzida de Buckwalter; Mow; Ratcliffe, 1994 ¹.

A zona superficial corresponde à faixa de 10 a 20% da espessura da cartilagem articular e é responsável pela proteção e manutenção das camadas mais

¹ BUCKWALTER, J. A.; MOW, V. C.; RATCLIFFE, A. Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. **JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 2, n. 4, 1994.

profundas. As moléculas de colágeno presentes nesta zona são dos tipos II e IX, arranjadas de forma compactada e alinhadas paralelamente à superfície articular. A quantidade de condrócitos nesta zona é relativamente alta, e estes apresentam-se achatados nesta região.

A zona intermediária é a ponte anatômica e funcional entre as zonas superficial e profunda, fornece a primeira linha de resistência contra forças de compressão e corresponde à 40 a 60% do volume da cartilagem. Esta zona contém proteoglicanos e fibras mais espessas de colágeno organizadas obliquamente. Nela, os condrócitos são esféricos e estão presentes em baixa densidade (FOX; BEDI e RODEO, 2009; KUO; LI e TUAN, 2013).

A zona profunda compõe cerca de 30% do volume cartilaginoso e promove a maior resistência às forças compressivas. As fibras de colágeno estão dispostas perpendicularmente à superfície articular e apresentam o maior diâmetro da estrutura. Além disso, esta zona possui a maior quantidade de proteoglicanos e os condrócitos nela estão estruturados em colunas paralelas às fibras de colágeno (FOX; BEDI e RODEO, 2009; KUO; LI e TUAN, 2013).

Na zona calcificada os condrócitos são escassos e hipertróficos. A função desta zona é de unir a cartilagem ao osso através da fixação das fibras de colágeno da zona profunda ao osso subcondral (FOX; BEDI e RODEO, 2009; KUO; LI e TUAN, 2013).

A preservação da cartilagem articular depende da manutenção de sua arquitetura organizada, sendo esta dependente dos condrócitos, uma vez que regulam a síntese e degradação dos componentes da matriz extracelular da cartilagem articular (BUCKWALTER; MOW e RATCLIFFE, 1994).

Fatores como a composição da matriz extracelular, a carga mecânica aplicada e a presença de mediadores solúveis (por exemplo, fatores de crescimento e citocinas), funcionam como sinalizadores para as células, as quais captam esses sinais do ambiente ao seu redor e regulam seu metabolismo. Desta forma, os condrócitos mantêm a funcionalidade da cartilagem (BUCKWALTER; MOW e RATCLIFFE, 1994).

No caso de microlesões da cartilagem, os condrócitos são capazes de reparar o tecido, desde que a taxa de produção dos proteoglicanos pelas células

seja superior à de degradação. Quando isso não ocorre e, portanto, a lesão não é reparada, tem início um processo degenerativo irreversível, como é o caso do desenvolvimento da osteoartrite (BUCKWALTER; MOW e RATCLIFFE, 1994). A osteoartrite é uma doença da articulação sinovial e comumente ocorre nas mãos, joelhos e quadris (HUNTER e FELSON, 2006).

Entre as causas da osteoartrite estão a alteração do metabolismo celular e a ação de cargas mecânicas adversas sobre a cartilagem. Em ambos os casos, o processo degenerativo inicialmente se caracteriza pela desorganização da estrutura colagenosa da cartilagem e da clonagem, verificando-se necrose celular. Em uma tentativa de reparar o tecido, se tem o aumento da taxa de mitose dos condrócitos, porém, frequentemente, os proteoglicanos e fibras de colágeno produzidos migram para o líquido sinovial. Assim, o processo de reparação falha e a degeneração da cartilagem progride. Além disso, a desorganização das fibras de colágeno causa uma redução da resistência à tração e rigidez da superfície articular, além do aumento da quantidade de água na cartilagem. Esse aumento da quantidade de água também é favorecido pelo aumento inicial da concentração de proteoglicanos, seguido de uma redução brusca na concentração dessas macromoléculas (BUCKWALTER; MOW e RATCLIFFE, 1994).

O diagnóstico da doença pode ser feito devido a alguns fatores principais, como: dor; rigidez; redução dos movimentos; inchaço; crepitação e idade avançada (HUNTER e FELSON, 2006). Pode, ainda, ser identificada clinicamente, através de artroscopia devido ao aumento da rugosidade superficial, à fibrilação e à fissuração da cartilagem. Essas fissuras podem se estender tanto em extensão quanto em profundidade, podendo atingir a zona calcificada e o osso subcondral, levando à destruição de toda a camada cartilaginosa. Esses estágios mais avançados se caracterizam pelo aumento da densidade do osso subcondral, estreitamento do espaço entre os ossos e formação de osteófitos. Essas alterações estruturais da cartilagem e do osso subcondral também podem ser identificadas, de forma menos invasiva, através de imagens obtidas por raio X, tomografia computadorizada e ressonância magnética nuclear. (BUCKWALTER; MOW e RATCLIFFE, 1994; HUNTER e FELSON, 2006; HUNZIKER, 2002).

Quando a degradação cartilaginosa atinge o osso e a medula óssea, lesionando vasos sanguíneos, ocorre a formação de coágulos decorrentes do sangramento no local, que são a base do reparo espontâneo. Nesse processo também ocorre a liberação de fatores de crescimento provenientes do osso, que estão envolvidos no reparo as células-tronco originárias de diferentes locais. Essas células penetram a matriz de fibrina dos coágulos, substituindo-os por um tecido vascularizado, o que inicia os diversos processos de ossificação. No entanto, esse mecanismo é capaz de reparar apenas lesões com diâmetro entre 1 e 2 mm. Ademais, o tecido formado tem natureza fibrosa e não apresenta a estrutura organizacional e nem as propriedades mecânicas do tecido original (HUNZIKER, 2002).

A osteoartrite pode ser tratada de diversas formas, a depender da severidade da doença. Inicialmente, recomenda-se mudança no estilo de vida, como, por exemplo, redução de peso, prática de atividades físicas e fisioterapia. No estágio seguinte, pode ser utilizada uma abordagem farmacológica. Neste tipo de tratamento faz-se uso de analgésicos (como o paracetamol), de fármacos anti-inflamatórios não esteroides, opioides, glucosamina e condroitina. Além disso, pode ser feita a injeção intra-articular de esteroides, ácido hialurônico ou, ainda, de plasma rico em plaquetas (HUNTER e FELSON, 2006; MAKRIS *et al.*, 2014).

Nos casos mais graves da doença é necessária a intervenção cirúrgica. As formas mais comuns de cirurgias são: microfratura; debridamento e lavagem por artroscopia; osteotomia e artroplastia total (HUNTER e FELSON, 2006; MAKRIS *et al.*, 2014). Os tratamentos apresentados visam o controle da dor e a melhora da funcionalidade da cartilagem, porém nenhum deles soluciona o problema de forma definitiva. Assim, alternativas que promovam a regeneração da cartilagem, principalmente em lesões de grande extensão, têm sido estudadas. Entre as opções, a produção de biomateriais seguindo os princípios da engenharia tecidual têm se destacado (HUNZIKER, 2002).

Biomateriais podem ser definidos como materiais que entram em contato com sistemas biológicos, independente da fonte do material e de seu estado físico, com a função de substituir, reparar, regenerar ou melhorar a função de um tecido ou órgão (MORONI *et al.*, 2018). Assim, estes materiais podem ser utilizados em

aplicações terapêuticas, cirúrgicas, diagnósticas ou vacinais.

A engenharia tecidual objetiva a produção de um biomaterial que substitua o tecido biológico, com vistas à restauração, manutenção ou melhora da função do mesmo. Para isso se faz a deposição das células adequadas em estruturas produzidas a partir de materiais sintéticos ou naturais, às quais são adicionados fatores promotores do crescimento celular (LANGER e VACANTI, 1993). Essas estruturas, conhecidas como *scaffolds*, fornecem suporte temporário e arquitetura adequada para a produção de ECM pelas células (HUTMACHER, 2000).

No caso de lesões a serem tratadas através da abordagem da engenharia tecidual utilizando as estruturas conhecidas como *scaffolds*, é de suma importância fornecer um ambiente semelhante ao encontrado no tecido nativo às células, para que as mesmas possam manter seu fenótipo e metabolismo, que são fundamentais para a estruturação da cartilagem. Devido à habilidade de mimetizar a natureza de tecidos moles, os hidrogéis são promissores para a substituição temporária da matriz extracelular (TIBBITT e ANSETH, 2009).

3.2 Hidrogel

Hidrogéis são redes poliméricas capazes de reter água. A reticulação dos hidrogéis pode se dar de forma química ou física. A reticulação polimérica pode ocorrer por ligações covalentes, força iônica, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, fotorreticulação ou ainda induzidas por temperatura ou pH. Além disso, esses materiais podem apresentar carga iônica ou serem neutros e a rede polimérica formada pode ser amorfa, semicristalina, ligada por ligações de hidrogênio, entre outros (SLAUGHTER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2018).

Estes materiais podem apresentar uma ampla gama de propriedades e prestam-se a diferentes tipos de usos (BALAKRISHNAN e BANERJEE, 2011; PEPPAS *et al.*, 2000). Por exemplo, os hidrogéis são amplamente utilizados em aplicações biomédicas devido à sua estrutura porosa e à presença de água em seu interior, permitindo o transporte de solutos e nutrientes e a remoção de metabólitos.

Na engenharia tecidual de cartilagem os hidrogéis têm sido largamente estudados, sendo que, para este tipo de aplicação, devem-se produzir estruturas biocompatíveis, capazes de promover a diferenciação celular e a formação de uma

nova cartilagem, biodegradáveis em resposta à produção da nova cartilagem, porosas, mecanicamente estáveis e capazes de adesão e integração com o tecido nativo, além de preencherem a lesão ou defeito de forma adequada. Para isso, este tipo de material pode ser produzido com geometria e dimensões finais pré-definidas antes da inserção na lesão, ou um pré-gel pode ser injetado diretamente no local lesionado e lá passar pelo processo de reticulação (BALAKRISHNAN; BANERJE E, 2011; PEPPAS; HOFFMAN, 2013). Entre as formas de pré-formar o hidrogel tem-se as técnicas convencionais de produção de *scaffolds*, como a moldagem, a lixiviação com sais (*salt leaching*), a moldagem utilizando solventes (*solvent casting*), liofilização (*vacuum drying*), entre outros (HUTMACHER, 2001). Essas técnicas convencionais apresentam reprodutibilidade e versatilidade limitadas, por exemplo quanto à morfologia e conectividade dos poros. Por esse motivo, novas técnicas de biofabricação utilizando a manufatura aditiva para a produção de *scaffolds* têm se destacado nos últimos anos (GROLL *et al.*, 2016; GUNGOR-OZKERIM *et al.*, 2018).

3.3 Manufatura aditiva

A manufatura aditiva consiste em um processo em que sucessivas camadas de material são depositadas com precisão sobre uma superfície, formando uma estrutura tridimensional (ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2017). Diversas técnicas podem ser utilizadas, como: sinterização seletiva com laser; estereolitografia; polimerização de dois fótons; extrusão; jato de tinta; modelagem por deposição de material fundido; impressão 3D; entre outras. A técnica foi inicialmente desenvolvida como uma ferramenta para os setores de manufatura e consumo e, apenas recentemente, foi possível a impressão de biomateriais, permitindo a biofabricação de *scaffolds* (MORONI *et al.*, 2018; MURPHY e ATALA, 2014).

3.3.1 Biofabricação

A biofabricação, atualmente, foi definida como “a geração automatizada de produtos biológicos funcionais com organização estrutural de células vivas, moléculas bioativas, biomateriais, agregados celulares (como micro-tecidos, ou estruturas híbridas célula-material) através de bioimpressão ou *bioassembly*, seguida

de um processo de maturação do tecido” (GROLL *et al.*, 2016; MORONI *et al.*, 2018).

Esse processo de geração automatizada pode ser feito a partir de duas abordagens: a bioimpressão e a *bioassembly*. Ambas consistem na obtenção de estruturas organizadas bidimensionais (2D) ou tridimensionais (3D), de forma automatizada. A diferença entre essas abordagens está, principalmente, na unidade mínima formadora dessas estruturas. Na *bioassembly*, essas unidades formadoras estão em um estágio mais robusto, uma vez que seriam pré-formadas por auto-agregação celular ou pela combinação de células a um material, enquanto na bioimpressão empregam-se células livres ou pequenos agregados celulares. Em ambos os casos a manufatura aditiva pode ser utilizada em alguma das etapas de fabricação dessas estruturas (GROLL *et al.*, 2016; MORONI *et al.*, 2018). A bioimpressão é conhecida como a impressão de biomateriais contendo ou não células e fatores que promovem o crescimento celular, visando a obtenção de estruturas análogas às teciduais (MORONI *et al.*, 2018; MURPHY e ATALA, 2014).

Dentre as técnicas utilizadas para bioimpressão, apenas algumas possibilitam a simultânea deposição de células. As principais estratégias de bioimpressão consistem em jato de tinta, micro extrusão e assistida por laser. Esse processo de deposição pode ser feito utilizando-se diferentes estratégias, dependendo das características desejadas, como, por exemplo, resolução, viabilidade celular e tipo de material biológico. (MORONI *et al.*, 2018; MURPHY e ATALA, 2014).

Dentre essas técnicas, a extrusão é a comumente mais utilizada e mais acessível para impressão de materiais não-biológicos. Ademais, esta forma de bioimpressão permite a deposição de fibras do material com altas densidades celulares, podendo até depositar células organizadas em estruturas tridimensionais esféricas (esferoides). Esta característica é de suma importância para a produção de estruturas utilizadas na engenharia tecidual, uma vez que é necessário manipular densidades celulares fisiológicas (MURPHY e ATALA, 2014).

A vantagem da bioimpressão 3D quando comparada à outras técnicas de fabricação de *scaffolds* é a precisão de deposição, conseqüentemente se tem uma

morfologia controlada da estrutura e repetibilidade, e a possibilidade de ser utilizada com diversos materiais (STRATTON *et al.*, 2016; WOODFIELD *et al.*, 2004).

Para utilizar a bioimpressão 3D, o material a ser impresso deve atender a alguns requisitos levando-se em consideração as características desejadas da estrutura final, como: capacidade de impressão; biocompatibilidade; cinética de degradação e subprodutos; propriedades estruturais e mecânicas e biomimetismo do material (MURPHY e ATALA, 2014). Alguns desses requisitos podem ser avaliados de forma quantitativa, como as propriedades mecânicas, as quais devem ser semelhantes à do tecido que se deseja reparar ou substituir.

A capacidade de impressão do material, quando se utiliza impressão por extrusão, não é diretamente quantitativa, porém está associada a algumas características reológicas, como viscosidade, pseudoplasticidade e tensão limite de escoamento. A viscosidade do material deve ser suficientemente grande para que seja possível a deposição de fios bem definidos e a menor possível para reduzir a tensão cisalhante sobre as células. Para que o material possa formar filamentos ao ser depositado, é importante que a adesão e a tensão superficial do material sejam baixas, permitindo a formação de fios e não de gotas. Também é importante que o material apresente comportamento pseudoplástico, no qual se tem a redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, para que seja mais facilmente depositado, ademais, com a redução da viscosidade do material, a tensão cisalhante sobre as células também é reduzida, favorecendo a manutenção da viabilidade celular. Outra característica relevante é a tensão limite de escoamento, que é a tensão mínima que deve ser aplicada para que haja escoamento do material, deve ser alta o suficiente para que o material não escoe e colapse após a impressão (HOSPODIUK *et al.*, 2017; MALDA *et al.*, 2013).

Segundo Paxton e colaboradores (2017), o hidratante corporal Nívea Crème (creme Nívea) é um dos melhores materiais imprimíveis por extrusão e acessíveis. O hidratante, que foi estabelecido pela fabricante de bioimpressoras RegenHU como tinta de demonstração, é capaz de produzir estruturas dimensionalmente estáveis. Por esse motivo os autores verificaram que o creme apresenta comportamento pseudoplástico e ajustaram os dados ao Modelo de Ostwald de-Waele ou Lei de Potência (Equação 1):

$$\eta(\gamma) = k\gamma^{n-1}$$

Equação 1

onde η é a viscosidade, γ é a taxa de cisalhamento, k é o índice de consistência e n é o índice da Lei de Potência.

Os índices de consistência e da Lei de Potência, para o Nívea Crème, foram de 26,1 e 0,552 respectivamente. A viscosidade de impressão e tensão limite de escoamento do mesmo foram também avaliadas pelos autores, que relataram valores de 764 mPa.s e 72,1 Pa respectivamente (PAXTON *et al.*, 2017).

Dávila e d'Ávila (2017) também avaliaram reologicamente a capacidade de impressão dos materiais desenvolvidos por eles, compostos por alginato e laponita, através de curvas de viscosidade, ensaios oscilatórios de amplitude, oscilatórios de frequência e de recuperação da viscosidade após a submissão a altas tensões cisalhantes. Para a melhor tinta estudada, com o ajuste da Lei de Potência (Equação 1) obteve-se um índice de consistência de aproximadamente 300 Pa.sⁿ e $n = 0,069$. Após altas taxas de cisalhamento serem exercidas sobre o material, a recuperação de viscosidade foi de 95 a 100% após 250 s (DÁVILA e D'ÁVILA, 2017).

Li e colaboradores (2017) analisaram biotintas à base de alginato pré-reticulado e metilcelulose. A formulação considerada como a mais adequada pelos autores apresentou n de 0,23 e recuperou cerca de 60% da viscosidade depois de 60 s da remoção de uma taxa cisalhante de 500 s⁻¹ (LI *et al.*, 2017).

Além da capacidade de impressão, tendo em vista o tipo de aplicação desejada, alguns requisitos devem ser considerados para o estudo de biotintas utilizadas na engenharia tecidual de cartilagem.

3.4 Requisitos para bioimpressão de cartilagem

Algumas características importantes para uma biotinta estão sumarizadas na Tabela 1. Os requisitos para que se obtenha um material imprimível estão associados às características que o mesmo deve ter antes e após a impressão.

Tabela 1 – Requisitos de formulações úteis como biotinta para aplicação na engenharia tecidual, em processos de bioimpressão.

Requisitos da biotinta	Finalidade	Valor ou condição desejada	Observação	Referências
Viscosidade	Deve ser suficientemente grande para a deposição de fibras, porém a menor possível para reduzir a tensão cisalhante sobre as células	30 até mais que $6 \cdot 10^7$ mPa.s; 764 mPa.s para o Creme Nívea, considerado bastante adequado para este fim	Faixa genérica de viscosidade para impressão por extrusão	(MALDA <i>et al.</i> , 2013; MURPHY e ATALA, 2014; PAXTON <i>et al.</i> , 2017)
Pseudoplasticidade	Reduzir a tensão cisalhante durante o processo de impressão, pois aumentando-se a taxa cisalhante reduz-se a viscosidade em até uma ordem de magnitude	$K = 26,1$ e $n = 0,552$ para o Creme Nívea	K e n são coeficientes pseudoplásticos do modelo da Lei de Potência ($\eta = K\gamma^{n-1}$)	(MALDA <i>et al.</i> , 2013; PAXTON <i>et al.</i> , 2017)
Tensão limite de escoamento	Deve ser suficientemente alta para que a estrutura não escoe e colapse	72,1 Pa para o Creme Nívea		(MALDA <i>et al.</i> , 2013; PAXTON <i>et al.</i> , 2017)
Tipo de reticulação	Aumenta a estabilidade da estrutura. Pode ser física, química ou uma combinação de ambas	Reticulação física (iônica) devido às condições mais amenas	Solução de SrCl_2 50 mM	(MALDA <i>et al.</i> , 2013; MØRCH <i>et al.</i> , 2006)
Propriedades mecânicas	Devem ser da mesma ordem de grandeza da cartilagem nativa	Módulo elástico: • Zona superficial: $0,28 \pm 0,16$ MPa • Zona profunda: $0,73 \pm 0,26$ MPa Módulo agregado: $0,44 \pm 0,24$ MPa	Valores para cartilagem humana em ensaios de compressão	(MURPHY e ATALA, 2014; O'CONNELL; GARCIA e AMIR, 2017)
Permeabilidade	Deve ser da mesma ordem de grandeza da cartilagem nativa	$0,99 \times 10^{-15} \text{ m}^4\text{N}^{-1}\text{s}^{-1}$	Valor para cartilagem humana em ensaio de compressão	(O'CONNELL; GARCIA e AMIR, 2017)
Cinética de degradação	Deve ser adequada à taxa de produção de ECM pelas células	Meia vida de proteínas da cartilagem entre 3,4 e 2779 dias	Estimativa feita pela desaminação de proteínas	(HSUEH <i>et al.</i> , 2018; MURPHY e ATALA, 2014)
Biocompatibilidade	Deve ser biocompatível	Viabilidade celular superior à 70%	Ensaio de citotoxicidade	(ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009; MURPHY e ATALA, 2014)

Inicialmente se avalia reologicamente a capacidade de extrudar o material, pela avaliação da pseudoplasticidade do mesmo. Em seguida, deve-se estabilizar a estrutura impressa logo após a impressão, utilizando um material que não colapse após a deposição. Essa estabilidade também pode ser avaliada pela reologia do material, através da viscosidade e tensão limite de escoamento. A reticulação após a impressão é feita devido à necessidade de manipular a estrutura impressa sem que haja perda de sua geometria e para conferir alguma resistência mecânica ao *scaffold* impresso. Dentre os possíveis tipos de reticulação, a iônica é utilizada por apresentar condições mais amenas durante o processo.

Ademais, o material deve possuir as propriedades mecânicas adequadas para o tipo de aplicação, ter uma taxa de degradação semelhante à taxa de regeneração do novo tecido, não produzir produtos de degradação tóxicos e ser biocompatível.

Uma vez que as características desejadas foram definidas, encontraram-se na literatura alguns valores para cada uma delas, apresentados na Tabela 1, para que possam ser utilizados como valores de referência no estudo de formulações de biotintas, sendo que, dentre os requisitos listados, apenas as propriedades mecânicas, permeabilidade e cinética de degradação estão associados ao tecido que se deseja regenerar. As demais são características desejáveis em qualquer biotinta.

Dentro desta temática, diversos trabalhos têm estudado formulações de materiais para utilização como biotinta, sendo que comumente se utiliza mais de um componente, visando a obtenção das características desejadas. Entre os componentes adicionados às formulações, o alginato é largamente empregado, devido à capacidade de reticular ionicamente em condições suaves (AXPE e OYEN, 2016; CHUNG *et al.*, 2013; FREEMAN e KELLY, 2017; GAO *et al.*, 2018; KUNDU *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; MARKSTEDT *et al.*, 2015; OUYANG *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2019).

Kundu e colaboradores (2015) combinaram a policaprolactona, visando a resistência mecânica e a estabilidade da estrutura, com alginato, possibilitando a deposição de células em condições mais amenas e a reticulação iônica após a impressão. Os autores avaliaram a adição de TGF β (fator de crescimento

transformante β) ao alginato, bem como a utilização de diferentes concentrações do polissacarídeo. Ao adicionar o TGF β foi observada uma formação de ECM mais expressiva quando comparada à do alginato apenas. Notou-se também que ao aumentar a concentração da solução de alginato de 4% para 6% a formação de ECM diminuiu (KUNDU *et al.*, 2015).

Outro polissacarídeo que, assim como o alginato, reticula ionicamente é a kappa-carragena, que, além disso, também reticula termicamente. Por esse motivo ela foi combinada com o nanosilicato, que é altamente pseudoplástico, no estudo desenvolvido por Wilson e colaboradores (2017). Para avaliar as características reológicas do material, foram ajustados os dados da curva de viscosidade à Lei de Potência, obtendo-se um n de aproximadamente 0,5 para diferentes concentrações de nanosilicato e 2,5% de kappa-carragena. Os autores também avaliaram a capacidade de recuperar a viscosidade do material após a aplicação de altas taxas cisalhantes, obtendo recuperações de cerca de 69% e 99% para a kappa-carragena e para a kappa-carragena contendo nanosilicato respectivamente. Além disso, analisaram a viabilidade de pré-osteoblastos murinos após impressão e observaram que a viabilidade se manteve estável durante 7 dias, porém a falta de adesividade da matriz de kappa-carragena limitou a proliferação celular (WILSON *et al.*, 2017).

Em outro estudo, os autores combinaram alginato com colágeno ou agarose para a bioimpressão com foco na engenharia tecidual de cartilagem. Tanto as propriedades mecânicas quanto a bioatividade foram avaliadas e se mostraram melhores com a adição de agarose ou colágeno, sendo que resultados mais expressivos para ambas as propriedades foram obtidos com a incorporação de colágeno à biotinta (YANG *et al.*, 2018).

Chung e colaboradores (2013), por sua vez, combinaram alginato e gelatina, a qual reticula termicamente, em sua biotinta. Controlando a temperatura, a qual foi mantida em 5 °C, foi possível obter um material com boa capacidade de impressão e comportamento de gel, diferente do que ocorre quando se utiliza apenas o alginato ou o alginato pré-reticulado. Ainda comparando o alginato com a biotinta a base de alginato e gelatina, o módulo de elasticidade dos materiais em ambos os casos foram similares, notando que o mesmo aumentou de forma proporcional à concentração de alginato. Na avaliação de degradação da biotinta

após a impressão e reticulação, notaram que o material perde mais de 60% do módulo de elasticidade em 7 dias. Também analisaram a viabilidade celular de mioblastos até 48h após a impressão. A viabilidade celular se manteve ao longo do período, porém não houve proliferação celular, provavelmente pelo curto período de tempo estudado (CHUNG *et al.*, 2013).

Outro estudo que combinou alginato e gelatina foi o desenvolvido por Ouyang e colaboradores (2016). Eles desenvolveram uma forma semi-quantitativa de avaliar a capacidade de impressão do material quantificando a circularidade do poro da estrutura impressa, uma vez que materiais com melhor capacidade de impressão são capazes de manter a estrutura retangular do poro e, conseqüentemente, apresentar menor circularidade. A capacidade de impressão e a viabilidade celular foram avaliadas em diferentes temperaturas, devido à termossensibilidade da gelatina, e concentrações de gelatina. Os pesquisadores puderam concluir que, no intervalo de 22,5 °C a 30 °C e 5 a 10% de concentração de gelatina, a capacidade de impressão melhora com o aumento da concentração de gelatina e redução da temperatura e a viabilidade celular diminui nessas condições. Assim, foi necessário comprometer a capacidade de impressão para manter a viabilidade celular, que é um problema comumente reportado na literatura para a formulação de biotintas (OUYANG *et al.*, 2016).

O colágeno é uma proteína sintetizada por fibroblastos, sendo a mais abundante em mamíferos. Desempenha relevante papel estrutural e, por esse motivo, está presente principalmente em tecidos de função mecânica (LEE; SINGLA e LEE, 2001). A hidrólise do colágeno gera outra proteína, que é a gelatina. No entanto, a principal origem dessas proteínas é porcina e bovina, o que pode despertar uma resposta imune quando utilizadas interespecies devido às diferenças entre as macromoléculas de cada espécie (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011; LYNN; YANNAS e BONFIELD, 2004).

Ainda evidenciando a combinação de mais de um material para compor a biotinta, pode-se citar o trabalho desenvolvido por Markstedt e colaboradores (2015). Neste caso utilizou-se o alginato e a nanocelulose, que foram misturados em diferentes proporções, obtendo-se uma faixa de propriedades mecânicas, indicando que as diferentes formulações poderiam ser utilizadas em aplicações que exigem

propriedades mecânicas distintas. Os autores também verificaram a viabilidade de condrócitos em dois momentos: após a impressão seguida da reticulação e incorporados à biotinta mas não impressos. Obtiveram uma viabilidade de aproximadamente 70% em ambos os casos, indicando que a morte celular ocorreu, principalmente, devido à etapa de mistura das células ao material e não devido ao processo de impressão do material. Dessa forma, os pesquisadores puderam concluir que obtiveram um material adequado para a bioimpressão de tecidos e órgãos que poderia ser utilizado, principalmente, para fins de diagnóstico (MARKSTEDT *et al.*, 2015).

Assim, tendo em vista o foco de aplicação do presente trabalho e os estudos já encontrados na literatura, para a estabilização da estrutura durante e após a impressão optou-se pela utilização do alginato combinado com nanocelulose e goma xantana, que se comportam pseudoplasticamente, melhorando a capacidade de impressão do material.

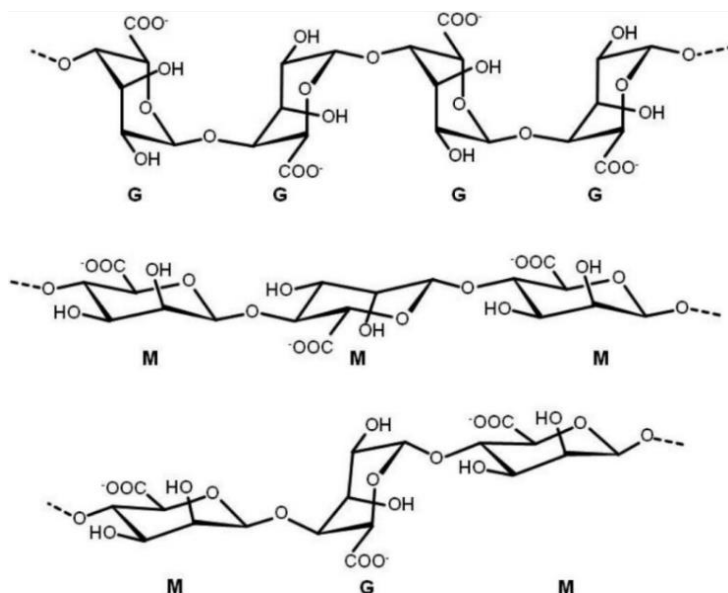
3.5 Alginato

O alginato é um polímero hidrofílico de origem natural, produzido usualmente a partir das algas marrons, extensivamente utilizado em aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixo custo e gelificação em condições amenas na presença de íons bivalentes (LEE e MOONEY, 2012; ONSØYEN, 1997). A cadeia polimérica do alginato se caracteriza pela ausência de ramificações, sendo formada por ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G). Estes ácidos podem estar arranjados em blocos M, G ou alternados em blocos MG (Figura 3) (SMIDSRØD e SKJÅK-BRÆK, 1990), sendo que o tamanho e a flexibilidade desses blocos diminui conforme a ordem: MG>M>G (SMIDSRØD; GLOVER e WHITTINGTON, 1973).

A composição e a sequência dos monômeros pode variar de acordo com a fonte do alginato, o qual pode ser extraído de diversas variedades de algas marrons, como: *Laminaria hyperborea*; *Macrocystis pyrifera*; *Ascophyllum nodosum*; *Laminaria digitata*; *Laminaria japonica*; *Eclonia maxima*; *Lesonia negrescens* e *Sargassum* sp. A composição com relação aos grupos G de alginatos provenientes de diferentes algas encontra-se na Tabela 2, onde F_G é a fração molar de ácido

gulurônico e $N_{G>1}$ é o número médio de unidades consecutivas nos blocos G (SMIDSRØD e SKJÅK-BRÆK, 1990).

Figura 3 – Estrutura molecular do alginato.



Fonte: Lee; Mooney, 2012 ².

Tabela 2 – Composição e parâmetros de sequência de alginatos de diversas fontes.

F_G refere-se à fração molar de ácido gulurônico e $N_{G>1}$ ao número médio de unidades consecutivas nos blocos G.

Fonte	F_G	$N_{G>1}$
<i>A. nodosum</i>	0,10	3,0
<i>D. antarctica</i>	0,29	n.d.
<i>L. japonica</i>	0,34	n.d.
<i>A. nodosum</i>	0,36	3,9
<i>M. pyrifera</i>	0,39	5,0
<i>E. maxima</i>	0,45	5,4
<i>L. digitata</i>	0,41	6,0
<i>L. hyperborea</i>		
Folha	0,55	7,3
Estipe	0,68	10,3
Córtex exterior	0,75	17,5

Fonte: Adaptado de Smidsrød; Skjåk-Bræk, 1990 ³.

² Reimpressa de Progress in Polymer Science, 37, Kuen Yong Lee and David J. Mooney, Alginate: Properties and biomedical applications, pages 106-126, Copyright 2012, com permissão da Elsevier.

³ Reimpressa de Trends in Biotechnology, 8, Olav Smidsrød and Gudmund Skjåk-Bræk, Alginate as immobilization matrix for cells, pages 71-78, Copyright 1990, com permissão da Elsevier.

Ademais, o alginato também pode ser produzido por bactérias *Pseudomonas* e *Azotobacter vinelandii*, porém os autores reportaram a predominância de ácido manurônico na composição dos polímeros produzidos e apenas pequenas quantidades de ácido gulurônico (GORIN e SPENCER, 1966; LINKER e JONES, 1964). No entanto, os avanços na regulação da produção de alginato por bactérias e a fácil modificação das mesmas pode permitir a obtenção de alginato com características específicas, como composição e massa molecular, específicas, de acordo com a necessidade da aplicação desejada (LEE e MOONEY, 2012).

Este composto apresenta caráter aniônico em pH acima de 3,7. Além disso, quando dissolvido em água produz soluções altamente viscosas, cuja viscosidade está associada à extensão das cadeias poliméricas e, consequentemente, à massa molar do alginato (SMIDSRØD, 1970), a qual usualmente varia entre 20.000 e 600.000 g/mol (ONSØYEN, 1997).

A massa molar do alginato pode ser medida por diferentes técnicas, como: cromatografia por exclusão de tamanho; espalhamento de luz; osmometria e viscosimetria (MARTINSEN *et al.*, 1991). Dentre essas técnicas, a viscosidade é comumente utilizada na estimativa da massa molar viscosimétrica de polissacarídeos.

Para isso faz-se necessário então estimar a viscosidade intrínseca da solução do polímero em um solvente apropriado, a qual pode ser calculada a partir dos tempos de escoamento de soluções do solvente puro e do solvente contendo o polímero em diferentes concentrações, através de um capilar de diâmetro conhecido. A partir desses tempos é possível calcular as viscosidades relativa (η_r), específica (η_{esp}), reduzida (η_{red}) e inerente (η_{ine}), apresentadas na Equação 2, na Equação 3, na Equação 4 e na Equação 5 (LUCAS; SOARES e MONTEIRO, 2001) (LUCAS; SOARES e MONTEIRO, 2001):

$$\eta_r = t/t_0 \quad \text{Equação 2}$$

$$\eta_{esp} = \eta_r - 1 = \frac{t - t_0}{t_0} \quad \text{Equação 3}$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{c} \quad \text{Equação 4}$$

$$\eta_{ine} = \frac{\ln \eta_r}{c} \quad \text{Equação 5}$$

onde c é a concentração polimérica, t é o tempo de escoamento da solução polimérica e t_0 o tempo do solvente.

De posse das viscosidades reduzidas e inerentes para diferentes concentrações poliméricas, é possível estimar a viscosidade intrínseca pelas equações de Huggins e Kraemer, representada pela Equação 6 e pela Equação 7, respectivamente (LUCAS; SOARES e MONTEIRO, 2001):

$$\frac{\eta_{esp}}{c} = [\eta] + K' \cdot [\eta]^2 \cdot c \quad \text{Equação 6}$$

$$\frac{\ln \eta_r}{c} = [\eta] + K'' \cdot [\eta]^2 \cdot c \quad \text{Equação 7}$$

onde K' é a constante de Huggins e K'' é a constante de Kraemer.

Ainda, nos casos em que a variação da viscosidade reduzida com a concentração apresenta curvatura considerável devido ao comportamento não-newtoniano do fluido no intervalo de concentração analisado, pode-se utilizar a equação de Martin (Equação 8) para o cálculo da viscosidade intrínseca (LUCAS; SOARES e MONTEIRO, 2001).

$$\log\left(\frac{\eta_{esp}}{c}\right) = \log[\eta] + K''' \cdot [\eta] \cdot c \quad \text{Equação 8}$$

Uma vez estimada a viscosidade intrínseca, pode-se utilizar a equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 9).

$$[\eta] = K \cdot M_v^a \quad \text{Equação 9}$$

onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, K e a são constantes da equação associadas ao par polímero-solvente à uma temperatura específica e M_v é a massa molar viscosimétrica.

Ainda, a está associado à rigidez da molécula no solvente escolhido, uma vez que polímeros mais flexíveis apresentam menor α (LUCAS; SOARES e MONTEIRO, 2001).

As diferentes composições e sequência de blocos na estrutura do alginato podem alterar significativamente a rigidez da cadeia e, conseqüentemente, os parâmetros K e α da equação de Mark-Houwink-Sakurada (MARTINSEN *et al.*, 1991). Assim, alguns valores desses parâmetros foram sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores dos parâmetros K e α a 25 °C.

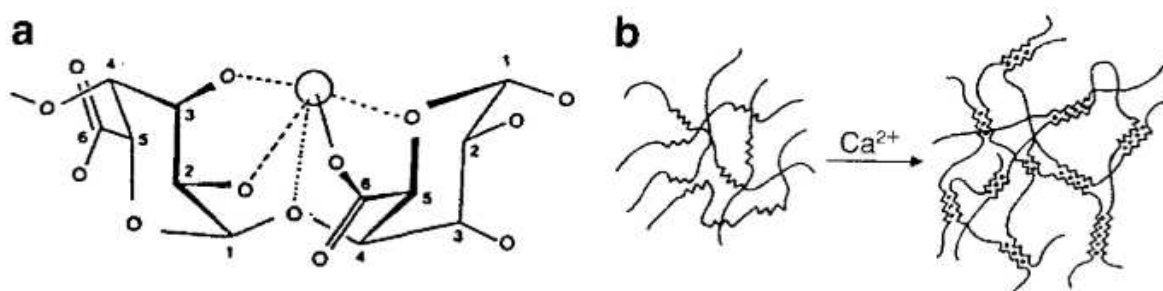
K (dL/g) em 0,1M NaCl	α	Fonte do alginato	Referência
2,00E-05	1	Não menciona	(SMIDSRØD e HAUG, 1968)
2,00E-05	1	<i>Laminaria digitata</i>	(SMIDSRØD, 1974)
2,00E-05	0,97	<i>Ascophyllum nodosum</i> e <i>Laminaria digitata</i>	(RINAUDO e GRAEBLING, 1986)
1,23E-04	0,963	<i>Laminaria cloustoni</i>	(MANCINI; MORESI e SAPPINO, 1996) Dados calculados a partir de (DONNAN e ROSE, 1950)
6,90E-06	1,13	<i>Laminaria hyperborea</i>	(MARTINSEN <i>et al.</i> , 1991)
7,30E-05	0,92	<i>Macrocystis pyrifera</i>	(MARTINSEN <i>et al.</i> , 1991)

Ainda sobre os blocos formadores do polissacarídeo, estes também são capazes de se ligarem à íons bivalentes, como Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} , formando géis ionotrópicos, com propriedades que dependem da composição e sequência dos blocos. Quando a gelificação ionotrópica ocorre, observa-se redução do volume inicial da solução após a reticulação. Essa redução é menos significativa para alginatos de fração de ácido gulurônico menores do que 0,1 e maiores do que 0,6, para os quais se observou uma redução de volume de cerca de 15% apenas (SMIDSRØD e HAUG, 1972; SMIDSRØD; HAUG e LIAN, 1972).

No processo de gelificação existe uma maior seletividade pelos blocos G, os quais formam cavidades que funcionam como sítios de ligação para os íons (Figura 4a), sendo que essa seletividade é maior quando se utiliza o estrôncio como íon reticulante ao invés do cálcio. Além disso, a estabilidade do complexo formado

aumenta com o aumento do tamanho da cadeia e, em cadeias longas o suficiente, ocorre a associação de cadeias poliméricas, gerando a estrutura descrita pelo modelo da “caixa de ovos” (Figura 4b) (GRANT *et al.*, 1973; SMIDSRØD e SKJÅK-BRÆK, 1990).

Figura 4 – Esquema da ligação entre o íon de cálcio (círculo grande) e um par de cadeias guluronato do alginato (a) e do modelo da “caixa de ovos” para a formação do gel de alginato (b).

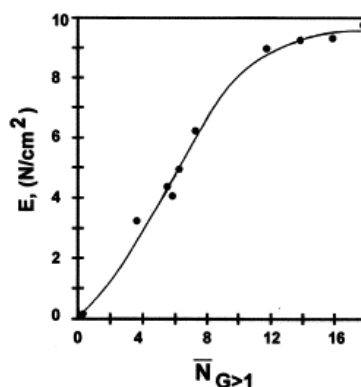


Fonte: Smidsrød; Skjåk-Bræk, 1990 ³.

A estrutura do tipo “caixa de ovos” formada permite a obtenção de géis com maior resistência mecânica, uma vez que esta é conferida aos géis, principalmente, pelas junções formadas na mesma (SMIDSRØD, 1974). De forma geral, a resistência mecânica do gel aumenta com o aumento da concentração polimérica, do conteúdo e extensão dos blocos G e da massa molecular média das cadeias poliméricas (MARTINSEN; SKJÅK-BRÆK e SMIDSRØD, 1989; MØRCH *et al.*, 2008).

Desta forma, alginatos com maior conteúdo de blocos G produzem géis mais fortes e mais porosos, apresentando maior estabilidade frente à cátions monovalentes (MARTINSEN; SKJÅK-BRÆK e SMIDSRØD, 1989). Além disso, o aumento da extensão desses blocos também aumenta a rigidez do gel obtido (Figura 5), sendo que a partir de 12 unidades seguidas de ácido gulurônico não se tem aumento significativo no módulo de elasticidade do material (DRAGET; SKJÅK-BRÆK e SMIDSRØD, 1997). Ainda, a resistência do gel após a reticulação de alginatos com alto conteúdo de ácido gulurônico aumenta com o aumento da massa molar média, sendo que a partir de 240.000 g/mol não se observa mais essa dependência (MARTINSEN; SKJÅK-BRÆK e SMIDSRØD, 1989).

Figura 5 – Módulo de elasticidade de géis de alginato reticulados com íons de cálcio em função do comprimento médio dos blocos G.



Fonte: Draget; Skjåk-Bræk; Smidsrød, 1997 ⁴.

Em estudos mais recentes se propôs que longos blocos MG também se associem com outros blocos G e MG, como estabelecido, inicialmente, apenas para blocos G no modelo da “caixa de ovos”. Assim, existem três tipos de junções possíveis para a reticulação do alginato (DONATI *et al.*, 2005).

Segundo Donati e colaboradores (2005) a formação de junções G/MG no gel de alginato promove um aumento no módulo elástico do material. No entanto, a presença das junções MG/MG promove a sinérese do gel, que está de acordo com o reportado anteriormente por Smidsrød e Haug (1972), que consiste em uma lenta redução de volume do gel com o aumento da concentração de cálcio, devido à exsudação de água do gel. Este efeito também causa a redução do módulo elástico do material e está diretamente associado à extensão dos blocos MG (DONATI *et al.*, 2005; SMIDSRØD e HAUG, 1972).

A reticulação do alginato e formação do gel mencionada acima pode ser feita de duas formas: interna ou externa. No primeiro caso comumente se utiliza carbonato de cálcio (CaCO_3), que pode ser solubilizado através da redução do pH ou pela adição de D-glucono- δ -lactona (GDL). A utilização de CaCO_3 e GDL permite a gelificação em uma gama de pHs e a obtenção de um gel homogêneo. Para isso é importante utilizar uma solução de GDL preparada recentemente, evitando que já se adicione a lactona completamente hidrolisada, que causará gelificação instantânea e incontrolável (DRAGET; ØSTGAARD e SMIDSRØD, 1989; INGAR DRAGET; ØSTGAARD e SMIDSRØD, 1990), como acontece no caso da gelificação externa.

⁴ Reimpressa de International Journal of Biological Macromolecules, 21, Kurt Ingar Draget, Gudmund Skjåk-Bræk and Olav Smidsrød, Alginate based new materials, pages 47-55, Copyright 1997, com permissão da Elsevier.

Na gelificação externa, tem-se a adição da solução contendo íons gelificantes de forma externa à solução de alginato, assim os íons se difundem para a solução do polímero, resultando em baixa homogeneidade devido à distribuição não uniforme da concentração polimérica, que é menor no centro da estrutura. A homogeneidade é prejudicada por alguns fatores como: baixa concentração de íons cálcio; baixa massa molar do alginato; altas concentrações de alginato e ácido gulurônico. Para obter géis com maior homogeneidade de concentração polimérica pode-se adicionar íons não gelificantes, como reportado por Skjåk-Bræk, Grasdalen e Smidsrød (1989). Os autores estudaram a adição de íons de sódio e magnésio e obtiveram géis homogêneos. Para isso utilizaram uma solução de alginato ($F_G = 0,71$) de 2% (m/v) e uma solução reticulante de CaCl_2 (0,05 mol/L) contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio e magnésio. Os autores observaram homogeneidade do gel tanto com cloreto de sódio quanto com cloreto de magnésio. No entanto, com o cloreto de magnésio a homogeneidade foi obtida com uma concentração de 0,05 mol/L, enquanto com o cloreto de sódio foi necessária uma concentração de 0,2 mol/L (SKJÅK-BRÆK; GRASDALEN e SMIDSRØD, 1989).

Para os dois tipos de gelificação mencionados acima, o íon gelificante mais comumente utilizado é o de cálcio. Porém a afinidade do alginato com íons reticulantes bivalentes diminui conforme a seguinte ordem: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ (HAUG e SMIDSRØD, 1970; MØRCH *et al.*, 2006). Além disso, o aumento da concentração de Ca^{2+} estimula a produção de colágeno tipo X pelos condrócitos, que está associado à calcificação da matriz extracelular e à diferenciação dos condrócitos em células hipertróficas em cartilagem afetada pela osteoartrite (BONEN e SCHMID, 1991; MARK *et al.*, 1992).

Por outro lado, o íon de estrôncio (Sr^{2+}), além de apresentar maior afinidade com o alginato, estimula a produção de proteoglicanos pela cartilagem (HENROTIN *et al.*, 2001), sendo que seu uso como ranelato de estrôncio auxilia no tratamento da osteoartrite, reduzindo a dor e melhorando a funcionalidade e rigidez da cartilagem (BRUYÈRE *et al.*, 2014; REGINSTER *et al.*, 2013).

Ademais, Smidsrød (1974) reportou um aumento de cerca de 50% no módulo de rigidez do gel de alginato de concentração de 3% (m/v) ($F_G = 0,385$)

reticulado com estrôncio, quando comparado ao reticulado com cálcio, para uma mesma concentração dos íons (0,34 mol/L) (SMIDSRØD, 1974).

Em outro estudo se avaliou a lixiviação do alginato em solução salina (0,9% NaCl) de partículas do material reticuladas com soluções de íon de cálcio e de estrôncio, durante 24 h, ambas na concentração de 0,1 mol/L. Foi reportado que as partículas reticuladas com estrôncio tiveram frações menores de alginato lixiviadas ao longo do tempo (STOKKE *et al.*, 1993), indicando sua maior estabilidade quando comparado ao alginato reticulado com cálcio.

Mørch e colaboradores (2006) produziram micropartículas de alginato de diferentes composições reticuladas com íons de cálcio, bário e estrôncio, utilizando soluções com concentração entre 10 e 50 mmol/L. O gel reticulado com estrôncio apresentou melhor estabilidade dimensional, medida após 10 minutos e 24 h em solução reticulante, e maior resistência quando comparado ao reticulado com cálcio. Porém, reportou-se que o íon de estrôncio é capaz de ligar-se apenas aos blocos G do alginato (MØRCH *et al.*, 2006). Assim, para utilização desse íon reticulante é importante que alginatos com alto teor de ácido gulurônico sejam utilizados.

Kaklamani e colaboradores (2014) avaliaram a reticulação externa do alginato utilizando íons de cálcio e estrôncio nas concentrações de 1, 2 e 5 mol/L durante 60 minutos, avaliando o módulo elástico do gel reticulado a cada 10 minutos. Em seu estudo observaram que o tempo necessário para reticular com estrôncio ou com cálcio é semelhante, porém os materiais produzidos com estrôncio apresentaram maior heterogeneidade e menor módulo elástico quando comparadas às reticuladas com cálcio. Também avaliaram a reticulação em meio de cultivo celular ao invés de água como solvente da solução reticulante e não encontraram diferenças quanto aos módulos de elasticidade dos géis e tempo necessário para reticulação. Além disso, verificaram a viabilidade celular de fibroblastos incorporados ao gel e reticulados em meio de cultivo com as três concentrações de cálcio estudadas durante 60 minutos. Verificaram que as células se mantiveram viáveis por, pelo menos, 24 h após a gelificação (KAKLAMANI *et al.*, 2014).

A diferença verificada no módulo elástico encontrada pode ter ocorrido devido à composição de blocos do alginato utilizado, uma vez que já se reportou que o estrôncio reticula apenas com blocos G. Já segundo os autores, a fonte dos

menores módulos elásticos ao reticular com Sr^{2+} se deve à menor densidade de carga da superfície do estrôncio quando comparada à do cálcio (KAKLAMANI *et al.*, 2014). Outra possível razão para essa redução do módulo de elasticidade é o fato de este estudo ter utilizado concentrações mais altas de íons reticulantes e tempos mais curtos de reticulação quando comparado com os outros estudos discutidos na presente revisão bibliográfica.

Leroux, Guilak e Setton (1999) avaliaram as propriedades mecânicas do gel de alginato de alta razão de ácido manurônico para gulurônico (1,67), utilizando concentrações de alginato entre 1 e 3% (m/v) e reticulação por 1,5 h em solução de cloreto de cálcio 50 mmol/L. Na faixa de concentrações de alginato testadas nota-se um aumento das propriedades mecânicas, como o módulo de compressão no equilíbrio, com o aumento da concentração de polímero (LEROUX; GUILAK e SETTON, 1999).

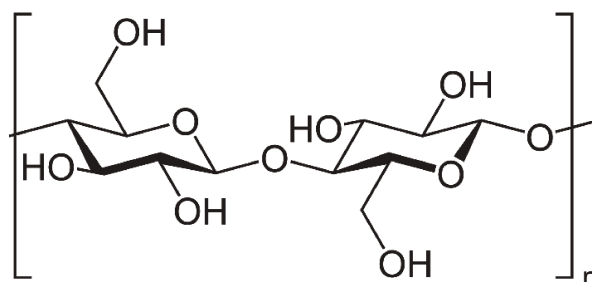
Markstedt e colaboradores (2015) melhoraram a capacidade de impressão do alginato ($F_G > 0,60$) através da adição de nanocelulose. Para isso soluções poliméricas de 2,5% (m/v) foram misturadas em diferentes proporções e, após deposição por impressão 3D, reticuladas com uma solução de cloreto de cálcio 90 mM durante 10 minutos. As composições que apresentaram melhores propriedades mecânicas foram as contendo 70 e 80% em massa da solução de nanocelulose na mistura final. Desta forma, a nanocelulose pode ser utilizada para melhorar a reologia do material para impressão 3D (MARKSTEDT *et al.*, 2015) e será abordada a seguir.

3.6 Nanocelulose

A celulose é o polímero orgânico mais abundante no mundo e a sua elevada disponibilidade faz com que ela apresente baixo custo (MALAFAYA; SILVA e REIS, 2007; SAXENA e BROWN JR, 2005). A celulose é um polissacarídeo extracelular, hidrofílico e de cadeia linear, usualmente proveniente da parede celular de plantas, formado pela união de cadeias de glicanas, as quais são formadas por moléculas de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, sendo que cada unidade é rotacionada cerca de 180° , como ilustrado na Figura 6. As interações intra e intermoleculares permitem o arranjo cristalino das cadeias de glicanas em

microfibrilas, (BROWN; SAXENA e KUDLICKA, 1996) e o grau de cristalinidade pode ser medido por Difração de Raio X (DRX) ou Calorimetria Diferencial de Varredura (CDV) (BERTRAN e DALE, 1986; GJÖNNES; NORMAN e VIERVOLL, 1958).

Figura 6 – Representação estrutural da cadeia de β -1,4-glicano (celulose). O monômero, celobiose, está indicado entre colchetes.



As microfibrilas se associam lateralmente para formar a estrutura da celulose e conferir estabilidade estrutural, reduzindo a flexibilidade da parede celular de plantas. A depender da planta de origem, a celulose apresenta diferente massa molar, estado e grau de cristalinidade. No entanto, independente da fonte celulósica, suas fibras apresentam elevada resistência, o que as faz insolúveis em água apesar de sua hidrofiliidade (BROWN; SAXENA e KUDLICKA, 1996). Estas características têm despertado grande interesse na utilização da celulose na forma de nanocelulose, devido à alta área superficial desse tipo de material. A nanocelulose é assim denominada quando pelo menos uma de suas dimensões é nanométrica, sendo que o diâmetro da fibra pode ser medido por Microscopia de Força Atômica (MFA), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-EC) (KLEMM *et al.*, 2011).

Existem três tipos de nanocelulose: celulose microfibrilada (CMF); celulose nanocristalina (CNC) e nanocelulose bacteriana (NCB). Algumas características destes três tipos de material estão apresentadas na Tabela 4.

A celulose microfibrilada é produzida através de um tratamento mecânico, como a passagem por um homogeneizador de alta pressão, para delaminar as fibras celulósicas presentes em uma suspensão e possibilitar a liberação das microfibrilas da estrutura celulósica. Este processo de produção tem sido estudado, visando a otimização do mesmo com relação ao gasto energético demandado, para que a

utilização das nanofibras seja economicamente viável (KLEMM *et al.*, 2011). No Brasil, a Suzano Papel e Celulose instalou uma planta de escala piloto em sua unidade de Limeira, no interior do estado de São Paulo, em que combina processo químico e mecânico para a produção de CMFs de diâmetro inferior à 100 nm e com uma capacidade produtiva de 155 kg de nanofibras secas por dia, indicando a melhora da viabilidade econômica do processo.

Tabela 4 – Características dos diferentes tipos de nanocelulose.

Tipo de nanocelulose	Sinônimos	Fontes típicas	Formação e tamanho médio
Celulose microfibrilada (CMF)	Nanofibrilas, microfibrilas, celulose nanofibrilada	Madeira, beterraba, batata, cânhamo e linho	Delaminação da polpa da madeira por pressurização mecânica antes e/ou após tratamento químico ou enzimático. Diâmetro: 5-60 nm Comprimento: vários micrômetros
Celulose nanocristalina (CNC)	Nanocristal de celulose, cristalitos, <i>whiskers</i>	Madeira, algodão, cânhamo, linho, palha de trigo, casca de amora, rami, celulose de alga e bactéria	Hidrólise ácida da celulose de diferentes fontes. Diâmetro: 5-70 nm Comprimento: 100-250 nm (plantas), 100 nm a vários micrômetros (alga e bactéria)
Nanocelulose bacteriana (NCB)	Celulose bacteriana ou microbiana, biocelulose	Açúcares e álcoois de baixa massa molecular	Síntese bacteriana. Diâmetro: 20-100 nm, diferentes tipos de redes de nanofibras

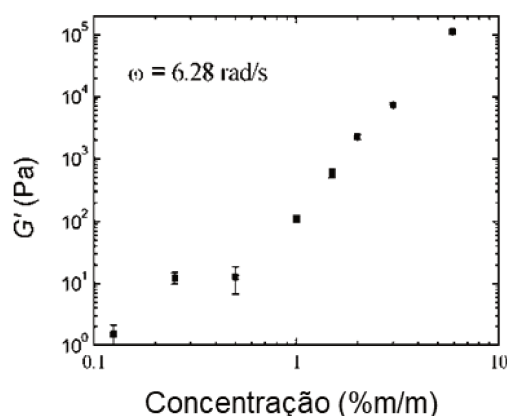
Fonte: Traduzida de Klemm *et al.*, 2011.

Já os nanocristais de celulose são produzidos a partir da remoção das zonas amorfas das CMFs por hidrólise ácida, seguida de tratamento ultrassônico (KLEMM *et al.*, 2011). Assim, a CNC apresenta comprimentos menores que a CMF, não permitindo o entrelaçamento de cadeias poliméricas, que, segundo Samir e colaboradores (2004) e Siqueira, Bras e Dufresne (2009), proporciona resistência mecânica superior à CMF se compara à CNC (SAMIR *et al.*, 2004; SIQUEIRA; BRAS e DUFRESNE, 2009).

Além disso, Pääkkö e colaboradores (2007) reportaram um aumento do

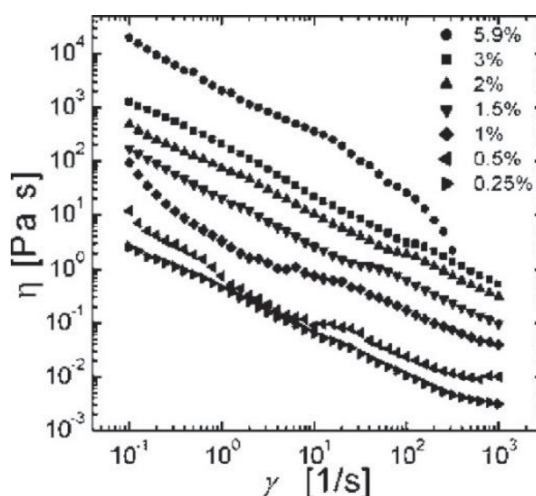
módulo de armazenamento (G'), associado ao comportamento de gel, com o aumento da concentração de CMF para o intervalo de concentrações analisado entre 0,25 e 5,9% em massa (Figura 7). Também observaram um comportamento altamente pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. A pseudoplasticidade do material foi evidenciada para todas as concentrações estudadas (Figura 8) (PÄÄKKÖ *et al.*, 2007), o que indica que a suspensão de CMF seja um material atraente para impressão tridimensional.

Figura 7 – Módulo de armazenamento (G') em função da concentração de CMF a 25°C e frequência de 1 Hz ($\omega = 6,28$ rad/s).



Fonte: Traduzida de Pääkkö et al., 2007 ⁵.

Figura 8 – Influência da tensão de cisalhamento (ou taxa de deformação, $\dot{\gamma}$) sobre a viscosidade (η) de suspensões de diferentes concentrações (%m/m) de CMF.



Fonte: Pääkkö et al., 2007 ⁵.

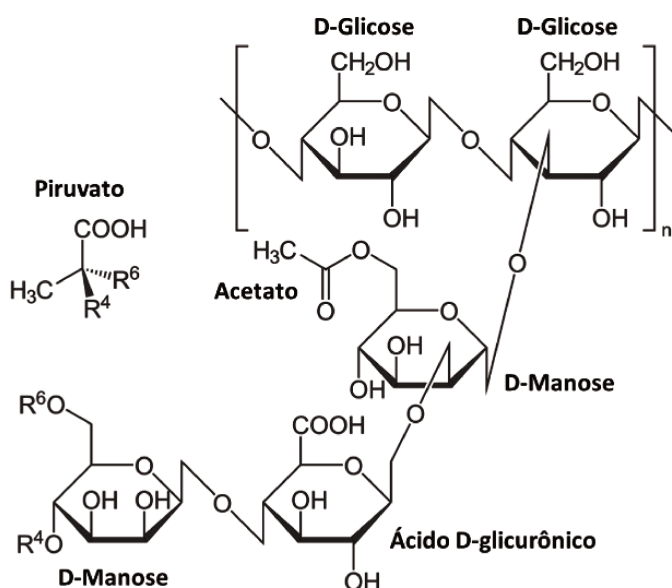
⁵ Reimpressa e/ou adaptada de PÄÄKKÖ, M.; ANKERFORS, M.; KOSONEN, H.; NYKÄNEN, A.; AHOLA, S.; ÖSTERBERG, M.; RUOKOLAINEN, J.; LAINE, J.; LARSSON, P. T.; IKKALA, O.; LINDSTRÖM, T. Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007. Copyright 2007 American Chemical Society.

Outro polímero que apresenta comportamento pseudoplástico é a goma xantana, o qual será detalhado a seguir.

3.7 Goma xantana

A goma xantana é um polissacarídeo aniônico em pH superior a 4,5, produzido pela fermentação da glicose por bactérias do tipo *Xanthomonas campestris*. Apresenta boa solubilidade em água, excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e ótimas propriedades reológicas, como alta viscosidade da solução em água e comportamento altamente pseudoplástico (JEANES; PITTSLEY e SENTI, 1961; KATZBAUER, 1998; PETRI, 2015). Sua produção foi reportada em 1961 e a composição majoritária consiste de glicose, manose e ácido glicurônico, arranjos como mostrado na Figura 9, onde a cadeia principal é composta de unidades de glicose ligadas e a cadeia lateral por β -D-manose-1,4- β -D-ácido glicurônico- β -D-manose, contendo também grupos acetil e piruvato (JANSSON; KENNE e LINDBERG, 1975; JEANES; PITTSLEY e SENTI, 1961). Dependendo da forma como as cadeias se associam e devido à variações das condições de fermentação, a massa molar da xantana pode variar entre 2×10^6 e 20×10^6 g/mol (KUMAR; RAO e HAN, 2018).

Figura 9 – Representação de estrutura química da goma xantana.



Os grupos acetato e piruvato da goma xantana são capazes de interagir com cátions bivalentes; seguindo a ordem de afinidade: Ba, Ca > Mn > Sr, Mg > Co >> Cs, Na, K, Li; resultando em reticulação intramolecular e contração da cadeia (BAUMGARTNER; PAVLI e KRISTL, 2008; KUMAR; RAO e HAN, 2018; RINAUDO e MILAS, 1978). Dessa forma, a xantana pode assumir diferentes conformações tridimensionais, dependendo da temperatura e da força iônica da solução em que se encontra. Quando em alta temperatura ou baixa força iônica, as cadeias poliméricas assumem conformação enovelada com um comprimento de aproximadamente 50 Å. Já a baixa temperatura e alta força iônica, as cadeias da xantana se arranjam em uma conformação helicoidal de com dimensão de cerca de 350 Å (PETRI, 2015).

Carnali (1991) reportou que, ao analisar soluções aquosas de concentrações entre 0,8% e 3% (em massa) de xantana e 0,02 mol/L de cloreto de potássio, observou propriedade mais características de géis do que de soluções em si, devido à conformação das moléculas nessas condições (CARNALI, 1991). Esse comportamento de gel pode favorecer a produção de materiais dimensionalmente mais estáveis com a adição da goma xantana. No entanto, Kumar, Rao e Han (2017) reportaram uma redução do módulo elástico, associado ao comportamento do gel, ao adicionarem concentrações inferiores a 0,8% de xantana a uma solução de alginato (KUMAR; RAO e HAN, 2017). Assim, o uso de goma xantana para melhorar as propriedades reológicas de um material pode, portanto, ser ainda mais bem explorado.

Assim, neste trabalho explorou-se o uso do alginato, da nanocelulose e da goma xantana para a formulação de uma nova biotinta. Devido à aplicação desejada do material, é necessário que o mesmo seja passível de esterilização para que possa ser utilizado de forma segura, minimizando as probabilidades da ocorrência de infecções ao ser implantado no paciente (GALANTE *et al.*, 2018).

3.8 Esterilização

A esterilização pode ser definida como um processo que leva à ausência de organismos viáveis, ocorrendo por remoção ou inativação dos mesmos. No caso de biomateriais, mais particularmente dos hidrogéis em questão, existem duas

abordagens para que essa condição seja atingida.

Pode-se fazer a esterilização das matérias-primas e, em seguida, processá-las de maneira asséptica, ou pode-se realizar a chamada esterilização terminal. A esterilização das matérias-primas só deve ser considerada quando não é possível realizar a esterilização terminal (GALANTE *et al.*, 2018), dado que o processo é mais susceptível a falhas por sua natureza multi-etapas. Nesta abordagem, são exigidos ambientes controlados para o processamento asséptico e que este seja conduzido por profissionais especializados para que a esterilidade seja mantida. Assim, a esterilização terminal é preferida, por estar associada a níveis de segurança mais elevados.

Existem diversas técnicas para a esterilização de materiais, que, de forma geral, podem utilizar agentes esterilizantes físicos, como calor, radiação e filtração, ou químicos, como o óxido de etileno e plasma (GALANTE *et al.*, 2018; QIU; SUN e CONNOR, 2011). O procedimento de esterilização de hidrogéis, em particular por tratamento terminal, deve ser selecionado com cautela, devido à inerente presença de água no material. A água pode promover a ruptura de ligações importantes para a manutenção da estrutura do hidrogel, causando modificações de suas propriedades, como a viscosidade, a estabilidade tridimensional e a biocompatibilidade (GALANTE *et al.*, 2018).

Algumas das técnicas com potencial de uso na esterilização de hidrogéis estão apresentadas na Tabela 5, bem como suas principais limitações.

A redução da viscosidade é um dos principais problemas associados à esterilização de hidrogéis constituídos por polímeros de origem biológica e tem sido analisada em detalhes por diferentes grupos, conforme exemplificado em particular para o caso do alginato na Tabela 6, devido à sua grande aplicabilidade no desenvolvimento de biomateriais para um extenso rol de aplicações.

Tabela 5 – Técnicas passíveis de uso na esterilização de hidrogéis e/ou de seus componentes.

Técnica	Forma de esterilização	Condições operacionais	Eficácia	Limitações	Referências
Calor úmido	Coagulação e desnaturação irreversível de enzimas e proteínas estruturais	121 °C por 15–30 min	Inativa esporos resistentes	Materiais instáveis em altas temperaturas e umidade ou que vapor não possa penetrar	(QIU; SUN e CONNOR, 2011)
Calor seco	Oxidação destrutiva de componentes celulares	160 °C por 2 h	Inativa esporos resistentes	Materiais instáveis em altas temperaturas	
Óxido de etileno	Alquilação de proteínas, DNA e RNA de microrganismos	450–1200 mg/L, 29–65 °C, 45–85% de umidade, por 2–5 h	Inativa bactérias, esporos e vírus	Materiais contendo água	
Filtração	Remoção física de microrganismos por exclusão de tamanho	Filtro de 0,22 µm	Não remove microrganismos menores que 0,22 µm	Materiais de alta viscosidade	(AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010)
CO₂ supercrítico	Propriedades de penetração altas, não-tóxico e facilmente removido pela despressurização, permite o rompimento das células	35–41°C, 1365–1455 psi, 650–710 rpm, por 27 min	Esterilizante quando combinado com algum reagente oxidante, como ácido peracético	Somente o CO ₂ supercrítico não é suficiente para matar endosporos de bactéria e vírus	(QIU <i>et al.</i> , 2009; QIU; SUN e CONNOR, 2011)
Radiação γ Radiação X Feixe de elétrons	Ataque às moléculas de DNA através de mecanismos diretos ou indiretos	10 - 35 kGy	Esterilizante	Usualmente prejudicial à polímeros e materiais biológicos por desencadear reações de degradação oxidativa	(QIU; SUN e CONNOR, 2011)
Radiação UV	Rompe a estrutura de ácidos nucleicos e impede a capacidade reprodutiva de microrganismos	Luz UV (~254 nm)	Inativação de microrganismos presentes no ar e descontaminação de superfícies	Radiação UV não é considerada como método de esterilização efetivo devido à baixa penetração	

Tabela 6 – Esterilização do alginato.

Técnica	Estado do material	Condições operacionais	Mudanças causadas pela esterilização	Referência
Calor úmido	Soluções 1 e 3% (m/v)	Vapor saturada em autoclave a 121 °C por 15 min	Redução na viscosidade entre 56 e 86%	LEO; MCLOUGHLIN; MALONE, 1990
Óxido de etileno	Pó de alginato	Óxido de etileno 560 mg/L por 7h a 57 °C	Redução de cerca de 60% na viscosidade	
Radiação γ	Pó de alginato	Fonte de cobalto-60, 23,15 kGy com taxa de 14,4 kGy/h	Redução de cerca de 95% na viscosidade	
Calor úmido	Solução 1% (m/v)	Vapor saturada em autoclave a 121 °C por 20 min	Redução de cerca de 64% na viscosidade	VANDENBOSSCHE; REMON, 1993
Ciclos de aquecimento	Solução 1% (m/v)	2, 3 ou 4 ciclos de aquecimento de 30 min a 80 °C seguida de incubação por 24h a 25 °C	Redução de cerca de 61% na viscosidade após 4 ciclos de aquecimento	
Filtração	Solução 1% (m/v)	Membrana de acetato de celulose de 0,22 μ m e membrana de nitrato de celulose de 0,45 μ m	Pequena redução da viscosidade usando o filtro de 0,22 μ m. Sem diferença significativa de viscosidade com o filtro de 0,45 μ m	
Óxido de etileno	Pó de alginato	Óxido de etileno 1,4 g/L, umidade relativa de 50%, 93 kPa, 60 min a 50 °C	Redução de cerca de 24% na viscosidade	

Observa-se que um dos métodos que causa menor alteração na viscosidade do alginato é o tratamento do pó com óxido de etileno, neste caso haveria necessidade de processamento asséptico do material após a esterilização e, ainda assim, tem-se redução da viscosidade da solução. Dentre as outras técnicas utilizadas, as que envolvem o aquecimento da solução parecem causar reduções de viscosidade ainda mais significativas. A única técnica na qual a solução manteve suas propriedades foi a filtração. No entanto, não é possível utilizá-la para soluções muito viscosas devido à significativa retenção de material em filtros com poros de até 0,22 μ m. Essa retenção leva ao entupimento do filtro e consequente aumento da pressão necessária para filtrar, sendo que também ocorre a redução da viscosidade da solução filtrada (VANDENBOSSCHE e REMON, 1993).

Uma patente de 1997 propõe a esterilização por calor úmido de soluções de alginato de concentração entre 3 e 6% (m/v) contendo de 20 a 30% (m/v) de um álcool polihídrico. Segundo os autores, a adição desses álcoois pode auxiliar na manutenção da viscosidade da solução após a esterilização em autoclave (HARDY e FINDLAY, 1997). No entanto, a adição de um álcool polihídrico pode alterar outras propriedades reológicas da solução e mesmo a biocompatibilidade do produto final.

Kundu e colaboradores (2015) esterilizaram o alginato de sua biotinta por calor úmido, porém não avaliaram se o processo de esterilização comprometeu as propriedades reológicas do material (KUNDU *et al.*, 2015). Em outros trabalhos a biotinta foi preparada em condições estéreis (CHUNG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2018).

Markstedt e colaboradores (2015) utilizaram alginato comercializado pela FMC Biopolymers liofilizado e estéril e esterilizaram a nanocelulose por calor úmido, não reportando, entretanto, manutenção ou alteração das propriedades reológicas do material (MARKSTEDT *et al.*, 2015). Já Ouyang e colaboradores (2016) esterilizaram formulações de biotintas constituídas de gelatina e alginato através de ciclos de aquecimento até 70 °C durante 30 minutos por três vezes e conduziram testes de detecção de micoplasma para evitar contaminação. Também não reportaram os efeitos resultantes do processo de esterilização (OUYANG *et al.*, 2016).

Observa-se, portanto, que a esterilização de hidrogéis precisa ser mais extensivamente estudada para que não se constitua em um elemento que dificulte sua utilização em aplicações biomédicas. Deve-se avaliar cada material para determinar quais as condições mais adequadas de esterilização, para que as propriedades relevantes, tendo em vista a aplicação desejada, não sejam comprometidas ao esterilizar o material (GALANTE *et al.*, 2018).

Assim, com base na análise bibliográfica apresentada, nota-se que há ainda um vasto campo disponível para contribuições no sentido do desenvolvimento de hidrogéis úteis para a engenharia tecidual, em particular para a impressão 3D de estruturas já contendo células viáveis.

4 MATERIAIS E METODOLOGIA

4.1 Materiais

Para a produção dos hidrogéis foram utilizados os seguintes materiais: suspensão de celulose microfibrilada (CMF) em água com concentração de 3,1% (Suzano Papel e Celulose); goma xantana (X) com conteúdo de ácido pirúvico de 4,3% e viscosidade da solução 1% em 1% KCl de 1440 mPa.s (Xantural®180, CP Kelco); alginato de sódio com viscosidades da solução 1% a 20 °C de 498 e 676 mPa.s, respectivamente, Protanal SF 120 RB (A-SF) e Protanal HF 120 RB (A-HF) (DuPont Danisco); Meio Essencial Mínimo de Eagle modificado alfa (α -MEM, Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich) e 1% de estreptomicina e penicilina (LGC Biotecnologia); cloreto de estrôncio hexahidratado (Sigma-Aldrich); glicerol (Synth); corante azul de tripan (Dinâmica) e água deionizada, utilizada em todos os experimentos, obtida utilizando-se um sistema Milli-Q (Millipore). Todos os demais reagentes eram de grau analítico.

4.2 Caracterização das matérias-primas

4.2.1 *Análise de massa seca da celulose microfibrilada*

A CMF apresentava concentração mássica nominal de 3,1%. No entanto, observou-se certa heterogeneidade na distribuição do solvente no material. Por esse motivo, foram realizadas análises gravimétricas visando confirmar o valor da concentração nominal do material homogeneizado.

Para isso, alíquotas do material foram pesadas, distribuídas em uma placa de Petri e secadas em estufa a 100 °C até que a massa permanecesse constante. A massa do material seco foi então comparada com a massa inicial para se determinar a concentração real de fibras secas no material.

4.2.2 *Microscopia eletrônica de varredura da celulose microfibrilada*

A nanocelulose microfibrilada foi caracterizada quanto à sua morfologia por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química

(FEQ/Unicamp) em microscópio Leo 440i (LEO Electron). Para isso a amostra foi diluída a uma concentração de cerca de 0,05 e 0,15% em massa, depositada em uma placa de Petri em uma fina camada e seca em estufa a 37 °C. Após a secagem as amostras foram armazenadas em dessecador por pelo menos 24 h. Em seguida, foram fraturadas criogenicamente, fixadas a um suporte adequado e recobertas com ouro (DEDAVID; GOMES e MACHADO, 2007; LIANG *et al.*, 2018).

As fibras (n=12) de duas imagens de cada concentração foram medidas através do programa ImageJ. A partir das 24 medidas, calculou-se o diâmetro médio das fibras da celulose microfibrilada.

4.2.3 Determinação da massa molar viscosimétrica do alginato

A massa molar viscosimétrica dos alginatos foi avaliada antes e depois de um processo de esterilização, utilizando-se um viscosímetro de Cannon-Fenske número 350 mantido em um banho a 25 °C. Para estimar a massa molar média, foram preparadas soluções de alginato na concentração de 0,0100 g/mL em solução salina contendo 0,1 mol/L de NaCl em água deionizada. Em seguida, uma alíquota dessas soluções foi esterilizada por calor úmido em autoclave (121 °C, 1 bar, por 15 minutos). Com as soluções iniciais, estéreis e não-estéreis, foram preparadas outras quatro soluções de diferentes concentrações: 0,0050; 0,0025; 0,0010 e 0,0005 g/mL. Através da medida de tempo do escoamento das soluções entre dois pontos pré-determinados, e utilizando-se a equação de Martin (Equação 8), estimou-se a viscosidade intrínseca dos dois alginatos utilizados, antes e depois do processo de esterilização. Os parâmetros $K = 2 \times 10^5$ dL/g e $a = 0,97$ foram utilizados para calcular a massa molar viscosimétrica dada pela equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 9).

4.3 Formulação dos hidrogéis

4.3.1 Géis não-estéreis

4.3.1.1 Formulações consistindo de alginato, CMF e goma xantana

Foram produzidos hidrogéis contendo 3% (m/v) de alginato e nanocelulose em uma das proporções mais promissoras reportadas por Markstedt e

colaboradores (2015), que estudaram diferentes proporções de alginato e nanocelulose, mantendo a concentração polimérica total de 3% (m/v). A essa formulação, adicionou-se goma xantana em duas proporções diferentes, nas concentrações finais de 0,8 e 1,2% (m/v). Em todas as formulações foi utilizada água deionizada como solvente. As formulações estudadas estão sumarizadas na Tabela 7. A abreviação $A_aC_cX_x$ foi utilizada para identificar cada formulação, onde A, C e X correspondem ao alginato, à CMF e à goma xantana, respectivamente. Os subscritos da abreviação correspondem às concentrações de cada polissacarídeo em % (m/v) na mistura em água deionizada.

Tabela 7 – Formulações dos hidrogéis contendo CMF.

Identificação	Fração na suspensão em fase aquosa (% m/v)		
	Alginato	CMF	Xantana
A-SF_{0,9}C_{2,1}X₀	0,9	2,1	0
A-SF_{0,9}C_{2,1}X_{0,8}	0,9	2,1	0,8
A-SF_{0,9}C_{2,1}X_{1,2}	0,9	2,1	1,2

Para o preparo dos hidrogéis, foi preparada uma solução estoque de alginato na concentração de 5% (m/v); para isso, a massa de alginato adequada foi adicionada à água deionizada e agitada vigorosamente em um agitador de soluções AP56 (Phoenix Luferco), à 3800 rpm até que se obtivesse a completa dissolução do polímero. Em seguida, a massa apropriada de goma xantana foi pesada e transferida para um frasco de vidro ao qual se adicionou uma alíquota de água correspondente à 10% do volume final da solução. A mistura foi mantida a 4 °C por uma noite para que a xantana se hidratasse de maneira uniforme (JEANES; PITTSLEY e SENTI, 1961). Após a completa dissolução da xantana, foram adicionadas as alíquotas da solução de alginato, de suspensão de CMF e o restante da quantidade de água necessária nas devidas proporções. As misturas obtidas foram novamente agitadas à 3800 rpm no agitador de soluções (AP56, Phoenix Luferco) e, por fim, foram tratadas em banho ultrassônico (Branson 3510, Branson) em dois ciclos de 30 minutos.

4.3.1.2 Formulações consistindo de alginato e goma xantana

Além dos géis descritos anteriormente, também foram preparadas formulações à base de alginato e xantana em Meio Essencial Mínimo de Eagle modificado alfa (α -MEM) suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos. O meio de cultivo foi utilizado ao invés da água devido ao tipo de aplicação pretendida (biotinta). Inicialmente manteve-se a concentração polimérica total de 3% (m/v) estudada por Markstedt e colaboradores (2015) (MARKSTEDT *et al.*, 2015) variando-se a proporção dos dois polissacarídeos. Também optou-se, em uma das formulações, por aumentar a concentração de xantana, para promover o aumento da viscosidade e pseudoplasticidade da solução.

Para essas formulações, foram preparadas soluções estoque, em α -MEM, de alginato e goma xantana nas concentrações de 3 e 3,75% (m/v) respectivamente. As soluções estoque foram preparadas adicionando-se a massa adequada de cada polissacarídeo ao meio de cultivo em agitação à 500 rpm em um agitador mecânico com hélice marinha (agitador de alto torque microprocessado modelo Q250M2, Quimis) durante 1 h. As soluções estoque foram misturadas em diferentes proporções, sendo que para as formulações contendo 3% (m/v) de concentração polimérica total, foi necessário adicionar um volume de α -MEM correspondente à 25% do volume de solução estoque de xantana utilizado para cada formulação.

Cloreto de cálcio foi adicionado a uma das formulações para pré-reticular o material e estudar sua capacidade de impressão e reologia, na concentração de 0,09% (m/v) (8 mmol/L) indicada para alginato de alta massa molar por Freeman e Kelly (FREEMAN e KELLY, 2017). As soluções produzidas apresentaram muitas bolhas, por isso foram centrifugadas (CT-5000R, Cientec Equipamentos Científicos) à 2500 rpm (791 g) por cerca de 20 minutos ou até que as bolhas fossem removidas.

As formulações aqui apresentadas estão sumarizadas na Tabela 8.

4.3.2 Esterilização das formulações de hidrogéis

A esterilização foi realizada pelo método de calor úmido em autoclave vertical (modelo CS, Prismatec Equipamentos) utilizando soluções concentradas dos polissacarídeos em água, a 121 °C e 1 bar por 15 minutos.

Tabela 8 – Formulações do hidrogel contendo alginato e xantana.

Identificação	Fração na suspensão em fase aquosa (% m/v)		
	Alginato	Xantana	CaCl ₂
A-SF_{2,0}X_{1,0}	2,0	1,0	0
A-SF_{1,5}X_{1,5}	1,5	1,5	0
A-SF_{1,0}X_{2,0}	1,0	2,0	0
A-SF_{1,0}X_{2,5}	1,0	2,5	0
A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca	1,0	2,0	0,09

Inicialmente foram esterilizadas soluções de alginato na concentração de 4 ou 6% (m/v), contendo ou não glicerol na concentração de 20 ou 30% (m/v), preparadas sob agitação de 500 rpm com um agitador mecânico com hélice marinha (agitador de alto torque microprocessado modelo Q250M2, Quimis) durante 1 h. Avaliou-se de forma visual o escoamento e a coloração das soluções antes e depois do processo de esterilização. Ainda, foi preparada uma solução aquosa com o dobro da concentração polimérica da formulação A-SF_{1,0}X_{2,5}, porém utilizando-se o alginato Protanal HF 120 RB, sob as mesmas condições de agitação mencionadas anteriormente (500 rpm por 1 h). Em seguida, o pH da solução foi ajustado com uma solução de hidróxido de sódio 2 mol/L e a solução foi esterilizada. Após a esterilização, a solução foi misturada ao mesmo volume de α -MEM concentrado, em ambiente estéril, de forma que a concentração da solução final fosse a mesma da estudada na etapa anterior. Esta solução também foi centrifugada para a remoção das bolhas, conforme descrito anteriormente. A abreviação utilizada para a formulação estéril foi A-HF_{1,0}X_{2,5}.

4.4 Análise da estabilidade e do comportamento reológico dos materiais

Os géis produzidos foram avaliados visualmente quanto à sua estabilidade, analisando-se se ocorria separação de fases e também se não escoavam 5 minutos após a inversão dos tubos que os continham, o que daria indícios de que não seriam suficientemente apropriados para a finalidade proposta de impressão 3D.

O material foi caracterizado reologicamente por meio da análise da

viscosidade a 25 °C em função da taxa de cisalhamento, para variações na faixa de 0,01 até 1000 s⁻¹. Para tal, empregou-se o reômetro Haake Mars III (Thermo Scientific). Foi também determinada a tensão limite de escoamento em ensaios oscilatórios de amplitude, com tensão variando entre 0,01 e 300 Pa em uma frequência de 1,592 Hz. Após a determinação da região de linearidade viscoelástica, foi feito um ensaio oscilatório de frequência com variação entre 0,01592 e 38,20 Hz à uma tensão de 3 Pa.

Avaliou-se, também, a recuperação da viscosidade após a aplicação de uma alta taxa de cisalhamento, objetivando simular o processo de impressão. Para isso, a viscosidade do material foi medida ao longo do tempo, em diferentes taxas de cisalhamento. Inicialmente aplicou-se uma taxa de cisalhamento de 1 s⁻¹ durante 25 s, simulando a etapa de repouso antes da extrusão. Em seguida, foi simulado o processo de extrusão, aplicando-se uma taxa de 700 s⁻¹ por 50 s. Após esse período sob alta taxa cisalhante, monitorou-se a recuperação da viscosidade ao longo de 300 s.

Todas as caracterizações reológicas passaram por um período inicial de 600 s de estabilização da temperatura da amostra a 25 °C e utilizou-se uma tampa adaptada para evitar a evaporação de água ao longo da análise. As caracterizações reológicas foram feitas com base nos procedimentos descritos por Dávila e D'ávila (DÁVILA e D'ÁVILA, 2019).

4.5 Deposição das estruturas por manufatura aditiva

Para avaliar a capacidade de impressão dos hidrogéis, uma parceria foi estabelecida com o Núcleo de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (NT3D-CTI) para utilização da impressora desenvolvida por eles, a 3D Fab@CTI, com um cabeçote de extrusão acoplado a uma seringa contendo a solução polimérica a ser extrudada (INFORÇATTI NETO, 2007). A impressora controla o deslocamento do êmbolo da seringa, bem como seu posicionamento para que as quantidades desejadas de material sejam depositadas com precisão na posição adequada, de acordo com o modelo computacional selecionado.

O modelo para impressão foi criado utilizando-se o programa BioScaffolds PG (DÁVILA *et al.*, 2016) e foram impressas estruturas de 15,2 x 15,2 mm, com espaçamento entre os diâmetros das fibras de 1,9 mm, com o diâmetro da fibra de 1 mm, com uma ou quatro camadas verticais depositadas de forma consecutiva, cada uma com 0,3 mm de altura. Para isso, foram utilizados bicos cônicos de diâmetro interno de 0,58 e 0,41 mm para as formulações não-estéreis e estéreis, respectivamente.

Ademais, avaliou-se o diâmetro das fibras depositadas e ajustou-se a taxa de deposição do material entre 0,0010 a 0,0060 mm de deslocamento do êmbolo/ mm da trajetória de impressão. Os tempos de *push out* e *suck back* também foram ajustados com base na análise visual das características do material que estava sendo depositado, variando-se de 0,005 a 0,015 s e de 0,00010 a 0,10000 s, respectivamente.

O diâmetro médio das fibras depositadas e a área média dos poros da estrutura foram calculados a partir de pelo menos 12 medidas utilizando o programa ImageJ. A partir destes valores médios pôde-se calcular a razão entre o diâmetro da fibra depositada e do bico utilizado, bem como a precisão de impressão (Equação 10) (DUAN *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2016).

$$\text{Precisão de impressão (\%)} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{A - A_i}{A} \times 100 \right) \quad \text{Equação 10}$$

onde A é a área teórica de 0,81 mm², A_i é a área medida e n é o número de medidas.

4.6 Análise da influência da concentração da solução reticulante e do tempo de reticulação

Como para a estabilização final das estruturas impressas é necessário o uso de processos de reticulação, foram estudados os efeitos tanto da concentração quanto do tempo de exposição dos géis produzidos a soluções de cloreto de estrôncio, visando selecionar as condições mais apropriadas. As variáveis resposta

escolhidas para este estudo foram as propriedades mecânicas dos géis reticulados e a citotoxicidade a células-tronco mesenquimais de polpa dentária.

4.6.1 *Efeito nas propriedades mecânicas*

Foram testadas soluções de cloreto de estrôncio nas concentrações de 50, 100 e 200 mmol/L, todas contendo cloreto de sódio na concentração de 0,2 mol/L para obter géis mais homogêneos (SKJÅK-BRÆK; GRASDALEN e SMIDSRØD, 1989). Discos de aproximadamente 14 mm de diâmetro e 5 mm (n=6) de espessura foram imersos em 6 mL de solução reticulante e avaliados mecanicamente após 30 e 60 minutos, após a remoção do excesso de solução reticulante com papel de filtro. Os géis reticulados com as soluções de 50 e 100 mmol/L também foram testados após 120 e 240 minutos.

As dimensões de cada corpo de prova foram novamente medidas antes da realização dos ensaios, em modo de compressão não confinada, em um texturômetro TA.XTPlus (Texture Technologies) com célula de carga de 0,5 kg. As amostras foram comprimidas até 70% de deformação, a uma taxa de deslocamento de 0,1 mm/s. O módulo elástico foi calculado a partir do coeficiente angular da região linear da curva de tensão *versus* deformação (AARSTAD *et al.*, 2017).

4.6.2 *Efeito da toxicidade da solução reticulante*

Para avaliar a citotoxicidade da solução reticulante, simulou-se uma condição extrema em que as células estariam, após a impressão 3D do tecido, em contato direto com a solução de reticulação. Para isso, aproximadamente 50.000 células mesenquimais de polpa dentária (DPSC) (PT-5025, lote 0000361150, Lonza), conforme determinado anteriormente em ensaios semelhantes do grupo de pesquisa, foram inoculadas em frascos de cultivo de poliestireno de 25 cm² de área superficial contendo 5 mL de α -MEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibióticos e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ em estufa incubadora (Incubadora de CO₂ COM-170AICUVL, Panasonic). Após 72 h, verificou-se se as células se encontravam aderidas e a confluência estava em pelo menos 50% para a realização dos ensaios. Os experimentos foram conduzidos com soluções de SrCl₂ na concentração de 50 ou 100 mmol/L, contendo ou não 0,2 mol/L de NaCl.

O meio de cultivo foi removido e adicionou-se 5 mL da solução reticulante. Após o período de 30 ou 60 minutos, a solução foi removida, as células passaram por uma etapa de lavagem com PBS, seguida da adição de 1,5 mL de tripsina. Os frascos contendo as células e a tripsina foram colocados novamente na estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 5 minutos para destacar as células dos frascos. Após esse período, adicionou-se 3 mL de α -MEM para inativação da tripsina. A suspensão celular foi coletada, transferida para tubos falcon de 50 mL de capacidade, centrifugadas (CT-5000R, Cientec Equipamentos Científicos) à 900 rpm (102 g) por 5 minutos e ressuspendidas em 1 mL de α -MEM.

Para avaliar a viabilidade celular, utilizou-se o corante azul de tripan em solução aquosa na concentração de 0,4% (m/v), que cora as células mortas. Em um tubo eppenforf de 1,5 mL de capacidade adicionou-se 10 μ L da solução de corante e o mesmo volume da suspensão celular. Alíquotas da mistura foram transferidas para uma câmara de Neubauer e as células vivas e mortas foram contadas. Considerando-se o volume da câmara de Neubauer utilizada e a diluição da amostra, calculou-se a concentração de células viáveis em cada condição analisada. O valor encontrado para as células vivas que estiveram em contato com a solução reticulante foi comparado ao do controle, que consistia de células expostas ao α -MEM, pelo período de tempo avaliado e ao valor de células mortas. Também foi feito o controle com uma solução contendo apenas 0,2 mol/L de NaCl.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas apresentadas pelo teste de Tukey entre as médias, com um nível de confiança de 95% com o programa Statistica 8.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das matérias-primas

Os resultados obtidos nas caracterizações na CMF e do alginato são apresentados e discutidos a seguir.

5.1.1 Análise de massa seca da celulose microfibrilada

Para a análise gravimétrica da CMF foram determinados os valores apresentados na Tabela 9. Apesar da aparente heterogeneidade do material, o valor médio encontrado foi de $3,17 \pm 0,15\%$, o qual encontra-se dentro do valor fornecido pelo fabricante, que era de 3,1%. Assim, o valor de 3,17% foi assumido como a concentração de CMF nos ensaios subsequentes.

Tabela 9 – Análise de massa seca da CMF.

Amostra	Massa de material úmido (g)	Massa de material seco (g)	Fração mássica (%)
1	4,9463	0,1629	3,29
2	5,2262	0,1695	3,24
3	5,0227	0,1648	3,28
4	5,6462	0,1758	3,11
5	5,0554	0,1515	3,00
6	4,9254	0,1428	2,90
7	5,7496	0,1815	3,16
8	5,2081	0,1751	3,36
9	5,0608	0,1610	3,18
Valor médio da fração mássica (%)			$3,17 \pm 0,15$

5.1.2 Aspecto visual das fibras de CMF e analisado por microscopia eletrônica de varredura da celulose microfibrilada

As fibras de CMF, após a secagem, formaram uma película fina, esbranquiçada e semi-transparente (Figura 10). O filme de concentração 0,05% era mais fino, translúcido e mais difícil de manipular do que o de 0,15%.

Observando-se as imagens da Figura 11, nota-se que o material é heterogêneo no que se refere à espessura das fibras. Na imagem 11b, de concentração mais alta (0,15%) a visualização das fibras individuais é mais difícil

quando comparada à imagem a. Além disso, em maiores concentrações, as fibras se aglomeraram ainda mais.

Figura 10 – Aspecto dos filmes de CMF com concentração de 0,05% (a) e 0,15% (b).

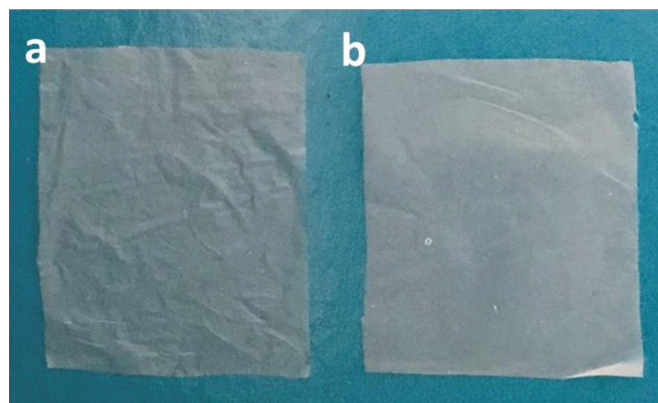
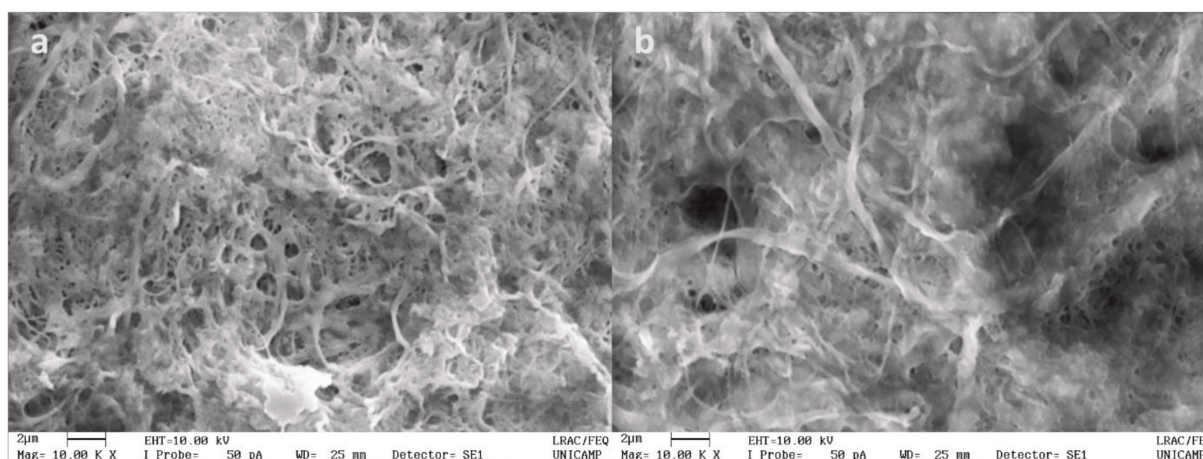


Figura 11 – Microscopia eletrônica de varredura da CMF com concentração de 0,05% (a) e 0,15% (b).



Pela medida das dimensões das fibras obteve-se um diâmetro médio de 216 ± 92 nm e 263 ± 152 nm para as concentrações de 0,05% e 0,15% respectivamente. As médias não apresentaram diferença estatística significativa para um nível de confiança de 95%. Observa-se um valor médio e um desvio padrão mais alto para o diâmetro das fibras obtido a partir de amostras mais concentradas. Isso provavelmente ocorre devido à aglomeração das fibras mais evidente na maior concentração. Os altos desvios obtidos se devem naturalmente à ampla distribuição de diâmetros observada. Essa alta variabilidade está associada ao processo

produtivo da CMF, que comumente é feito aplicando-se altas tensões cisalhantes para desestruturar as fibras de celulose em CMF (PÄÄKKÖ *et al.*, 2007).

O diâmetro médio da CMF encontrado é muito superior ao reportado por Markstedt e colaboradores (2015) para o uso na formulação de materiais para biotintas, que foi de aproximadamente 20 nm (MARKSTEDT *et al.*, 2015).

5.1.3 Determinação da massa molar viscosimétrica do alginato

Os dois alginatos utilizados têm aplicação originalmente estabelecidas para a indústria de alimentos. Este fato não tem maiores implicações para o propósito deste trabalho, visto que não se tinha por meta a realização de estudos *in vivo* nos quais a segurança biológica do material para uso interno deveria ter níveis elevados, mas sim de analisar a formulação e caracterização de hidrogéis, particularmente com relação a propriedades associadas à impressão 3D, visando-se determinar condições apropriadas de materiais equiparáveis para aplicação na área de regeneração tecidual.

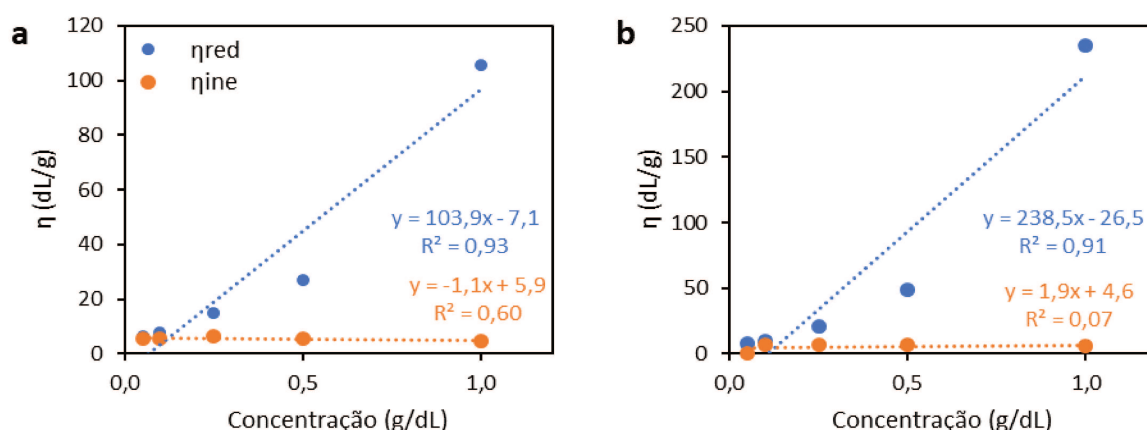
A principal diferença entre os alginatos utilizados é a viscosidade das soluções produzidas na concentração de 1% a 20 °C, que é de 498 e 676 mPa.s para o Protanal SF 120 RB e HF 120 RB, respectivamente, segundo especificado pelo fabricante. Ambos os alginatos foram caracterizados quanto à sua massa molar viscosimétrica, avaliando-se os dados obtidos por meio de duas diferentes abordagens.

Inicialmente os dados foram ajustados pelas equações de Huggins (Equação 6) e Kraemer (Equação 7). Observa-se, na Figura 12, que o ajuste linear às equações não foi satisfatório. Além disso, ao graficar as viscosidades reduzida e inerente em função da concentração e ajustar linearmente os dados, os coeficientes lineares obtidos deveriam ser próximos, pois esses termos nas duas equações, de Huggins e Kraemer, representam a viscosidade intrínseca.

Com o ajuste utilizando-se a equação de Huggins obtiveram-se coeficientes lineares negativos, o que fisicamente não é viável, pois a viscosidade intrínseca da solução é dada por este coeficiente. Além disso, os pequenos coeficientes de determinação (R^2) e a baixa correlação entre as duas equações utilizadas ocorreu porque a faixa de concentrações utilizadas não se encontra em

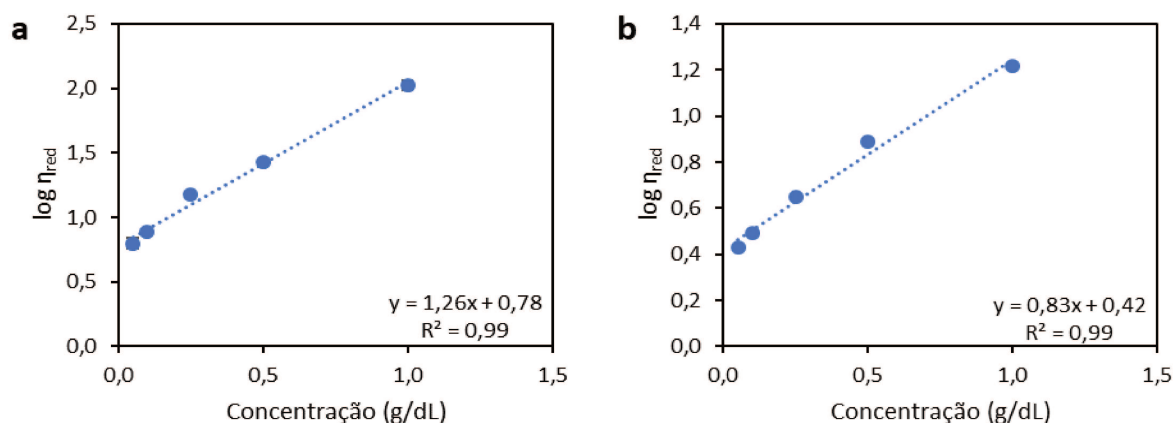
uma faixa em que o comportamento das soluções de alginato possa ser considerado como Newtoniano, uma vez que a concentração polimérica encontra-se em uma região em que se pode ter interação entre as cadeias, que causam essa mudança no comportamento da solução (LUCAS; SOARES e MONTEIRO, 2001; PAMIES *et al.*, 2010).

Figura 12 – Viscosidades reduzida e inerente em função da concentração para o alginato Protanal SF 120 RB (a) e Protanal HF 120 RB (b).



Por esse motivo, a viscosidade intrínseca foi determinada pela equação de Martin (Equação 8). O ajuste obtido encontra-se na Figura 13.

Figura 13 – Logaritmo da viscosidade reduzida em função da concentração para o alginato Protanal SF 120 RB (a) e Protanal HF 120 RB (b).



Nota-se que o ajuste linear foi significativamente melhor, evidenciado pelos altos coeficientes de determinação obtidos. A partir destes dados, foi possível determinar a viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica dos alginatos, cujos valores são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e massa molar viscosimétrica (M_v) dos alginatos na temperatura de 25 °C.

Alginate	$[\eta]$ (dL/g)	M_v (g/mol)
Protanal SF 120 RB	6,05	302.715
Protanal HF 120 RB	7,09	354.532

Os valores de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica foram maiores para o alginato Protanal HF 120 RB, o que era esperado, uma vez que, segundo especificado pelo fabricante, a viscosidade deste alginato (676 mPa.s) é mais elevada em solução na concentração de 1% a 20 °C do que a do alginato Protanal SF 120 RB (498 mPa.s). Ainda, as viscosidades especificadas pelo fabricante de 498 e 676 mPa.s, são próximas a 540 mPa.s, que é a especificada por Onsøyen (1997) para alginatos de alta viscosidade, quando comparadas na mesma concentração e temperatura (ONSØYEN, 1997).

Ademais, um alginato com a massa molar de 120.000 g/mol pode ser considerado como de alta massa molar (KONG *et al.*, 2004). Nesse sentido, pode-se considerar que ambos os alginatos utilizados possuíam alta massa molar.

A massa molar viscosimétrica da xantana Xantural®180 da CP Kelco não foi determinada neste trabalho. De acordo com o fornecedor, uma solução aquosa da xantana utilizada a 1% em KCl também a 1% apresenta viscosidade de 1440 mPa.s a 25 °C medida em viscosímetro Brookfield modelo LV com eixo #3 a 60 rpm (CP KELCO, 2017, 2019).

5.1.4 Efeito da esterilização nas propriedades dos polissacarídeos

Dado que para a realização de ensaios de crescimento celular nas estruturas constituídas de hidrogéis impressos seria necessário esterilizá-los antes de sua inoculação com as células-alvo, algumas abordagens de esterilização foram avaliadas e os resultados alcançados estão descritos nas seções a seguir.

5.1.5 Filtração

A filtração, por ser o método de esterilização que menos altera o material (Tabela 5), foi inicialmente testada para uma solução 2% (m/v) de alginato, que posteriormente poderia ser misturada à uma solução concentrada de xantana esterilizada pelo mesmo método.

A solução de alginato pôde ser eficientemente filtrada pelo filtro de porosidade igual a 0,45 μm . Entretanto, ao ser submetida, na sequência, à filtração por filtro de 0,22 μm , observou-se uma drástica redução da viscosidade da solução de alginato, provavelmente devido à retenção da maioria das cadeias do polissacarídeo nos poros do filtro. Por esta razão, este método foi descartado.

5.1.6 Calor úmido

Inicialmente foi feita a esterilização do alginato Protanal SF 120 RB e da xantana na forma de pó. Observou-se que o alginato escureceu, apresentando uma coloração marrom escura ao invés do amarelado característico do pó antes da esterilização. Ao dissolver esse alginato esterilizado em meio de cultivo notou-se que a solução possuía viscosidade muito inferior à da solução de alginato não-esterilizada. Isso ocorreu possivelmente devido à degradação por hidrólise e térmica do alginato nas condições de esterilização, comumente reportada para polissacarídeos (DRAGET, 2009; SMITH e PACE, 1982).

Já a xantana não apresentou mudança significativa na coloração e nem na viscosidade da solução produzida com o material estéril, indicando que não houve degradação. A solução de xantana, em seu processo produtivo, pode chegar a temperaturas por volta dos 130 °C, por até 20 minutos sem degradar-se (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011; SMITH e PACE, 1982). Isso ocorre devido à uma transição intramolecular na conformação da molécula, que a altas temperaturas e dependendo da força iônica do meio, assume conformação enovelada (PETRI, 2015). No entanto, se mantida a cerca de 150 °C durante 2 minutos, a xantana se degradará (SMITH e PACE, 1982).

Dada a comprovada estabilidade do pó de xantana na condição de esterilização a úmido a 1 atm e 121 °C, buscou-se explorar abordagens adicionais mais efetivas para a esterilização do alginato.

Inicialmente foi autoclavada uma solução concentrada de alginato a 6% (m/v), porém notou-se perda de viscosidade e escurecimento da solução características da degradação do alginato. Por esse motivo, analisou-se a opção de adição de glicerol à solução de alginato nas proporções de 20 e 30% (m/v), uma vez que há relato na literatura de que a adição de um álcool polihídrico, como é o caso do glicerol, poderia estabilizar a solução de alginato, evitando a hidrólise, e auxiliar na manutenção da viscosidade da solução após o processo de esterilização (HARDY e FINDLAY, 1997). Como não foi possível dissolver 6% (m/v) de alginato na mistura de água com glicerol, a concentração de alginato foi reduzida para 4% (m/v).

Notou-se significativo escurecimento da solução de alginato e queda na viscosidade mesmo na presença de ambas as concentrações de glicerol utilizadas. De acordo com a literatura (HARDY e FINDLAY, 1997), álcoois dihidricos, como o propileno glicol, seriam mais apropriados, mas como não se dispunha deste reagente, optou-se por manter a concentração de glicerol apenas em 20% (m/v), porém ajustando-se o pH das soluções antes da esterilização para a neutralidade, condição em que a degradação é mínima (DRAGET, 2009). Novamente as soluções apresentaram redução de viscosidade e escurecimento significativos.

Com a finalidade de melhor entender o efeito da esterilização térmica na estrutura do alginato, repetiu-se o ensaio anterior feito para a determinação da massa molar viscosimétrica, empregando-se, entretanto, nesta oportunidade, uma solução de alginato na concentração de 0,0100 g/mL em solução contendo 0,1 mol/L de NaCl em água deionizada. Os resultados obtidos de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 – Viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e massa molar viscosimétrica (M_v) na temperatura de 25 °C dos alginatos esterilizados por calor úmido.

Alginato	$[\eta]$ (dL/g)	M_v (g/mol)
Protanal SF 120 RB	2,64	132.044
Protanal HF 120 RB	3,27	163.262

Nota-se que o alginato Protanal HF 120 RB se manteve com a viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica mais elevada do que o

Protanal SF 120 RB, seguindo a mesma tendência das soluções antes da esterilização.

Comparando-se os valores apresentados na Tabela 11, das soluções de alginato estéreis, com os da Tabela 10, observa-se que a esterilização por calor úmido causa redução significativa de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica, de 56 e 54% para o Protanal SF 120 RB e o Protanal HF 120 RB, respectivamente.

Como o Protanal HF 120 RB desde o princípio apresentou maior viscosidade e massa molar média, quando comparado ao Protanal SF 120 RB, e a porcentagem de degradação de ambos foi semelhante, optou-se pela utilização do Protanal SF 120 RB para as formulações não-estéreis e do Protanal HF 120 RB para a formulação esterilizada por calor úmido. Desta forma, a redução de viscosidade da formulação estéril seria ligeiramente menos significativa.

Para soluções de alginato de concentração 1% (m/v), a mesma utilizada neste trabalho para a formulação dos hidrogéis, foram reportadas degradações de 78 (LEO; MCLOUGHLIN e MALONE, 1990) e 64% (VANDENBOSSCHE e REMON, 1993), após um processo de esterilização por calor úmido durante 20 minutos. Ademais, Leo, Mcloughlin e Malone (1990) reportaram a variação da viscosidade de uma solução a 3% (m/v) após esterilização por calor úmido durante 20 e 15 minutos, obtendo degradações de 86 e 56%, respectivamente. Como o tempo do processo é um parâmetro que afeta significativamente a degradação do alginato (LEO; MCLOUGHLIN e MALONE, 1990) estabeleceu-se no presente trabalho não exceder ao tempo de esterilização de 15 minutos, para diminuir a degradação do biopolímero.

Na sequência, como nenhuma das estratégias de esterilização da solução de alginato foi eficiente para impedir a redução de viscosidade causada pelo processo de esterilização, abordou-se, então, a possibilidade de esterilização de uma solução contendo simultaneamente alginato e xantana, com o intuito de misturá-la, depois de estéril, a meio de cultivo concentrado contendo células em suspensão. Além disso, esta abordagem de esterilização se aproxima mais de uma esterilização terminal do que a esterilização dos polissacarídeos na forma de pó ou da solução contendo apenas alginato.

Para tal, utilizou-se uma solução contendo 2% de alginato e 5% de xantana. Neste caso, notou-se apenas um leve escurecimento das soluções e redução discreta da viscosidade, em níveis significativamente menores do que os verificados para as soluções sem a xantana. Por esse motivo, optou-se por, quando requerido, fazer a esterilização das soluções concentradas por calor úmido.

5.2 Formulação dos hidrogéis

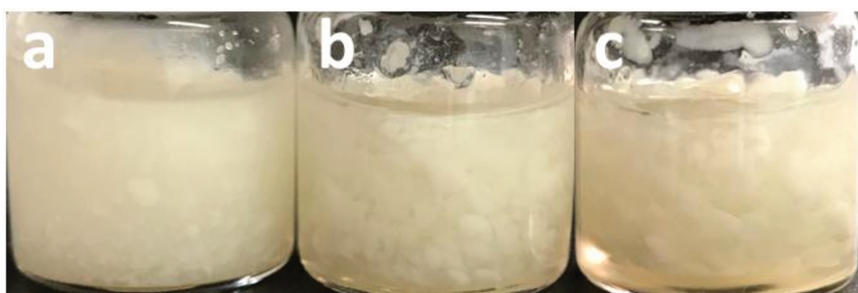
5.2.1 Formulações consistindo de alginato, CMF e goma xantana

Géis à base de alginato, CMF e goma xantana foram preparados e foi inicialmente realizada a análise visual de sua estabilidade.

5.2.1.1 Análise da estabilidade dos materiais

Na Figura 14, nota-se que a mistura de alginato, CMF e goma xantana em diferentes proporções não foi homogênea. Houve uma separação de fases, provavelmente em uma fase aquosa contendo alginato e goma xantana e a fase sólida de aglomerados de CMF, evidenciados pela coloração esbranquiçada característica da suspensão antes da mistura.

Figura 14 – Aspecto das suspensões contendo alginato, CMF e xantana nas formulações $A_{0,9}C_{2,1}X_0$ (a), $A_{0,9}C_{2,1}X_{0,8}$ (b), $A_{0,9}C_{2,1}X_{1,2}$ (c).



A CMF tem a superfície levemente carregada negativamente, que gera uma interação eletrostática de repulsão a longas distâncias. Porém a distâncias mais curtas, as forças de van der Waals passam a ser mais significativas e ocorre atração intermolecular das cadeias de celulose, que interagem através de ligações de hidrogênio (HUBBE e ROJAS, 2008; KARPPINEN *et al.*, 2012).

A xantana, por sua vez, é utilizada na indústria papelreira para estabilizar suspensões em concentrações de 0,1 a 0,2%, sendo também muito empregada na indústria alimentícia para reduzir a disponibilidade de água, devido ao seu caráter hidrofílico em concentrações que variam entre 0,05 a 0,5% (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

No presente trabalho, a concentração de polissacarídeos hidrofílicos varia entre 0,9 e 2,1%. As altas concentrações utilizadas provavelmente causaram a agregação da MFC, devido às forças atrativas entre as cadeias de celulose a curtas distâncias. Este fato é evidenciado pela aglomeração mais significativa conforme a concentração de xantana aumenta.

Após dois ciclos de tratamento com ultrassom, totalizando um período de 1 h, não foram observadas mudanças na suspensão. Como não foi possível dispersar a CMF de forma eficiente, seu uso para o propósito do trabalho não se mostrou viável, de forma que o estudo foi continuado utilizando apenas alginato e goma xantana.

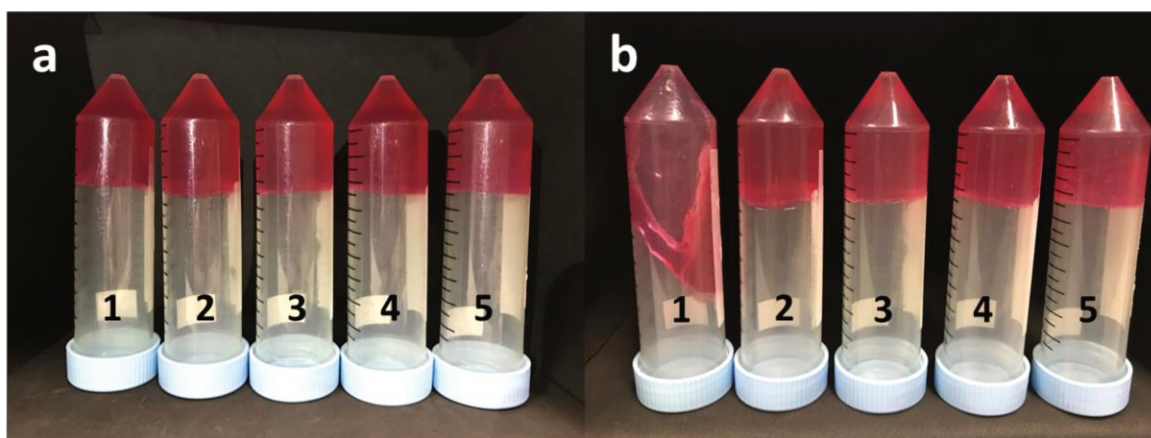
5.2.2 Formulações consistindo de alginato e goma xantana

As soluções produzidas com alginato e xantana em meio de cultura α -MEM foram analisadas conforme descrito abaixo.

5.2.2.1 Análise exploratória da estabilidade e do comportamento reológico dos hidrogéis obtidos

Uma maneira prática, rápida e eficiente de se analisar, em caráter preliminar, se uma formulação proposta para bioimpressão é ou não adequada para este fim é a avaliação do escoamento e da estabilidade do material pelo teste de inversão de tubo. Li e colaboradores (2017), por exemplo, avaliaram a adequação de suas formulações por inversão de tubo e concluíram que os materiais que escoaram após 5 minutos não eram adequados para impressão (LI *et al.*, 2017). Com o mesmo propósito, fez-se a avaliação no presente trabalho de cinco formulações distintas combinando de 1 a 2% de alginato e de 1 a 2,5% de xantana na presença ou não de cálcio. Os resultados são mostrados na Figura 15.

Figura 15 – Aspecto das soluções contendo alginato e xantana antes (a) e após (b) 5 minutos da inversão de tubo nas seguintes formulações: A-SF_{2,0}X_{1,0} (1); A-SF_{1,5}X_{1,5} (2); A-SF_{1,0}X_{2,0} (3); A-SF_{1,0}X_{2,5} (4) e A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca (5).



Nota-se nos tubos logo após a inversão que as soluções apresentam-se homogêneas. Já na imagem dos mesmos tubos após 5 minutos, nota-se que a formulação A-SF_{2,0}X_{1,0} escoou neste período, indicando que a solução não apresentaria estabilidade suficiente após a impressão, o que dificultaria a deposição de camadas verticais subsequentes. Deste modo, a análise da formulação A-SF_{2,0}X_{1,0} foi descontinuada nas etapas subsequentes.

Observou-se ainda neste ensaio que todas as formulações incorporam ar durante seu preparo, o que pode ser facilmente solucionado pela centrifugação do material. Entretanto, após a centrifugação, uma das formulações, a pré-reticulada (A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca), ainda apresentava bolhas, possivelmente em função de sua maior viscosidade.

A formulação estéril também foi visualmente analisada quanto à sua homogeneidade e estabilidade, seu aspecto pode ser observado na Figura 16. Nota-se que não houve separação de fases e que os materiais não escoaram após 5 minutos da inversão dos tubos.

A Tabela 12 sumariza os resultados descritos neste item, dando, então, subsídios para a seleção das formulações A-SF_{1,5}X_{1,5}, A-SF_{1,0}X_{2,0}, A-SF_{1,0}X_{2,5}, A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca e A-HF_{1,0}X_{2,5} que foram mais detalhadamente investigadas adiante no que se refere às propriedades reológicas.

Figura 16 – Aspecto da solução estéril contendo alginato e xantana antes (a) e após (b) 5 minutos da inversão de tubo para a formulação A-HF_{1,0}X_{2,5}.

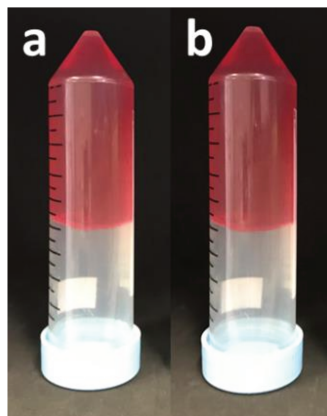


Tabela 12 – Sumário das características de diferentes formulações de hidrogel verificadas visualmente.

Formulação	Esterilização	Aspecto visual	Escoamento 5 min após inversão?	Retenção de bolhas após a centrifugação	Formulação considerada promissora?
A-SF _{2,0} X _{1,0}	Não	Límpido	Sim	Não	Não
A-SF _{1,5} X _{1,5}	Não	Límpido	Não	Não	Sim
A-SF _{1,0} X _{2,0}	Não	Límpido	Não	Não	Sim
A-SF _{1,0} X _{2,5}	Não	Límpido	Não	Não	Sim
A-SF _{1,0} X _{2,0} Ca	Não	Límpido	Não	Sim	Parcialmente
A-HF _{1,0} X _{2,5}	Sim	Límpido	Não	Não	Sim

5.3 Análise das características reológicas das formulações mais promissoras

O comportamento reológico das formulações A-SF_{1,5}X_{1,5}, A-SF_{1,0}X_{2,0}, A-SF_{1,0}X_{2,5}, A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca e A-HF_{1,0}X_{2,5} foi avaliado e os resultados obtidos encontram-se neste item. Porém, como a formulação A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca continuou apresentando retenção de bolhas após a centrifugação, somente um ensaio de caracterização reológica pôde ser realizado para esta formulação.

Inicialmente foram avaliados os dados de variação de viscosidade com a taxa de cisalhamento, apresentados na Figura 17. Os valores respectivos calculados para os índices da Lei de Potência (n), índice de consistência (k) e tensão limite de escoamento estão apresentados na Tabela 13.

Figura 17 – Variação da viscosidade com a taxa de cisalhamento das formulações contendo alginato e xantana.

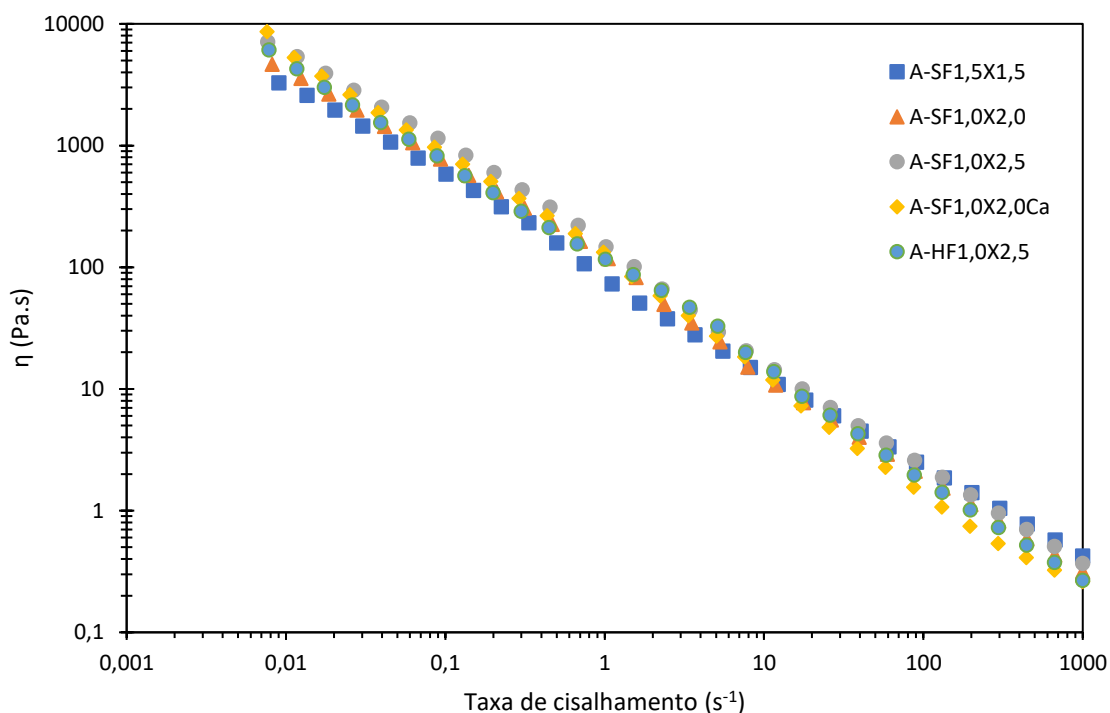


Tabela 13 – Índice da Lei de Potência (n), índice de consistência (k) e tensão limite de escoamento das formulações contendo alginato e xantana.

Amostra	n	k (Pa.s ^{n})	Tensão limite de escoamento (Pa)
A-SF_{1,5}X_{1,5}	$0,218 \pm 0,008$ ^a	$84,5 \pm 3,8$ ^a	160 ± 3 ^{a, b}
A-SF_{1,0}X_{2,0}	$0,158 \pm 0,005$ ^b	$96,9 \pm 4,1$ ^a	155 ± 15 ^a
A-SF_{1,0}X_{2,5}	$0,141 \pm 0,007$ ^b	$125,3 \pm 8,9$ ^b	201 ± 12 ^b
A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca	$0,092$ ^c	$105,3$ ^{a, b}	158 ^{a, b}
A-HF_{1,0}X_{2,5}	$0,141 \pm 0,000$ ^b	$104,8 \pm 1,7$ ^{a, b}	182 ± 3 ^{a, b}

*Letras iguais representam resultados estatisticamente iguais para o mesmo parâmetro.

Nota-se, apesar da sobreposição das curvas, que a formulação que apresenta caráter pseudoplástico mais significativo é a A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca, evidenciada pela inclinação mais acentuada da curva de viscosidade, quando comparada às outras formulações. Este fato é comprovado pelos valores dos índices n , uma vez que para $n < 1$, o fluido se caracteriza como pseudoplástico, ou seja, sua viscosidade reduz com o aumento da taxa cisalhante aplicada ao material. Ademais, quanto menor for o valor de n , mais pseudoplástico é o material (MORRISON, 2001).

Assim, a pseudoplasticidade dos hidrogéis decresce na seguinte ordem:
 $A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca > A-SF_{1,0}X_{2,5} = A-HF_{1,0}X_{2,5} = A-SF_{1,0}X_{2,0} > A-SF_{1,5}X_{1,5}$.

Analisando-se o comportamento das amostras que não foram pré-reticuladas, nota-se que o caráter pseudoplástico do material foi mais evidente nas formulações contendo maior concentração de xantana. Isso era esperado, uma vez que a xantana apresenta maior influência sobre essa característica, devido ao seu próprio comportamento altamente pseudoplástico (PETRI, 2015). Além disso, de acordo com a literatura (DÁVILA e D'ÁVILA, 2019; MARKSTEDT *et al.*, 2015), a curva de viscosidade do alginato, na concentração de 1 e 2% (m/v), apresenta um platô em baixas taxas de cisalhamento, característico de comportamento Newtoniano. Um leve comportamento pseudoplástico da solução de alginato começa a ser evidenciado com taxas de cisalhamento de cerca de 100 s^{-1} (DÁVILA e D'ÁVILA, 2019).

Como a formulação estéril ($A-HF_{1,0}X_{2,5}$) apresentou o mesmo valor de n da formulação não estéril de igual concentração polimérica após o ajuste à Lei de Potência, este é mais um indicativo de que a goma xantana não se degradou com o processo de esterilização e de que ela é a responsável por conferir a pseudoplasticidade ao material.

Ao se comparar a pseudoplasticidade das formulações $A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca$ e $A-SF_{1,0}X_{2,0}$, observa-se que a formulação pré-reticulada apresenta a redução da viscosidade mais significativa com o aumento da taxa de cisalhamento. Isso ocorre porque ao adicionar os íons cálcio à solução, uma estrutura tridimensional é formada, devido à reticulação dos blocos G e formação da estrutura conhecida como “caixa de ovos”. A formação dessa estrutura causa o aumento da viscosidade da solução e reduz o emaranhamento das cadeias poliméricas. Assim, ao aplicar uma taxa cisalhante, as cadeias poliméricas podem mais facilmente se organizar no sentido do fluxo da solução, a qual apresenta maior redução de viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento quando comparada à solução de alginato que não foi pré-reticulada (FERNÁNDEZ FARRÉS e NORTON, 2014; PAMIES *et al.*, 2010).

O índice de consistência é a constante de proporcionalidade entre a viscosidade e a taxa de cisalhamento e é determinado ajustando-se os dados à Lei de Potência, sendo próximo à viscosidade do material a uma taxa de cisalhamento

de 1 s^{-1} (MORRISON, 2001; PAXTON *et al.*, 2017). Nas curvas de viscosidade na Figura 17, a viscosidade em $\gamma = 1 \text{ s}^{-1}$ decresce na seguinte ordem: A-SF_{1,0}X_{2,5}; A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca = A-HF_{1,0}X_{2,5} = A-SF_{1,0}X_{2,0} e A-SF_{1,5}X_{1,5}.

Ademais, nota-se, pelos valores de índice de consistência apresentados na Tabela 13 que um aumento mais significativo foi observado para a formulação A-SF_{1,0}X_{2,5} quando comparada às outras.

Ao compararmos as formulações A-SF_{1,0}X_{2,5} e A-HF_{1,0}X_{2,5}, nota-se que o índice de consistência da formulação estéril diminuiu. Isso era esperado, uma vez que o processo de esterilização degrada as cadeias de alginato, conforme evidenciado anteriormente, reduzindo, assim, a viscosidade do material e, consequentemente, o índice de consistência.

Ainda, as formulações estudadas apresentaram comportamento mais pseudoplástico do que o Nívea Crème (creme Nívea), considerado um bom material para impressão, cujos valores de n e k reportados são de 0,552 e 26,1 Pa.s ^{n} , respectivamente (PAXTON *et al.*, 2017).

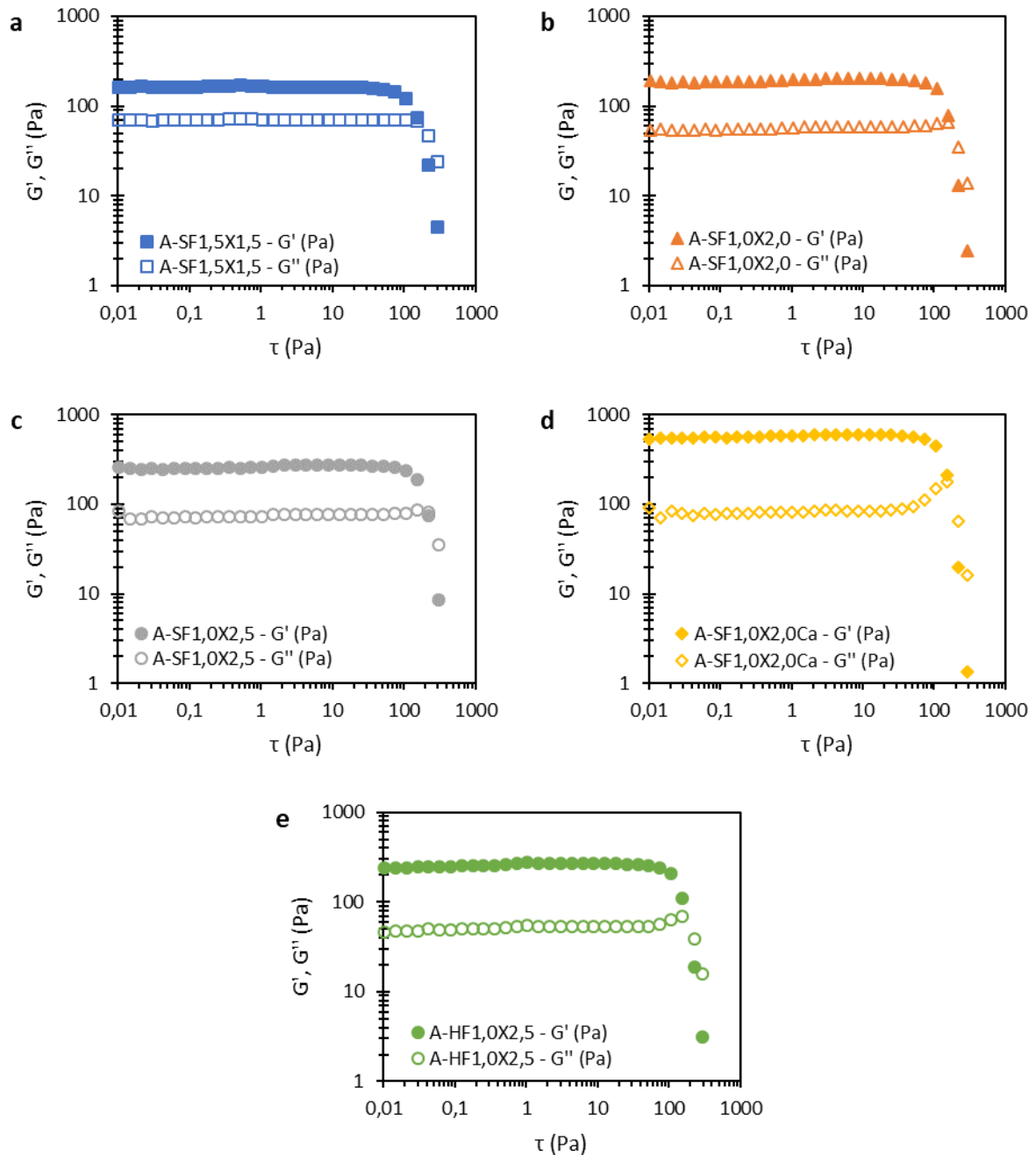
Com os ensaios oscilatórios de amplitude foi possível determinar um valor de tensão de cisalhamento dentro da região de linearidade viscoelástica para, na sequência, realizar ensaios oscilatórios de frequência. Os ensaios oscilatórios de amplitude tiveram o propósito de possibilitar, também, a determinação da tensão limite de escoamento das formulações estudadas, definida como a tensão necessária para que um material escoe (MORRISON, 2001). Abaixo deste valor supostamente não ocorre o deslocamento do material. Essa tensão pode ser determinada pelo ponto em que o módulo elástico (G') se iguala ao viscoso (G'') (MALVERN INSTRUMENTS, 2012; WILSON *et al.*, 2017).

Na Figura 18, nota-se que a formulação que apresentou maior tensão limite de escoamento foi a A-SF_{1,0}X_{2,5}. Isso pode ser justificado pelo aumento da viscosidade causado pela maior concentração de xantana, que conferiu maior resistência ao escoamento do material.

Os valores da tensão limite de escoamento determinados com base nos dados da Figura 18 encontram-se na Tabela 13. Observa-se que ao se manter a concentração polimérica total de 3% (m/v), a tensão limite de escoamento quase não varia entre as três formulações (A-SF_{1,5}X_{1,5}, A-SF_{1,0}X_{2,0} e A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca). No entanto,

ao se aumentar a concentração de xantana de 2,0 para 2,5% (m/v) notou-se uma elevação da tensão necessária para que o material escoasse.

Figura 18 – Módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da tensão para as formulações A-SF1,5X1,5 (a), A-SF1,0X2,0 (b), A-SF1,0X2,5 (c), A-SF1,0X2,0Ca (d) e A-HF1,0X2,5 (e).



Liu e colaboradores (2019) também observaram aumento da tensão limite de escoamento ao aumentar a concentração de xantana em suas formulações. Esta

é uma característica importante do material, pois essa tensão deve ser superada para que se tenha a deposição do material por extrusão; no entanto, essa mesma propriedade deve ser suficiente alta para que o material não escoe após a deposição e que permita, também, a deposição das camadas subsequentes (LIU *et al.*, 2019).

Avaliando-se esta mesma característica para a amostra estéril A-HF_{1,0}X_{2,5}, nota-se que esta apresentou um valor intermediário de tensão limite de escoamento entre as formulações contendo 3 e 3,5% (m/v) de concentração polimérica total. Isso ocorre porque tanto a concentração polimérica quanto a massa molar média do polissacarídeo utilizado influenciam na viscosidade e no escoamento do material (GÓMEZ-DÍAZ e NAVAZA, 2003; MANCINI; MORESI e SAPPINO, 1996).

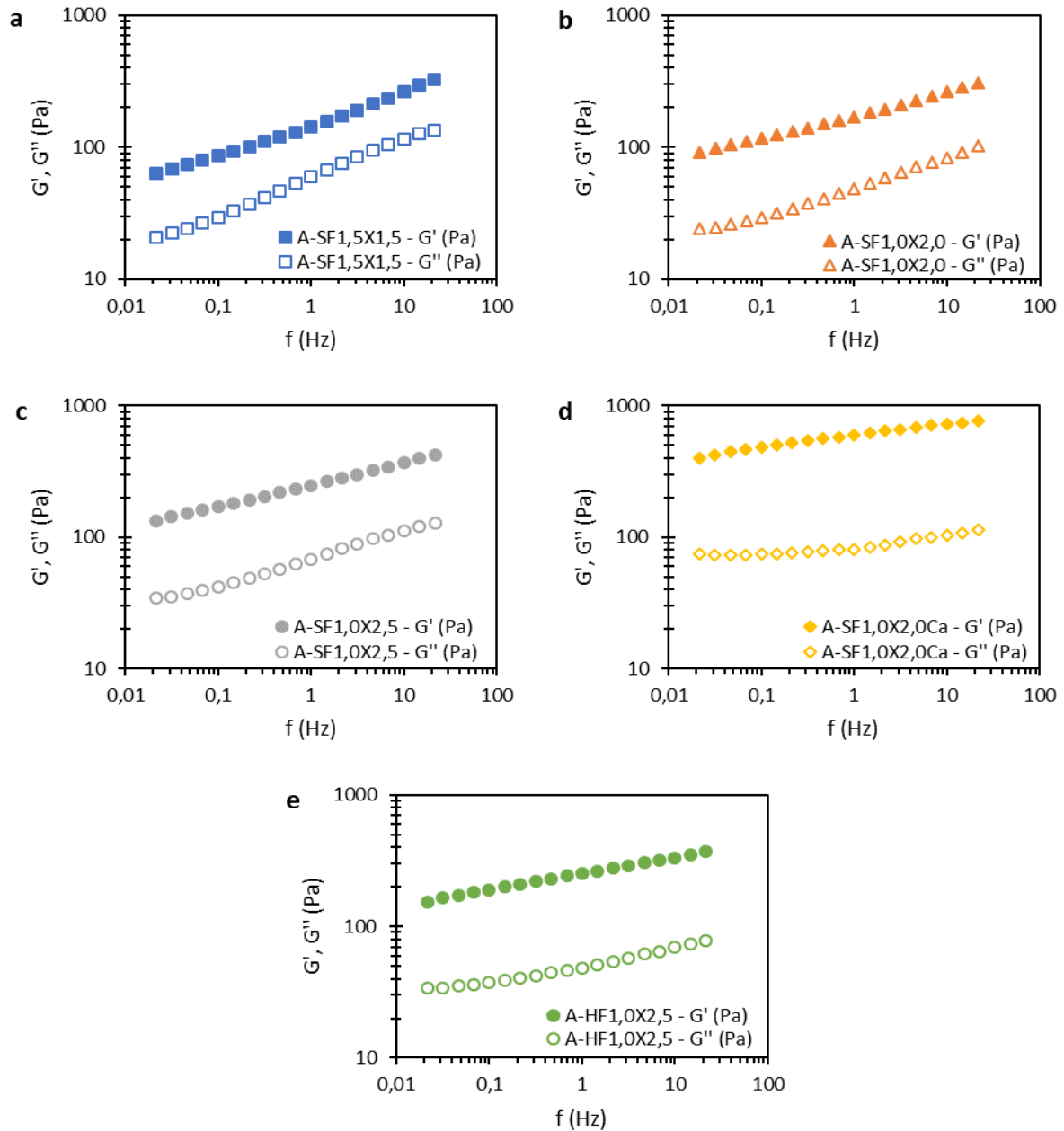
A concentração polimérica e a massa molar média influenciam na flexibilidade e mobilidade das cadeias, devido tanto às interações inter e intramoleculares mais fortes ou fracas quanto ao emaranhamento das cadeias. Ao reduzir estas propriedades, reduziu-se a tensão necessária para que o material escoasse, se comparada à do material não estéril.

Os resultados dos ensaios oscilatórios de frequência são apresentados na Figura 19, na qual se nota que, para todas as formulações, o módulo elástico é superior ao viscoso em toda a faixa de frequências analisada. Dessa forma, os materiais são predominantemente elásticos, característica de géis e não de líquidos (MARKSTEDT *et al.*, 2015). Essa propriedade pode ser melhor observada através de dados da tangente de perda ($\tan \delta$), ilustrados na Figura 20, que representa a relação entre a quantidade de energia perdida e de energia armazenada e é dada pela razão entre G'' e G' ($\tan \delta = G''/G'$), cujos valores mantiveram-se abaixo de 0,4 para todos os materiais testados. A predominância do comportamento elástico, que é mais significativo para quanto menor for $\tan \delta$, é maior para a formulação A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca, seguida por A-HF_{1,0}X_{2,5}, depois por A-SF_{1,0}X_{2,5} e A-SF_{1,0}X_{2,0} e, finalmente, por A-SF_{1,5}X_{1,5}.

Mais uma vez, comparando a formulação estéril e a não estéril de mesma concentração, pode-se afirmar que a estéril A-HF_{1,0}X_{2,5} apresentou comportamento mais elástico do que a A-SF_{1,0}X_{2,5}. As cadeias mais curtas do alginato podem ter

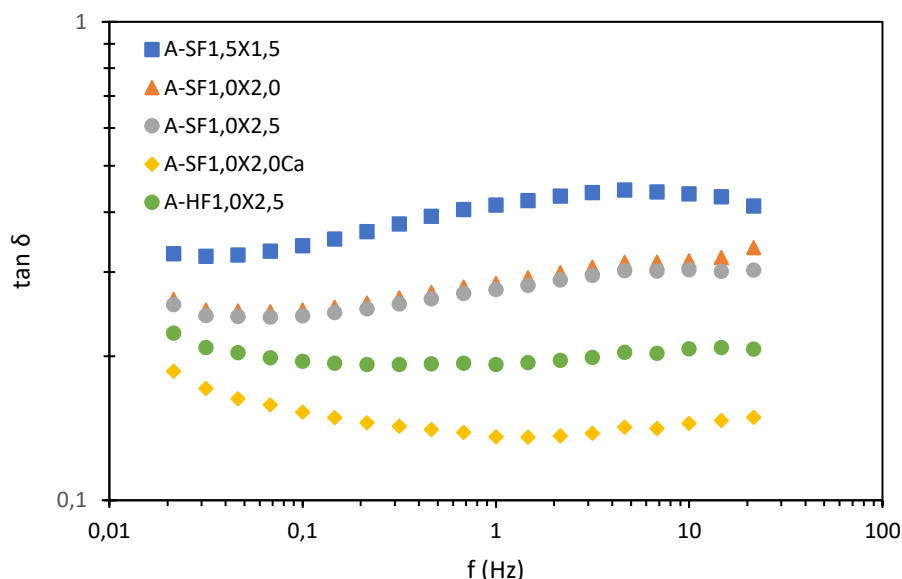
favorecido a deformação elástica, uma vez que provavelmente encontram-se menos emaranhadas e com maior mobilidade do que as cadeias mais longas.

Figura 19 – Módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da frequência de oscilação do rotor para as formulações A-SF_{1,5}X_{1,5} (a), A-SF_{1,0}X_{2,0} (b), A-SF_{1,0}X_{2,5} (c), A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca (d) e A-HF_{1,0}X_{2,5} (e).



Assim, pode-se concluir que a formulação estéril requer menor tensão para escoar. Porém, enquanto não escoar, sua deformação é mais elástica do que a da não estéril, devido à menor massa molar das cadeias poliméricas do alginato.

Figura 20 – Variação da tangente de perda em função da alteração da frequência de oscilação do rotor.



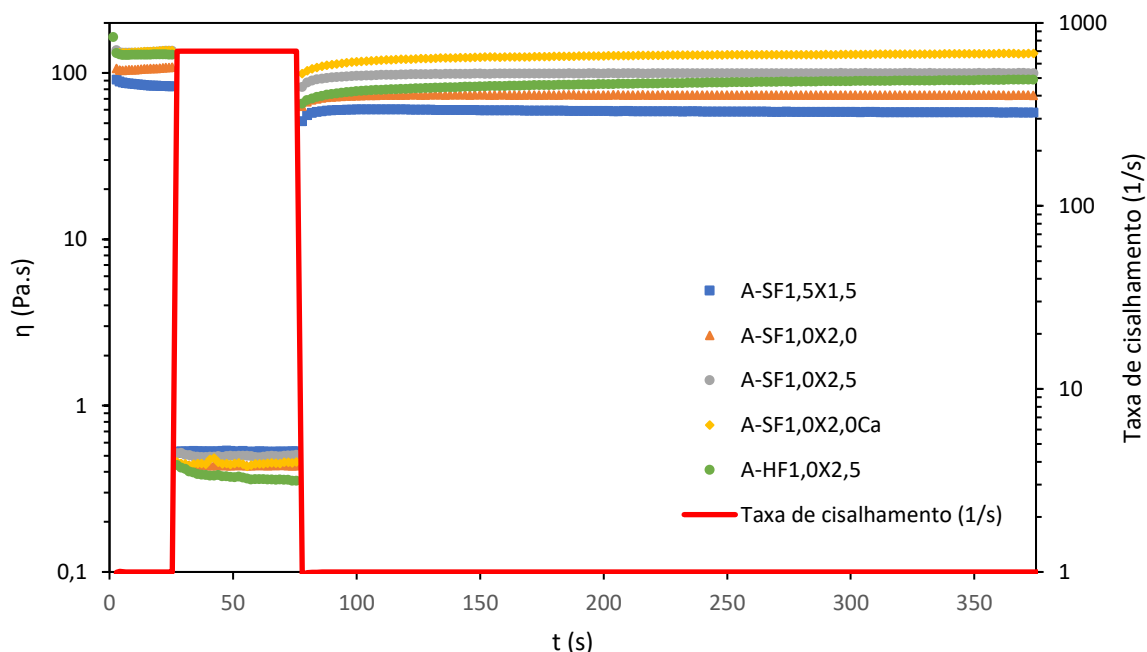
No entanto, nota-se, na Figura 19, que os módulos elásticos variam com a frequência de oscilação do rotor, que é um comportamento característico de fluidos viscosos. O módulo elástico de géis ideais independe da frequência e tem-se que G' é muito maior que G'' (PÄÄKKÖ *et al.*, 2007).

Pelos dados obtidos pode-se afirmar que a formulação que mais se aproxima de um gel ideal foi a A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca, e que as formulações se distanciaram desse comportamento ideal de forma semelhante à observada para o comportamento elástico. O fato de as formulações estudadas não apresentarem comportamento exatamente de géis ideais não necessariamente inviabiliza sua utilização, como observado por Markstedt e colaboradores (2015), que também não obtiveram biotintas com o comportamento de géis ideais (MARKSTEDT *et al.*, 2015).

Os materiais também foram avaliados quanto a sua capacidade de recuperar a viscosidade após a aplicação de altas taxas de cisalhamento (Figura 21). Para isso, mediu-se a viscosidade dos materiais enquanto foi aplicada uma taxa de cisalhamento de 1 s^{-1} durante 25 s, seguido de um período de 50 s a uma alta taxa cisalhante de 700 s^{-1} e, por fim, novamente um período de 300 s a 1 s^{-1} para analisar o quanto da viscosidade inicial foi recuperada pelas formulações testadas. Por esse motivo, as curvas apresentam descontinuidade nos tempos em que houve

a mudança da taxa cisalhante. Conforme indicado na Figura 21, a viscosidade antes do aumento da taxa de cisalhamento é muito próxima para as formulações A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca, A-HF_{1,0}X_{2,5} e A-SF_{1,0}X_{2,5}, seguidas, em ordem decrescente por A-SF_{1,0}X_{2,0} e A-SF_{1,5}X_{1,5}, com os respectivos valores de cerca de 130, 105 e 85 Pa.s.

Figura 21 – Viscosidade em função de diferentes taxas de cisalhamento ao longo do tempo para as formulações contendo alginato e xantana.



Durante a aplicação da taxa de cisalhamento de 700 s^{-1} , as viscosidades de todas as formulações ficaram muito próximas, variando entre 0,35 e 0,53 Pa.s. Logo após a redução da taxa de cisalhamento, os materiais recuperaram rapidamente sua viscosidade, sendo que após 30 s a viscosidade era muito próxima da obtida ao fim do período de 300 s de avaliação da recuperação, com exceção das formulações A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca e A-HF_{1,0}X_{2,5}.

No entanto, como pode ser melhor observado através dos valores calculados na Tabela 14, os materiais não recuperaram totalmente sua viscosidade. Devido a esse fato, pelo período analisado, as formulações não podem ser consideradas tixotrópicas, com exceção da A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca. Para os outros materiais é provável que períodos mais longos fossem necessários para que recuperassem

completamente sua viscosidade, após a redução da taxa cisalhante aplicada, e se pudesse verificar esse tipo de comportamento (ALGER, 2017).

Tabela 14 – Capacidade das formulações contendo alginato e xantana de recuperar a viscosidade após a aplicação de alta taxa cisalhante.

Amostra	Recuperação da viscosidade (%)
A-SF_{1,5}X_{1,5}	69,8 ± 0,4 ^a
A-SF_{1,0}X_{2,0}	69,5 ± 0,6 ^a
A-SF_{1,0}X_{2,5}	73,8 ± 0,3 ^a
A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca	94,0 ^b
A-HF_{1,0}X_{2,5}	72,3 ± 7,2 ^a

As formulações A-SF_{1,5}X_{1,5} e A-SF_{1,0}X_{2,0}, A-SF_{1,0}X_{2,5} e A-HF_{1,0}X_{2,5} e A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca recuperaram cerca de 70, 73 e 94% de suas viscosidades iniciais, respectivamente. Ao aumentar a concentração de xantana em 0,5% (m/v) registrou-se, também, um aumento da recuperação de viscosidade. O mesmo foi observado por Liu e colaboradores (2019) e, segundo eles, essa característica está, em parte, associada à interação intermolecular da xantana, estabilizada por ligações de hidrogênio, e à habilidade de se deformar rapidamente ao ser submetida a altas taxas de cisalhamento (LIU *et al.*, 2019). A maior recuperação de viscosidade da formulação pré-reticulada também está relacionada à capacidade de deformação da estrutura tridimensional formada devido à pré-reticulação. Desta forma, mecanismos que ajudem a estabilizar as interações intermoleculares favorecem uma maior recuperação de viscosidade.

Wilson e colaboradores (2017) também observaram esse fato, pois ao adicionar nanosilicato à kappa-carragena, a interação entre eles foi responsável por um aumento da recuperação do módulo elástico de 69 para 99% (WILSON *et al.*, 2017).

Apesar de as formulações poliméricas testadas não terem sido capazes de recuperar completamente a sua viscosidade, ainda podem ser utilizadas para impressão, uma vez que apresentaram valores suficientemente próximos de 80%, considerado suficiente para a impressão, segundo a literatura (PEAK *et al.*, 2018). Ademais, Li e colaboradores (2017) foram capazes de imprimir um hidrogel à base

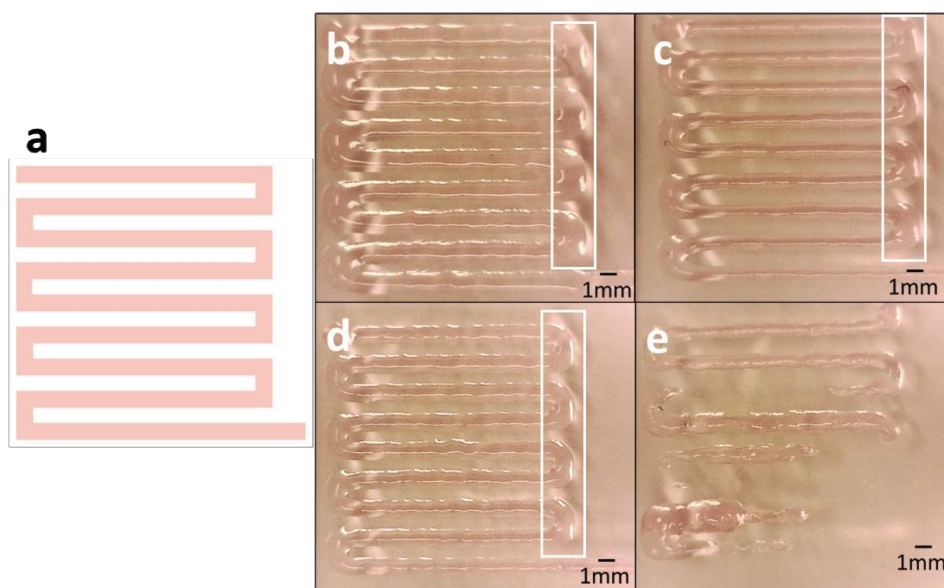
de alginato pré-reticulado e metilcelulose que recuperava apenas 60% da viscosidade inicial, após a aplicação de uma alta taxa cisalhante (LI *et al.*, 2017).

Assim, as formulações A-SF_{1,5}X_{1,5}, A-SF_{1,0}X_{2,0}, A-SF_{1,0}X_{2,5} e A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca foram empregadas para a impressão de estruturas depositadas por manufatura aditiva, cujos resultados estão apresentados a seguir.

5.4 Deposição das estruturas por manufatura aditiva

Inicialmente foi impressa apenas uma camada com cada uma das formulações não estéreis que não escoaram durante o teste de inversão de tubo e que tiveram sua reologia analisada. O registro fotográfico dessas camadas impressas encontra-se na Figura 22.

Figura 22 – Aspecto da estrutura pré-definida (a) e de uma camada impressa das formulações não-estéreis A-SF_{1,5}X_{1,5} (b), A-SF_{1,0}X_{2,0} (c), A-SF_{1,0}X_{2,5} (d) e A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca (e), com retângulos brancos evidenciando as bordas da estrutura impressa.



Nota-se que a formulação pré-reticulada (A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca, Figura 22e), apesar de ter apresentado bons resultados na etapa de caracterização anterior, não se apresentou como um material adequado para impressão. Isso se deve ao fato de o gel produzido apresentar aglomerados, provavelmente causados pela adição direta do sal de cálcio à solução polimérica, gelificando o material de forma heterogênea (DRAGET, 2009).

Os aglomerados produzidos devido à gelificação não homogênea comprometeu a uniformidade do gel, sendo que os aglomerados dificultaram a deposição do material, provavelmente por serem maiores do que o diâmetro interno do bico utilizado e pela heterogeneidade do comportamento reológico devido a presença dos aglomerados. Dessa forma, tem-se partes da estrutura impressa em que não ocorreu a deposição do material e partes em que houve deposição excessiva, quando a tensão acumulada foi suficiente para extrudar o aglomerado (Figura 22e).

Heterogeneidade devido à pré-reticulação também foi reportada por Chung e colaboradores (2013), que observaram flutuação da força necessária para extrudar o material, composto de alginato pré-reticulado com cálcio (CHUNG *et al.*, 2013). Desta forma, não foram feitas as caracterizações subsequentes do gel pré-reticulado, uma vez que a impressão de uma camada homogênea não se mostrou possível.

Avaliando as formulações às quais não se adicionou cálcio, pode-se verificar pela impressão das bordas da geometria impressa, evidenciadas nos retângulos brancos da Figura 22, que a fidelidade da forma impressa à geometria planejada aumentou na seguinte ordem: A-SF_{1,5}X_{1,5}; A-SF_{1,0}X_{2,0}; A-SF_{1,0}X_{2,5}. A melhora foi evidenciada pela redução do diâmetro da impressão na região destacada. Essa melhora pode ser justificada pelo aumento da viscosidade a baixas taxas de cisalhamento, associada ao aumento da concentração de xantana, como evidenciado pelas curvas de viscosidade apresentadas na Figura 17, pois a viscosidade do material é um fator relevante para evitar o escoamento, e consequente desestruturação, da estrutura impressa (MALDA *et al.*, 2013).

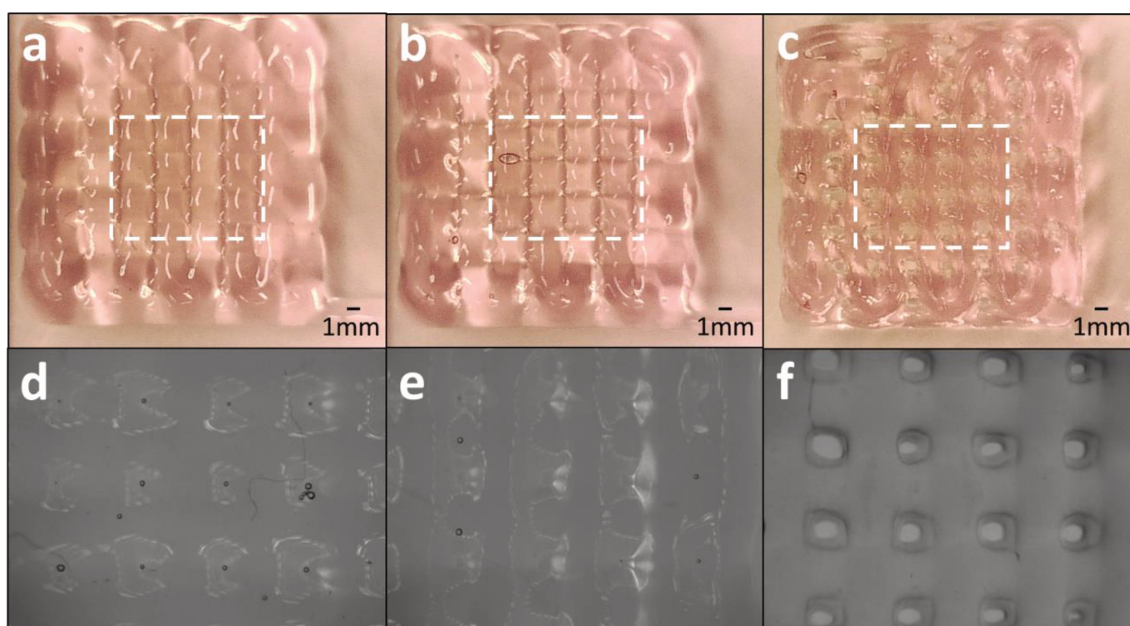
Após a impressão de uma camada, foram impressas quatro camadas sucessivas, uma no topo da outra, com cada uma das formulações avaliadas anteriormente. A imagem da estrutura impressa e a respectiva imagem da ampliação estão na Figura 23.

Observa-se que as formulações A-SF_{1,5}X_{1,5} e A-SF_{1,0}X_{2,0} não foram capazes de manter a estrutura impressa em múltiplas camadas, uma vez que não é possível observar os poros (Figura 23a, b, d, e) nas imagens macroscópicas ou nas

ampliações. Assim, estas formulações também não foram consideradas adequadas para serem utilizadas para impressão.

A única formulação que foi capaz de manter a estrutura porosa após a deposição foi a A-SF_{1,0}X_{2,5}. No entanto, nota-se que a resolução dos poros da borda da estrutura impressa foi menor do que na região central, característica reportada também em outros trabalhos (DUAN *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2016). Além disso, na intersecção das fibras, o material, por não apresentar estabilidade estrutural suficiente, escoou por ação da gravidade. Por esse motivo os poros apresentam a forma de um retângulo de arestas arredondadas.

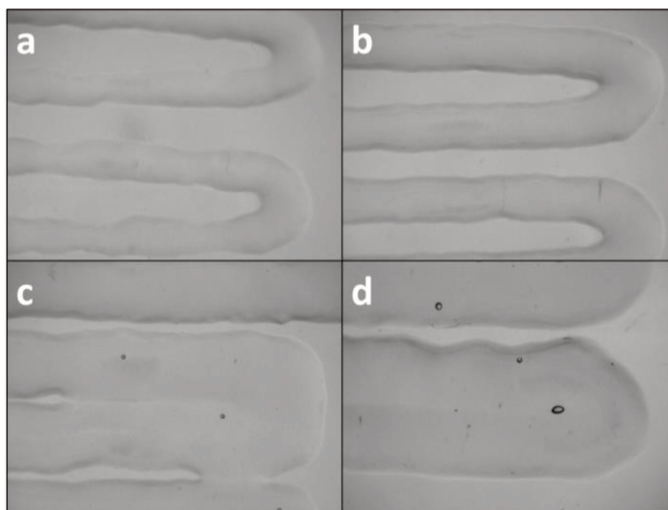
Figura 23 – Aspecto da impressão de quatro camadas das formulações não-estéreis A-SF_{1,5}X_{1,5} (a, d), A-SF_{1,0}X_{2,0} (b, e), A-SF_{1,0}X_{2,5} (c, f), com retângulos brancos de linhas pontilhadas evidenciando a região ampliada.



Assim, buscando melhorar a definição do material impresso para a formulação A-SF_{1,0}X_{2,5}, fez-se o ajuste de alguns dos parâmetros de impressão: a taxa de deposição (TD), medida em mm de deslocamento do êmbolo/ mm da trajetória de impressão; o tempo de *push out* (PO), que é quanto tempo antes do início da impressão o êmbolo deve começar a se deslocar; e o tempo de *suck back* (SB), que é quanto tempo antes do fim da impressão o êmbolo deve começar a se movimentar no sentido inverso.

As camadas impressas com cada taxa de deposição são mostradas na Figura 24. Nota-se que a taxa de deposição mais baixa (0,0010 mm/mm) não foi suficiente para depositar as fibras da estrutura de maneira uniforme, evidenciada pela falha de deposição em alguns pontos (Figura 24a). Já as deposições a taxas mais elevadas causaram a deposição excessiva de material e a formação de fios de diâmetros elevados quando comparado ao espaçamento entre os fios pré-estabelecido, o que resultou na fusão de fios adjacentes, evidenciada principalmente nas arestas da estrutura (Figura 24c e d). Assim, a taxa de deposição definida como ideal, dentre as avaliadas, foi a de 0,0020 mm de deslocamento do êmbolo/ mm da trajetória de impressão. Nesse valor de taxa de deposição, visualmente, tem-se o diâmetro dos fios mais uniforme, sendo que não foram verificados neste caso nenhum dos problemas observados anteriormente para as taxas de deposição menores e maiores.

Figura 24 – Resultados do ajuste da taxa de deposição entre 0,0010 mm/mm (a), 0,0020 mm/mm (b), 0,0040 mm/mm (c) e 0,0060 mm/mm (d) para a formulação A-SF_{1,0}X_{2,5}.



A taxa de deposição pode ser diretamente relacionada à tensão necessária para a manutenção da deposição do material e, por consequência, à pseudoplasticidade do mesmo, pois quanto mais pseudoplástico o material, menor é a tensão necessária para mantê-lo escoando.

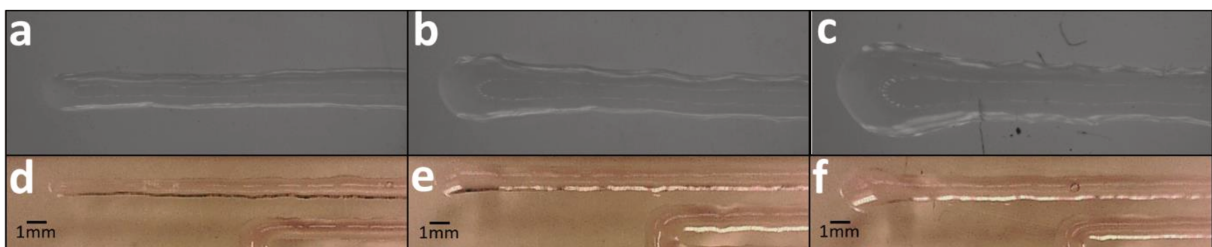
Assim, como o material aqui obtido, de acordo com a caracterização reológica, se mostrou altamente pseudoplástico, nota-se que a taxa de deposição

necessária foi baixa quando comparada às outras testadas. Fato semelhante ocorreu para o tempo de *push out*, pois não foi preciso um tempo muito longo para que a tensão limite de escoamento fosse superada. Essas características são importantes para a etapa de impressão contendo células, uma vez que a utilização de condições mais brandas de impressão, como menor taxa de deposição, reduzem a taxa de cisalhamento sobre as células, minimizando a redução de viabilidade celular devido ao processo de extrusão (WILLIAMS *et al.*, 2018).

He e colaboradores (2016) também verificaram comportamento semelhante para sua biotinta (HE *et al.*, 2016). Os autores não variaram diretamente a taxa de deposição do material, mas variaram a pressão de deposição, que são parâmetros proporcionais. Ao trabalhar com pressões elevadas, estes autores reportaram dificuldade em controlar a extrusão, resultando em baixa qualidade de impressão. Em pressões baixas não foi possível depositar o material.

Outro parâmetro ajustado foi o tempo de *push out*, este parâmetro está associado à tensão limite de escoamento, já que se o tempo for muito curto o diâmetro do fio ainda não é uniforme quando a estrutura começa a ser impressa e se o tempo for muito longo ocorre a deposição excessiva do material no início da deposição. Os resultados visuais do ajuste deste parâmetro podem ser visualizados na Figura 25.

Figura 25 – Resultados do ajuste do *push out* entre 0,005 s (a, d), 0,010 s (b, e) e 0,015 s (c, f) para a formulação A-SF_{1,0}X_{2,5}.



Nota-se que para o tempo de *push out* de 0,005 s, o diâmetro do fio aumenta conforme é depositado, no início da impressão. Ao aumentar este tempo para 0,010 s é possível notar um pequeno aglomerado logo no início da deposição, no entanto o diâmetro do fio impresso encontra-se mais uniforme após o aglomerado. Ao aumentar ainda mais o tempo de *push out* (0,015 s), observa-se a

deposição ainda mais excessiva no começo da impressão. Desta forma, o tempo de *push out* considerado mais adequado foi o de 0,010 s.

O tempo de *suck back* foi ajustado por análise visual do bico, com base no quanto de material foi aspirado de volta, como ilustrado na Figura 26. O tempo de *suck back* definido como mais adequado foi aquele no qual não se observou aspiração excessiva. Assim, ajustou-se o tempo de SB para 0,0009 s.

Figura 26 – Aspiração excessiva causada pelo alto tempo de *suck back*.



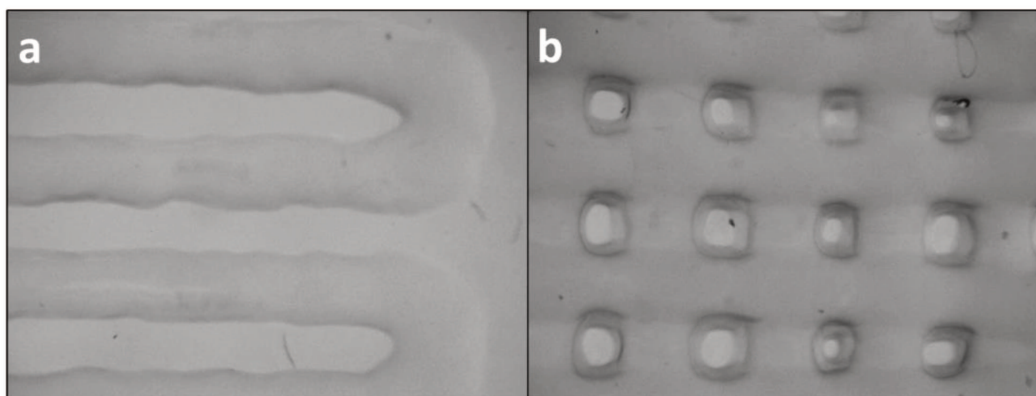
Obteve-se um diâmetro médio de fio de $1,17 \pm 0,08$ mm, que corresponde a $201 \pm 14\%$ do diâmetro do bico utilizado. Nota-se que o diâmetro de fio obtido é significativamente maior, possivelmente devido à expansão do material após a deposição (HE *et al.*, 2016). Isso ocorre devido à viscoelasticidade do material, pois ao aplicar uma tensão cisalhante, as cadeias poliméricas são alongadas, facilitando sua extrusão, e quando essa tensão é cessada as cadeias se reorganizam, retornando à sua conformação e se emaranhando novamente, causando a expansão do material extrudado, também conhecida como efeito Barus (WANG, 2012). Em alguns casos essa expansão pode chegar a três ou quatro vezes o diâmetro do bico utilizado (SHENOY, 1999).

Com estes parâmetros otimizados foram, novamente, impressas uma e quatro camadas da estrutura, utilizando o material A-SF_{1,0}X_{2,5}, e foram obtidas estruturas como as ilustradas na Figura 27.

Ademais avaliou-se a área média dos poros impressos ($0,62 \pm 0,13$ mm²), que foi comparada à área projetada, obtendo-se uma precisão de impressão de $77,1 \pm 16,6\%$. Essa redução de área ocorre devido ao escoamento parcial do material depositado e à sobreposição dos fios impressos (HE *et al.*, 2016). A

precisão de impressão calculada encontra-se próxima à reportada por Duan e colaboradores (2013), de cerca de 84% (DUAN *et al.*, 2013).

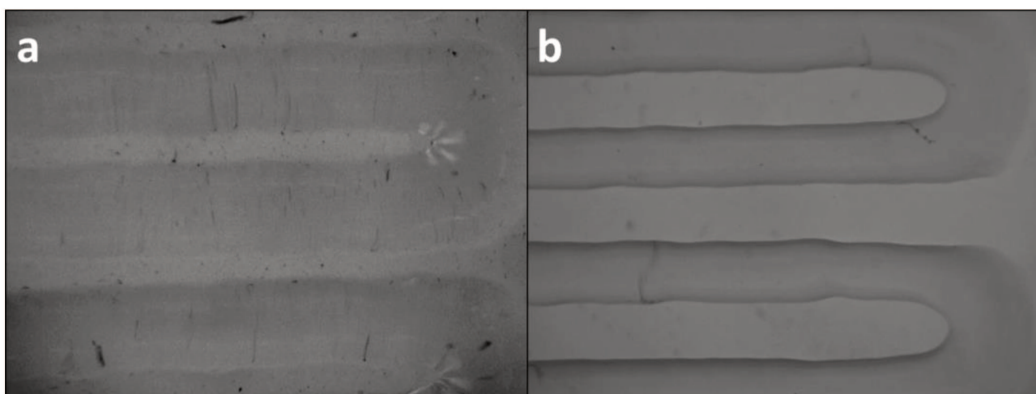
Figura 27 – Aspecto ampliado da impressão de uma (a) e quatro (b) camadas da formulação A-SF_{1,0}X_{2,5}, após a otimização dos parâmetros.



A formulação A-SF_{1,0}X_{2,5} foi considerada a mais adequada para impressão dentre as formulações não estéreis. Assim, estudou-se a deposição do material estéril, de mesma concentração polimérica A-HF_{1,0}X_{2,5}.

Inicialmente depositou-se apenas uma camada do material com os parâmetros que foram mais adequados para o material não estéril, cujo aspecto é mostrado na Figura 28a, porém verificou-se que o diâmetro médio do fio depositado aumentou consideravelmente ($1,47 \pm 0,08$ mm), representando $253 \pm 13\%$ do diâmetro do bico utilizado.

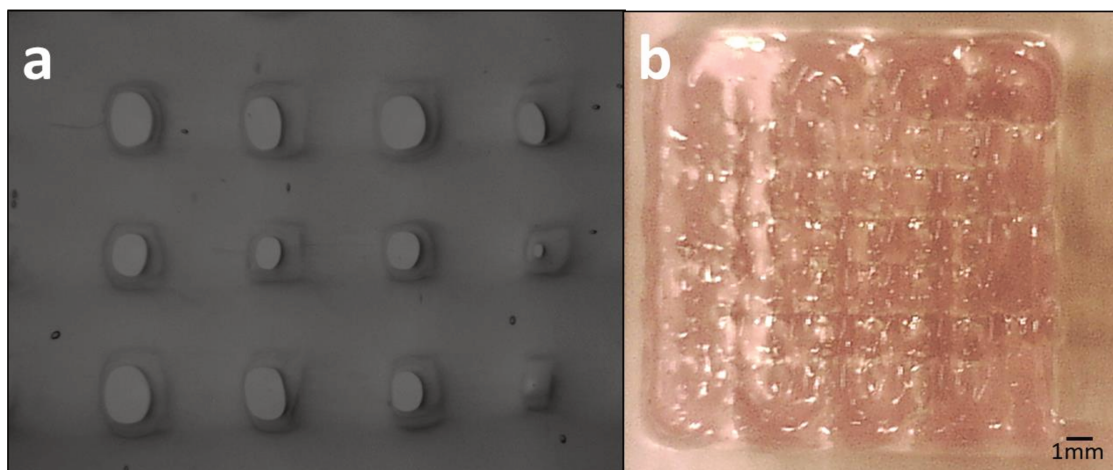
Figura 28 – Aspecto ampliado da impressão de uma camada do material A-HF_{1,0}X_{2,5} com os bicos de diâmetro interno de 0,58 mm (a) e 0,41 mm (b).



Como a estrutura pré-definida para impressão possuía um diâmetro de fio de 1 mm, para que a estrutura impressa se mantivesse semelhante à planejada, trocou-se o bico de impressão para um de diâmetro interno de 0,41 mm. Os parâmetros de impressão foram mantidos e imprimiu-se, novamente, uma camada do material estéril (Figura 28b). A deposição com o novo bico resultou em estruturas com diâmetro médio igual ao planejado, de $1,00 \pm 0,08$ mm, ou seja, com um aumento de $243 \pm 20\%$ com relação ao diâmetro do bico.

Em seguida, foram impressas quatro camadas sucessivas, as imagens encontram-se na Figura 29. Nota-se que os poros apresentam-se mais ovais e menores do que os obtidos pela impressão da formulação A-SF_{1,0}X_{2,5} (Figura 23c e f). Quantitativamente isso fica evidente ao se calcular a precisão de impressão, que neste caso foi de $67,7 \pm 22,5\%$, com uma área média dos poros de $0,55 \pm 0,18$ mm². Observa-se que a área diminuiu e o desvio padrão aumentou, devido à maior irregularidade dos poros.

Figura 29 – Aspecto da impressão de quatro camadas da formulação estéril A-HF_{1,0}X_{2,5} ampliada (a) e macroscópica (b).



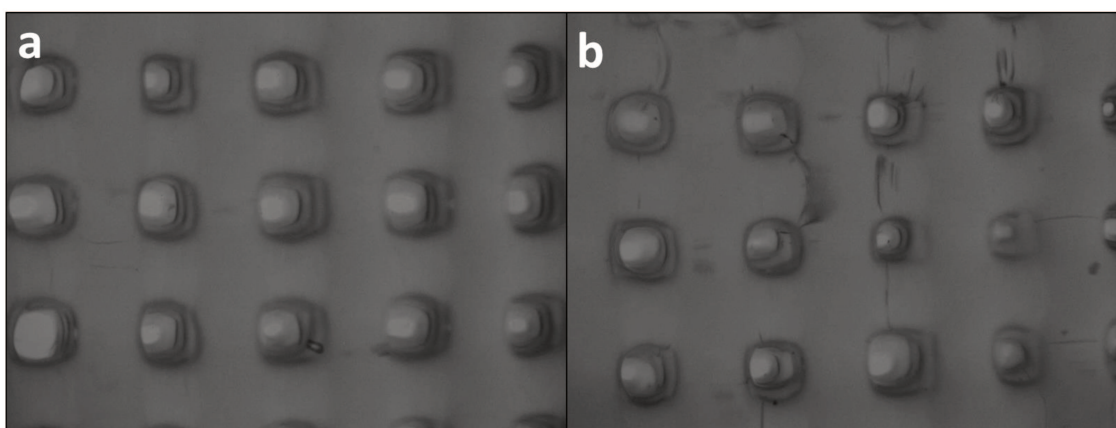
Comparando-se os valores de expansão dos fios e de precisão de impressão das formulações A-SF_{1,0}X_{2,5} e A-HF_{1,0}X_{2,5}, nota-se que a formulação estéril expandiu cerca de 40% a mais o diâmetro da fibra quando comparado ao diâmetro do bico utilizado para deposição. Quanto à precisão de impressão, houve uma redução de aproximadamente 9,4% e, também, um maior desvio padrão associado à medida.

Essa redução da qualidade da impressão provavelmente está associada à redução da tensão limite de escoamento (Tabela 13), que diminuiu cerca de 10%, combinada à recuperação de viscosidade mais lenta da formulação estéril. Por esses motivos, o material escoou mais após a deposição e não foi tão eficiente em suportar o peso das camadas subsequentes quanto a formulação A-SF_{1,0}X_{2,5}. Além disso, os maiores desvios obtidos nas medidas podem ter sido causados pela maior heterogeneidade do material, uma vez que a etapa final de mistura da formulação estéril foi manual e, por ser uma solução polimérica com o dobro da concentração final, apresentava alta viscosidade e encontrou-se maior dificuldade de dispersão do que no caso das formulações não-estéreis.

Ademais, foram impressas oito camadas das formulações A-SF_{1,0}X_{2,5} e A-HF_{1,0}X_{2,5}, apresentadas na Figura 30. Observa-se que a formulação não estéril apresenta os poros mais bem definidos e regulares, no entanto, o material estéril também foi capaz de manter seus poros, ainda que não tão regulares. Pode-se verificar também a presença de sulcos na estrutura impressa com o material estéril, provavelmente devido à alteração da estrutura do material, causada pela degradação, principalmente do alginato, durante o processo de esterilização por calor úmido.

Na sequência do estudo, optou-se por utilizar o material estéril A-HF_{1,0}X_{2,5} nas etapas subsequentes, tendo em vista que a aplicação vislumbrada para o material exige que o mesmo esteja estéril para que possa ser utilizado como biotinta para aplicações de engenharia tecidual.

Figura 30 – Aspecto das estruturas produzidas com oito camadas impressão das formulações A-SF_{1,0}X_{2,5} (a) e A-HF_{1,0}X_{2,5} (b), imagens ampliadas.



5.5 Influência da concentração da solução reticulante e do tempo de reticulação nas propriedades mecânicas e na citotoxicidade dos hidrogéis

De posse da formulação estéril considerada mais adequada, foram analisados os efeitos da concentração e do tempo de reticulação no módulo de elasticidade dos corpos de prova determinados por meio de ensaios mecânicos. Em seguida, foi avaliada a influência das condições de reticulação na citotoxicidade dos biomateriais. Em ambos os casos, as concentrações de cloreto de estrôncio utilizadas foram inferiores ao limite de solubilidade do sal em água a 20 °C, de aproximadamente 3,4 mol/L (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR), 2004). Os resultados obtidos são descritos a seguir.

5.5.1 Efeito nas propriedades mecânicas

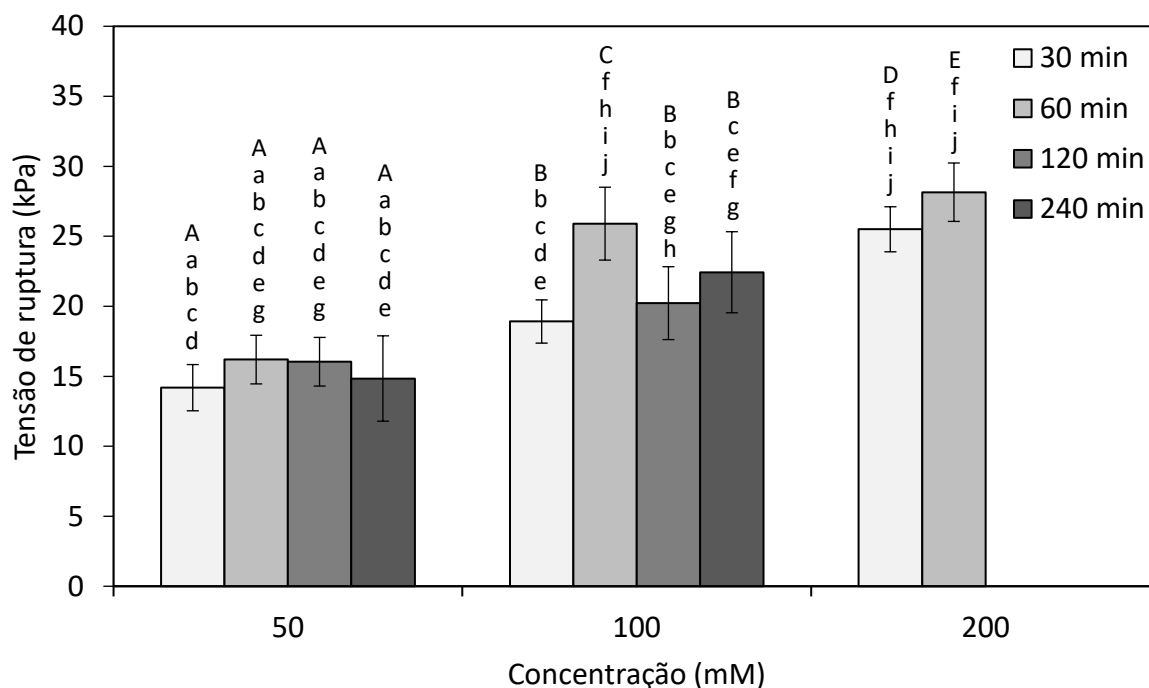
Para a análise deste efeito, os corpos de prova reticulados com soluções de diferentes concentrações de SrCl_2 , todas contendo 0,2 mol/L de NaCl, por diferentes períodos, foram comprimidos até 70% de deformação e mediu-se a força necessária para causar essa deformação, visando simular eventos de compressão articular. A solução reticulante na concentração de 200 mmol/L de SrCl_2 com 0,2 mol/L de NaCl não foi testada nos tempos mais longos por acreditar-se que as células não se manteriam viáveis se expostas por tempos tão longos em altas concentrações da solução reticulante.

Na Figura 31 encontram-se as tensões de ruptura médias obtidas para os materiais produzidos nas três concentrações de solução reticulante de estrôncio utilizadas em cada período de reticulação. Observa-se uma leve tendência de aumento da tensão de ruptura com o aumento da concentração da solução reticulante.

Nota-se que para as concentrações de 50 e 100 mmol/L de estrôncio não se tem um comportamento bem definido para a tensão de ruptura. Para o grupo de 50 mmol/L não houve nenhum resultado significativamente diferente com a variação do tempo de reticulação e as tensões variaram em torno de 15 kPa. Já para a concentração de 100 mmol/L obteve-se uma maior tensão de ruptura com

60 minutos de reticulação, de 26 ± 3 kPa, no entanto este resultado é significativamente igual ao obtido para 240 minutos de 22 ± 3 kPa.

Figura 31 – Tensões de ruptura observadas para a formulação A-HF_{1,0}X_{2,5} em função do tempo e concentração de reticulação.

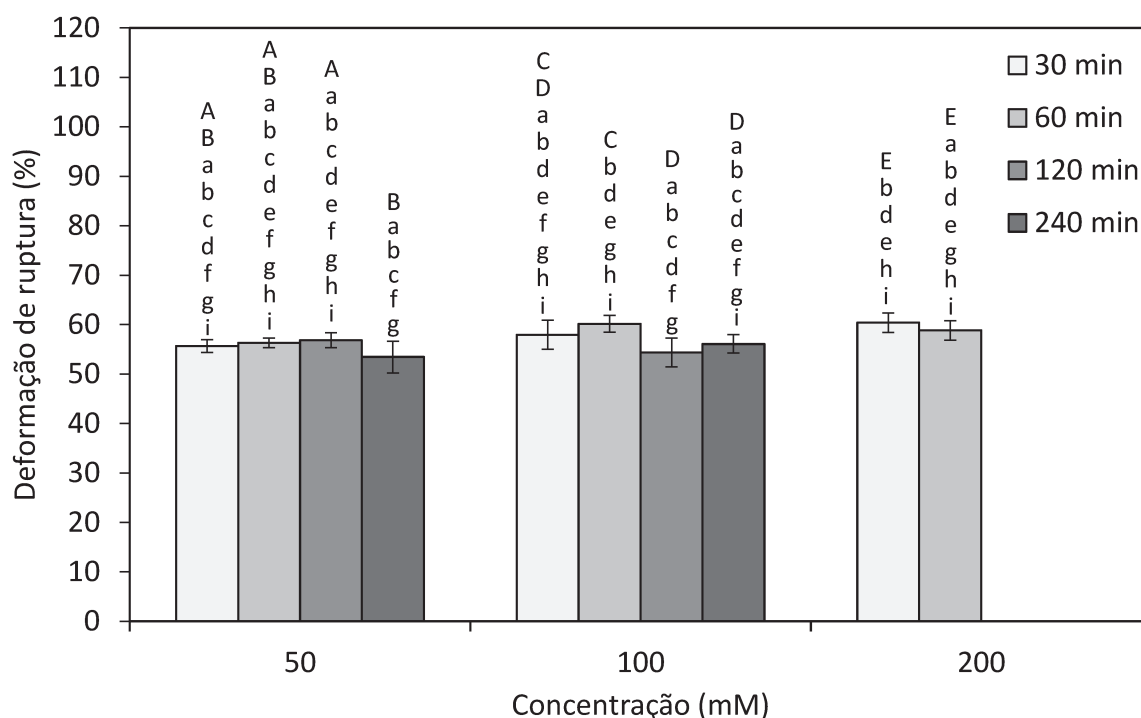


* Letras iguais maiúsculas representam resultados estatisticamente equivalentes, dentro do mesmo grupo de concentração. Letras iguais minúsculas representam resultados estatisticamente equivalentes para a composição geral.

A solução reticulante de 200 mmol/L de estrôncio foi a única que apresentou uma tendência definida, com valores estatisticamente diferentes de 25 ± 2 kPa e 28 ± 2 kPa para os tempos de reticulação de 30 e 60 minutos, respectivamente. Este resultado indica que ao aumentar o tempo de reticulação, esta é mais efetiva e contribui para que o material suporte uma carga ligeiramente maior antes da ruptura.

Os valores médios obtidos de deformação na ruptura são mostrados na Figura 32. Neste caso, não se observa uma tendência bem definida para nenhuma das concentrações de solução reticulante utilizadas, independentemente do tempo de reticulação, evidenciada pelo fato de que não há diferença significativa entre os valores médios encontrados dentro de cada um dos grupos de concentração analisados. De forma geral, a deformação na ruptura ficou entre 51 e 63%.

Figura 32 – Deformações de ruptura observadas para a formulação A-HF_{1,0}X_{2,5} em função do tempo e concentração de reticulação.



* Letras iguais maiúsculas representam resultados estatisticamente equivalentes, dentro do mesmo grupo de concentração. Letras iguais minúsculas representam resultados estatisticamente equivalentes para a composição geral.

Devido à dificuldade de reprodutibilidade dos resultados de tensão e deformação de ruptura, Smidsrød, Haug e Lian (1972) consideraram que estes parâmetros não eram adequados para avaliar a resistência mecânica de géis de alginato reticulados com solução aquosa de CaCl₂ a 0,34 mol/L (SMIDSRØD; HAUG e LIAN, 1972). Estes mesmos autores propuseram a caracterização mecânica do material através do cálculo do módulo de elasticidade na região inicial do gráfico de tensão versus deformação, que seria a região em que o material ainda se comporta elasticamente. Este parâmetro é adequado para correlacionar as propriedades mecânicas de diferentes géis. No entanto, não descreve completamente seu comportamento mecânico, por se tratar de um material viscoelástico (SMIDSRØD; HAUG e LIAN, 1972).

Estes mesmos autores definiram que o módulo de elasticidade pode ser calculado levando-se em consideração o intervalo de deformação até 10% (SMIDSRØD; HAUG e LIAN, 1972). Outros estudos também reportaram o cálculo do

módulo de elasticidade na região linear do início da curva de tensão em função da deformação, mas diferentes intervalos de deformação foram considerados, segundo critério dos próprios autores para a seleção da região linear, conforme pode-se observar na Tabela 15.

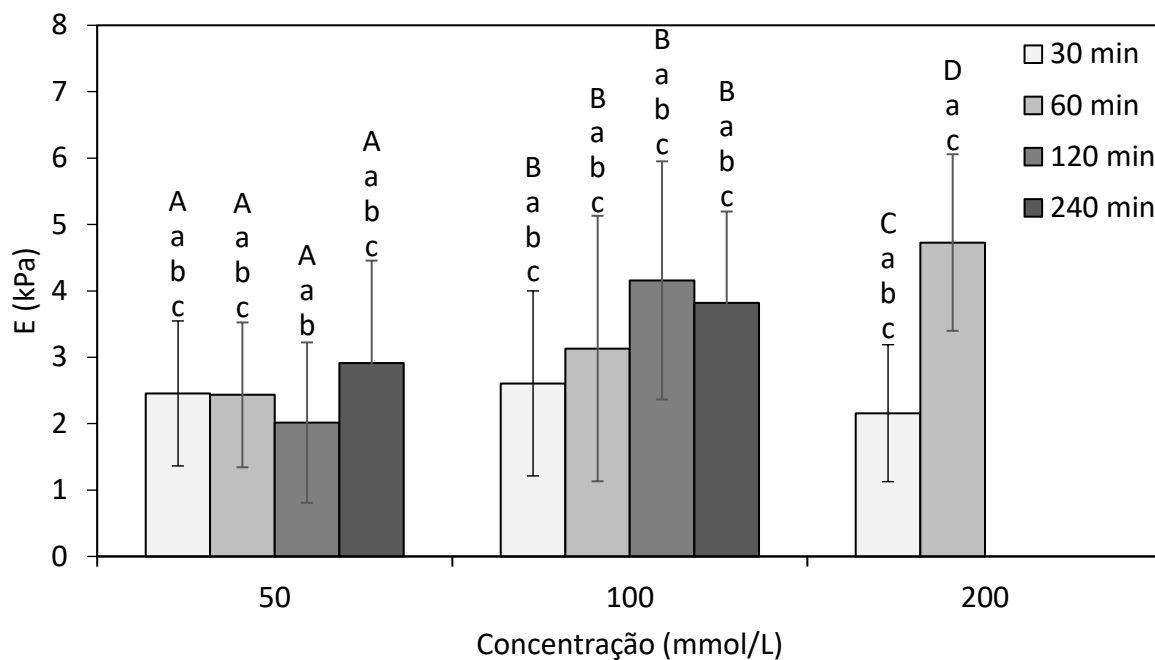
Tabela 15 – Intervalos de deformação utilizados por diferentes autores para o cálculo do módulo de elasticidade.

Intervalo de deformação considerado para o cálculo do módulo de elasticidade	Referência
15 a 30%	LEE; ZHANG; RYU, 2018
Menor que 5%	NORMAND et al., 2000
Menor que 10%	SMIDSRØD; HAUG; LIAN, 1972
Menor que 13%	ASTM INTERNATIONAL, 2016
Não especificado	AARSTAD et al., 2017

Dado que diferentes valores são encontrados dependendo do intervalo estabelecido para o cálculo do módulo de elasticidade, comparações diretas entre módulos calculados de diferentes maneiras devem ser feitas com cautela. Por esta razão, no presente trabalho foram utilizadas duas abordagens diferentes para o cálculo do módulo de elasticidade: considerando o intervalo de deformação até 10%, de acordo com o procedimento empregado por Smidsrød e colaboradores (1972) (SMIDSRØD; HAUG e LIAN, 1972) e avaliando o trecho linear até 13% de deformação, conforme especificado na norma ASTM D1621 (ASTM INTERNATIONAL, 2016). Os valores obtidos para os módulos de elasticidade calculados utilizando estas duas abordagens estão indicados na Figura 33 e na Figura 34.

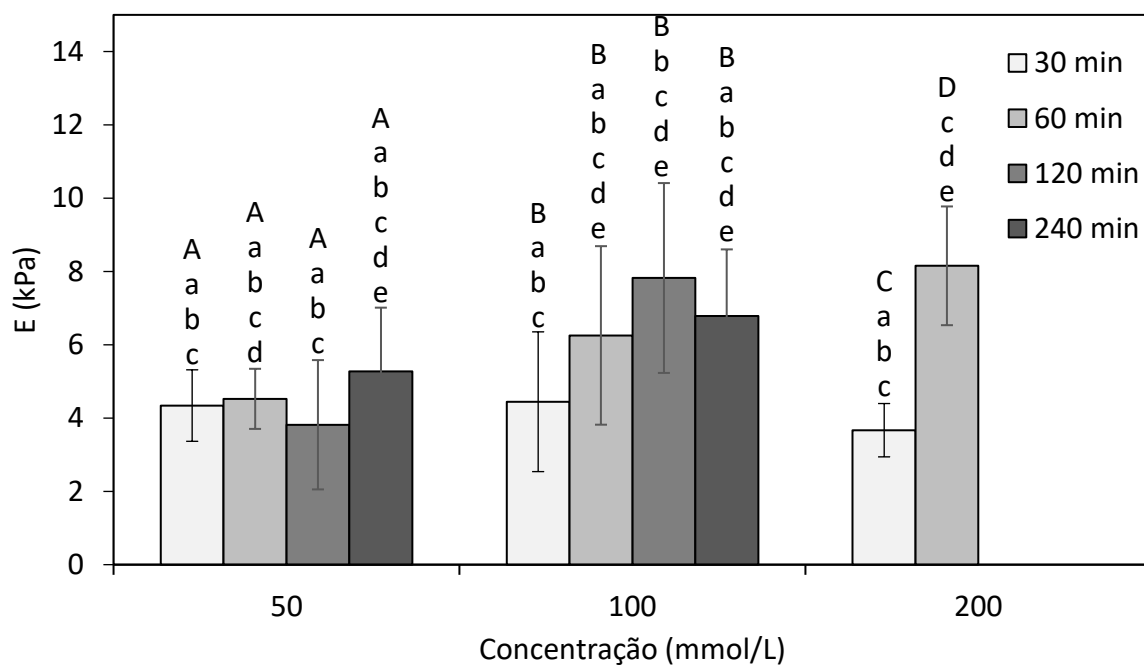
Ao comparar os resultados obtidos por cada método, nota-se que a tendência geral de comportamento se manteve, porém para o método especificado na ASTM D1621, os valores foram maiores e o desvio padrão de cada medida foi menor. Observa-se que os desvios padrões representam de 28 a 64% e de 18 a 46% dos valores dos módulos de elasticidade médios calculados com 10% de deformação e com a ASTM D1621, respectivamente. Assim, optou-se por fazer a análise dos dados obtidos através do método da ASTM D1621.

Figura 33 – Módulos de elasticidade da formulação A-HF_{1,0}X_{2,5} calculados empregando dados até 10% de deformação.



* Letras iguais maiúsculas representam resultados estatisticamente equivalentes, dentro do mesmo grupo de concentração. Letras iguais minúsculas representam resultados estatisticamente equivalentes para a composição geral.

Figura 34 – Módulos de elasticidade da formulação A-HF_{1,0}X_{2,5} calculados empregando dados até 13% de deformação.



* Letras iguais maiúsculas representam resultados estatisticamente equivalentes, dentro do mesmo grupo de concentração. Letras iguais minúsculas representam resultados estatisticamente equivalentes para a composição geral.

Os desvios padrão obtidos para os módulos de elasticidade foram altos, evidenciando a falta de reprodutibilidade dos ensaios mecânicos. No entanto, Kaklamani e colaboradores (2014) também reportaram altos desvios para a reticulação com estrôncio, entre 10 e 30% do valor médio do módulo de elasticidade, utilizando soluções reticulantes de maior concentração (1 e 2 mol/L) por até uma hora. Os autores atribuíram os altos desvios encontrados à heterogeneidade do material, que foi maior quando reticulado com estrôncio do que com cálcio (KAKLAMANI *et al.*, 2014).

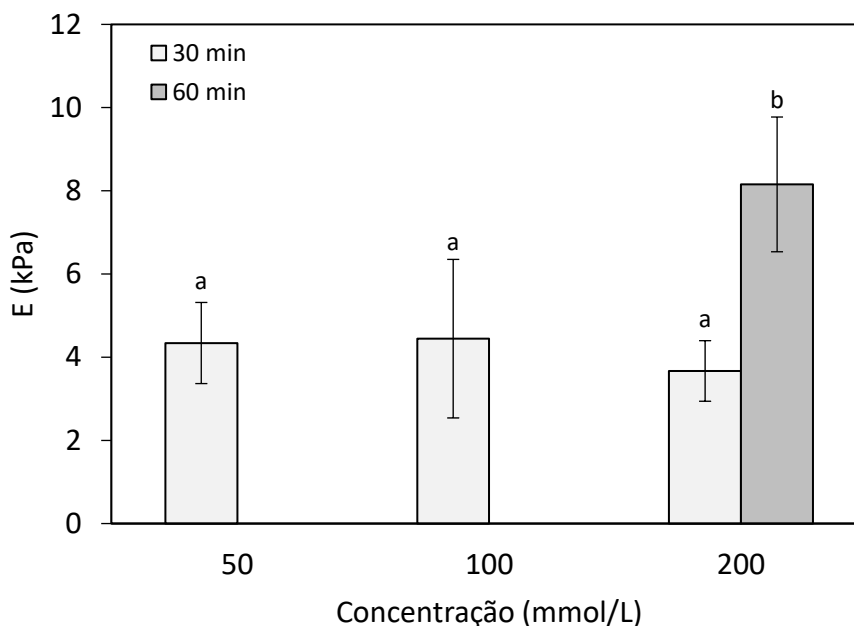
Mørch e colaboradores (2006) também realizaram ensaios mecânicos empregando géis reticulados externamente com cálcio e estrôncio, na concentração de 50 mmol/L de íon reticulante e 0,2 mol/L de NaCl por 72 h e reportaram alta heterogeneidade do material, que apresentava o interior menos resistente, tornando a medida das propriedades mecânicas difíceis e pouco reprodutíveis (MØRCH *et al.*, 2006).

Assim, concluiu-se que os altos desvios encontrados estão compatíveis com o que se reporta na literatura e que isso ocorre devido à heterogeneidade e reticulação incompleta do material.

Apesar dos altos desvios, algumas informações ainda puderam ser obtidas destes ensaios mecânicos. Ao analisar o conjunto de dados da concentração de 50 mmol/L, concluiu-se que o módulo de elasticidade calculado não apresentava diferença estatística com o aumento do tempo. Assim, dentre os tempos avaliados seria mais adequado utilizar o tempo de 30 minutos, pois encurta o processo e, no caso da utilização como biotinta, expõe as células a condições não ideais para cultivo por um período menor.

Dos módulos determinados para a solução reticulante de 100 mmol/L pôde-se afirmar o mesmo que para a solução de 50 mmol/L. Então, como para a solução reticulante de 200 mmol/L os resultados obtidos nos tempos analisados foram estatisticamente diferentes, fez-se a comparação do módulo de elasticidade obtido após 30 minutos de reticulação nas soluções de 50, 100 e 200 mmol/L com o obtido após 60 minutos com a solução 200 mmol/L. O resultado alcançado encontra-se na Figura 35.

Figura 35 – Módulos de elasticidade mais adequados determinados para cada concentração testada.



*Letras iguais representam resultados estatisticamente equivalentes.

Assim, a condição de reticulação que fornece o material com maior módulo de elasticidade é a solução 200 mmol/L durante 1 h. Caso o período de 1 h não seja apropriado para a reticulação por comprometer a viabilidade celular, a segunda melhor condição seria a exposição à solução 50 mmol/L por 30 minutos, pois, como não houve diferença significativa entre os módulos obtidos com a reticulação com soluções mais concentradas, a utilização da menor concentração seria mais amena para as células incorporadas na biotinta.

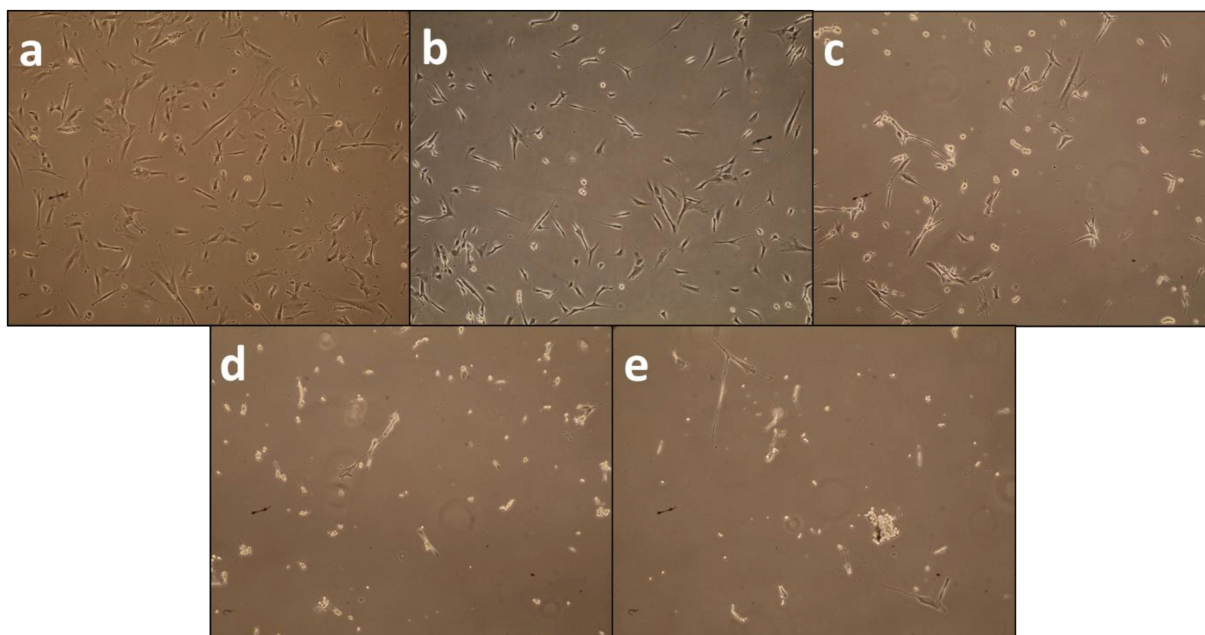
Para avaliar se hidrogéis contendo células poderiam ser reticulados nas condições estudadas nos ensaios mecânicos, foram feitos ensaios de citotoxicidade da solução reticulante, cujos resultados encontram-se na próxima seção.

5.5.2 Análise da citotoxicidade da solução reticulante

Inicialmente foram feitas as análises de viabilidade celular para o tempo de reticulação de 1 h, com todas as soluções reticulantes de 50, 100 e 200 mmol/L com 0,2 mol/L de NaCl. Também foram avaliados dois controles durante 1 h, um das células que permaneceram em contato com o meio de cultura e outro das que foram expostas à solução de 0,2 mol/L de NaCl, na ausência de SrCl_2 . Foi feita uma

avaliação qualitativa com base na análise visual do aspecto das células antes e depois da exposição a cada solução reticulante e aos controles, mostrada na Figura 36.

Figura 36 – Morfologia celular antes (a) e depois de 1 h em: 0,2 mol/L NaCl (b); 50 mmol/L SrCl_2 (c); 100 mmol/L SrCl_2 (d) e 200 mmol/L SrCl_2 (e), todas as condições contendo SrCl_2 também continham 0,2 mol/L de NaCl.



Comparando a morfologia das células antes da realização do ensaio (Figura 36a) com a do controle em 0,2 mol/L de NaCl (Figura 36b), verificam-se células destacadas, mas em sua maioria, estas mantiveram-se aderidas e espreiadas. Ao avaliar a morfologia após a exposição às soluções reticulantes, nota-se que a quantidade de células destacadas do suporte de poliestireno é maior na solução contendo 50 mmol/L de SrCl_2 (Figura 36b) e ainda observaram-se algumas células aderidas, porém menos espreiadas. Por sua vez, as células que permaneceram em contato com as soluções reticulantes nas concentrações de 100 (Figura 36c) e 200 mmol/L (Figura 36d) por uma hora destacaram-se totalmente do suporte e alguns aglomerados se formaram. Como as células utilizadas são aderentes, o destacamento do frasco de cultivo é um indicativo de citotoxicidade, pois estas células só aderem e se proliferam se viáveis (LÉO *et al.*, 2008).

A ISO 10993-5:2009 estabelece graus de citotoxicidade qualitativos, de 0 a 4, sendo o 0 e o 4 equivalentes a não citotóxico e severamente citotóxico, respectivamente, como especificado na Tabela 16 (ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009). Por esse critério, e avaliando-se apenas a morfologia, a solução de NaCl 0,2 mol/L corresponde ao grau 1, a de SrCl₂ 50 mmol/L com 0,2 mol/L de NaCl corresponde ao grau 3 e as soluções reticulantes com 100 e 200 mmol/L de estrôncio, ao grau 4.

Tabela 16 – Critérios para avaliação qualitativa da citotoxicidade de extratos com base na morfologia celular, de acordo com a ISO 10993-5:2009.

Grau	Reatividade	Condições da cultura
0	Nenhum	Grânulos intracitoplasmáticos discretos, sem lise celular e sem redução de crescimento celular.
1	Leve	Não mais que 20% de células esféricas, fracamente aderidas e sem grânulos intracitoplasmáticos, ou evidenciando mudanças morfológicas; ocasional lise celular; leve redução de crescimento celular observável.
2	Razoável	Não mais que 50% de células esféricas, sem grânulos intracitoplasmáticos, sem extensa lise celular; não mais que 50% de inibição do crescimento celular observável.
3	Moderado	Não mais que 70% de células esféricas ou lisadas; camadas celulares não estão completamente destruídas, mas com mais que 50% de inibição do crescimento celular observável.
4	Severo	Quase completa ou completa destruição das camadas celulares.

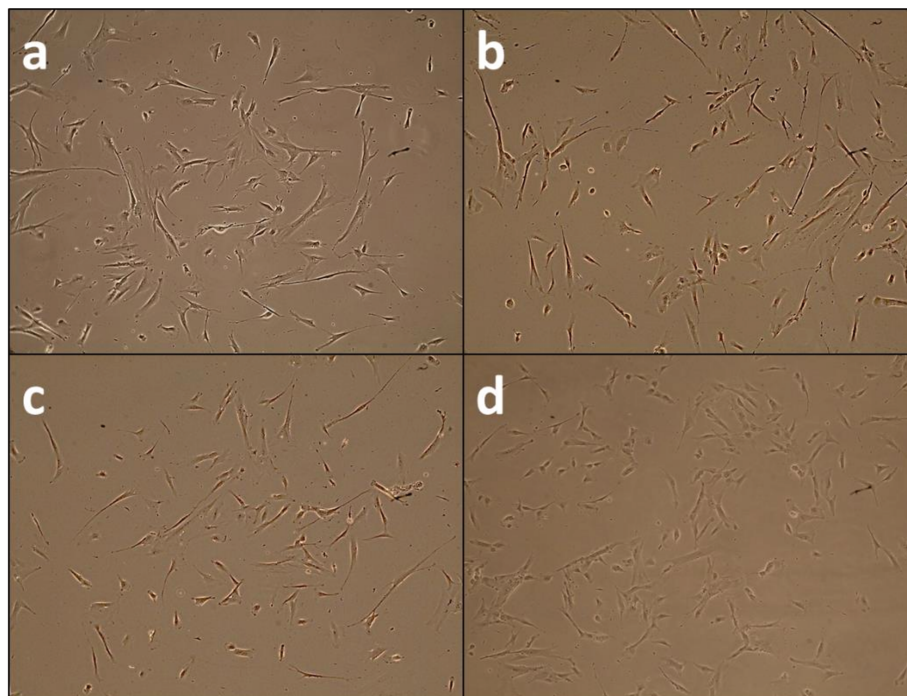
Fonte: Traduzida de ISO - International Organization for Standardization, 2009.

Ademais, a norma considera que graus superiores a 2 configuram soluções citotóxicas. Assim, todas as soluções reticulantes foram consideradas citotóxicas. Por esse motivo, optou-se por avaliar a citotoxicidade de uma solução reticulante contendo 50 mmol/L de SrCl₂ durante 30 minutos, pois esta seria a melhor alternativa para este menor tempo de acordo com os ensaios mecânicos. Porém, adicionalmente, objetivando afetar menos as células, optou-se por reduzir a osmolalidade da solução, não se adicionando o NaCl, já que sua função era de produzir géis mais homogêneos, que não foram obtidos de acordo com os testes mecânicos. Além disso, testou-se também a citotoxicidade da condição de reticulação com 50 mmol/L de SrCl₂ por 10 minutos, conforme reportado por

diversos estudos que utilizam alginato na composição de suas biotintas (CHUNG *et al.*, 2013; KUNDU *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2017; MARKSTEDT *et al.*, 2015).

A morfologia das células neste ensaio antes e depois da exposição à solução reticulante é mostrada na Figura 37.

Figura 37 – Morfologia celular antes (a) e depois de 30 minutos na presença de 50 mmol/L SrCl_2 (b), α -MEM (c) e 10 minutos na presença de 50 mmol/L SrCl_2 (d).



Comparando-se a imagem das células que permaneceram em contato com a solução reticulante durante 10 e 30 minutos (Figura 37d e b, respectivamente) com as dos ensaios controle antes e depois desse período (Figura 37a e c), nota-se que não houve diferença significativa entre elas, uma vez que as células mantiveram sua morfologia e continuaram aderidas e espreiadas. Assim, as condições de reticulação com a solução de SrCl_2 50 mmol/L durante 10 e 30 minutos puderam ser consideradas como grau 0 na escala mencionada anteriormente e, portanto, não são consideradas como citotóxicas.

Além da análise com relação ao aspecto, também foi feita a contagem celular de cada condição, quando possível. No caso das soluções reticulantes de 100 e 200 mmol/L de SrCl_2 com 0,2 mol/L de NaCl, não foi feita esta análise, pois ao se adicionar PBS para lavar o frasco de cultivo e transferir o material em análise

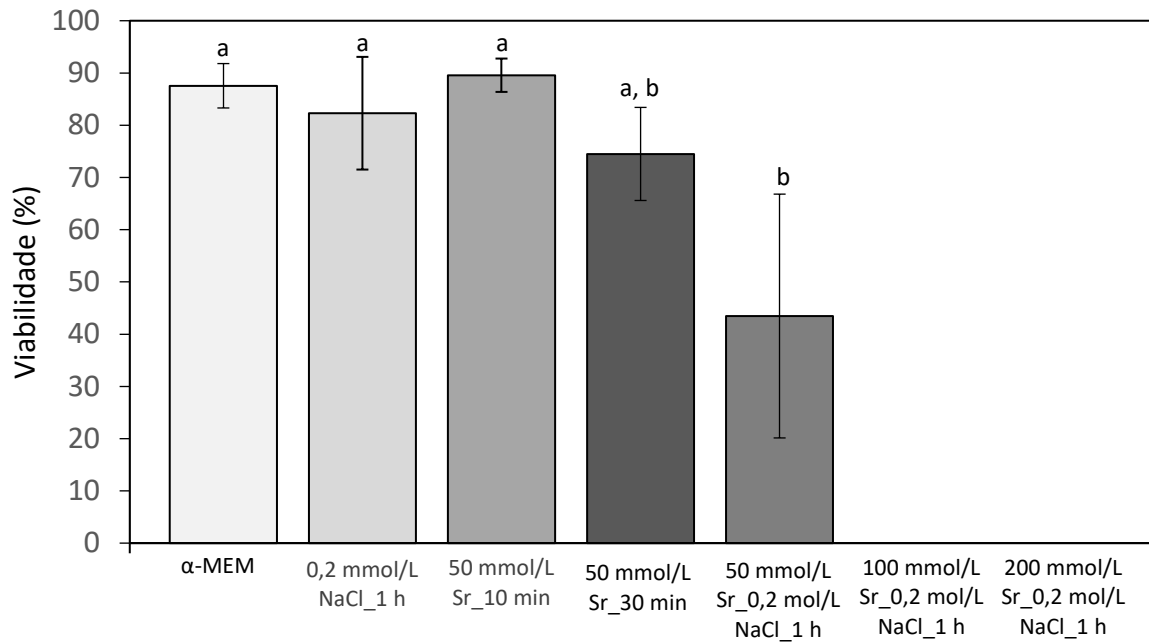
para um tubo falcon, notou-se a turbidez da suspensão e, após a centrifugação, houve a formação de um precipitado. Acredita-se que isso ocorreu devido à morte e lise das células, cujos debris ligaram-se aos eletrólitos presentes na solução, causando a formação dos precipitados detectados (VAN ALSTINE; JAGSCHIES e ŁACKI, 2017).

A alta osmolalidade da solução pode ter causado a morte celular por apoptose ou mesmo por necrose (PELLEGRINI; PINTO e CASTILHO, 2008). A osmolalidade pode ser aproximada à concentração de eletrólitos dissolvidos (SHEN; LY e HOANG, 2012). No caso das soluções reticulantes contendo NaCl, seriam de aproximadamente 550, 700 e 1000 mOsm/kg para as concentrações de 50, 100 e 200 mmol/L de SrCl_2 respectivamente. Esses valores são muito superiores à faixa recomendada de osmolalidade para o cultivo de células de mamíferos, que varia entre 260 a 320 mOsm/kg (LÉO *et al.*, 2008).

A precipitação não ocorreu para as células em solução reticulante a 50 mmol/L de estrôncio contendo ou não NaCl (150 ou 550 mOsm/kg, respectivamente). Assim, as células vivas e mortas expostas a estas soluções e ao meio de cultivo α -MEM, foram contadas e a viabilidade para cada grupo foi calculada com base nas células totais de cada um deles, cujo resultado encontra-se na Figura 38. O resultado da contagem total de células está indicado na Figura 39.

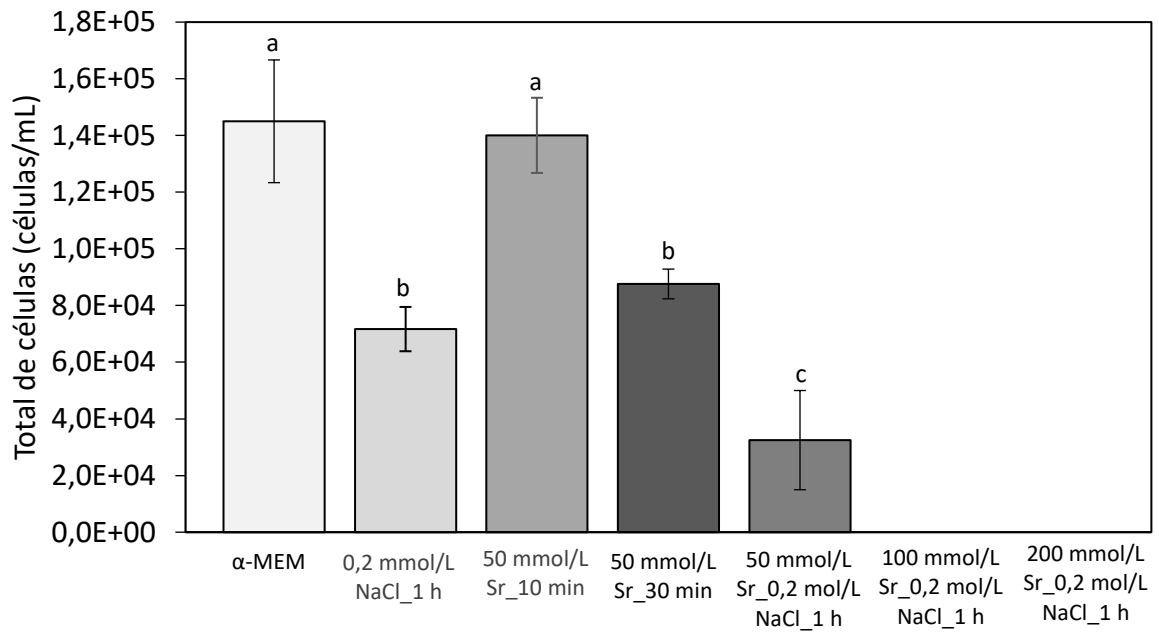
Nota-se que para a solução reticulante SrCl_2 50 mmol/L com NaCl 0,2 mol/L a viabilidade calculada foi baixa, com um alto desvio padrão, além do baixo número total de células, que reduziu em cerca de 77%. Já para o controle em NaCl 0,2 mol/L e para as soluções reticulantes de SrCl_2 50 mmol/L sem NaCl durante 10 e 30 minutos, a viabilidade foi semelhante e estatisticamente equivalente à das células mantidas em α -MEM. No entanto, a quantidade total de células para a condição de reticulação utilizando 50 mmol/L de SrCl_2 por 30 minutos diminuiu significativamente. Isso pode ter ocorrido devido à baixa osmolalidade da solução. Outras análises seriam necessárias para afirmar-se o motivo desta diferença, que pode estar associada a algum outro fator que não foi considerado nesta análise, como o próprio fato de manter as células em condições não ideais, como a ausência do meio de cultivo, o que é evidenciado pela manutenção da viabilidade e da quantidade de células ao expô-las ao período mais curto de 10 minutos.

Figura 38 – Viabilidade celular de cada condição analisada.



*Letras iguais representam resultados estatisticamente equivalentes.

Figura 39 – Total de células de cada condição analisada.



*Letras iguais representam resultados estatisticamente equivalentes.

Ademais, ainda segundo a ISO 10993-5:2009, o resultado obtido para a análise quantitativa e qualitativa da exposição das células à solução reticulante de SrCl_2 a 50 mmol/L durante 30 minutos, de 75% e grau 0, respectivamente, indicou que a solução não foi citotóxica, pois a redução de viabilidade foi menor que 30%. No entanto, o número total de células diminuiu, uma vez que a contagem foi dificultada pelo destacamento das células. Além disso, as células mortas podem ter sofrido autólise, e assim, não foram contabilizadas (LÉO *et al.*, 2008).

Assim, acredita-se que a condição de reticulação com a solução de SrCl_2 sem NaCl durante 30 minutos poderia ser aplicada, no caso da utilização do gel como biotinta, sem comprometer de forma significativa a viabilidade celular. Ademais, de acordo com a literatura, fibroblastos encapsulados em gel de alginato mantêm-se viáveis por pelo menos 24 h após a reticulação com soluções contendo Ca^{2+} em concentrações mais elevadas que as estudadas neste trabalho (1, 2 ou 5 mol/L) (KAKLAMANI *et al.*, 2014).

No entanto, caso a reticulação durante 30 minutos comprometa a viabilidade celular, pode-se ainda, reticular o material durante 10 minutos, uma vez que essa condição não se mostrou tóxica, com a viabilidade de 90% e grau 0, e as células mantiveram quantidade e morfologia semelhantes ao controle em meio de cultivo.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho teve por meta a obtenção de hidrogéis polissacarídicos esterilizáveis, cujas propriedades reológicas fossem adequadas para bioimpressão 3D, além de avaliar as consequências da etapa de reticulação nos ensaios de propriedades mecânicas e de citotoxicidade do biomaterial produzido.

Pôde-se concluir que foi possível produzir um hidrogel a base de alginato e xantana, nas concentrações de 1 e 2,5% (m/v), respectivamente, esterilizável por calor úmido, com redução mínima das características reológicas, e passível de impressão sem escoamento significativo da estrutura depositada. Ademais, a melhor condição estudada para a reticulação do material, segundo a avaliação das propriedades mecânicas do hidrogel reticulado e da citotoxicidade da solução reticulante, foi a de exposição por 30 minutos em uma solução 50 mmol/L de cloreto de estrôncio.

As principais conclusões alcançadas em cada etapa do trabalho são sumarizadas abaixo:

- a. A esterilização de uma solução aquosa de alginato a 1% (m/v) por calor úmido resulta em redução de viscosidade de cerca de 55%;
- b. A esterilização por calor úmido das soluções poliméricas concentradas consiste de um processo simples e mais próximo de uma esterilização terminal, levando a menor redução da viscosidade;
- c. Não foi possível dispersar a suspensão de CMF de forma eficiente nas soluções poliméricas utilizadas para produzir hidrogéis homogêneos;
- d. As formulações mais promissoras, segundo a análise de estabilidade e reologia, foram: A-SF_{1,0}X_{2,5}, A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca e A-HF_{1,0}X_{2,5};
- e. O aumento da concentração de xantana favoreceu as propriedades reológicas do material;
- f. A pré-reticulação, no caso da formulação A-SF_{1,0}X_{2,0}Ca, intensificou a heterogeneidade do material, impossibilitando seu uso para impressão;
- g. A formulação A-HF_{1,0}X_{2,5} estéril resultou em estruturas impressas suficientemente bem definidas, mas a fidelidade de impressão da mesma formulação não esterilizada foi maior;

- h. A melhor condição de reticulação, com base na análise dos módulos de elasticidade, foi a que envolveu a exposição à solução de SrCl_2 a 200 mmol/L por 1 h, seguida da solução a 50 mmol/L por 30 minutos;
- i. Já pela análise dos ensaios de citotoxicidade, o uso da solução de SrCl_2 50 mmol/L sem NaCl durante 10 ou 30 minutos resultou na condição de reticulação de maior interesse.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho mostrou-se a relevância de materiais contendo alginato e goma xantana para utilização como biotinta, no entanto, estudos adicionais podem ser feitos para melhor avaliar a compatibilidade do material com a aplicação desejada ou, ainda, melhorar as características deste para bioimpressão. Seguem algumas sugestões:

- a. Avaliar a degradação do material ao longo do tempo, bem como sua biocompatibilidade;
- b. Conduzir a modificação do alginato, por exemplo, com funcionalização peptídica, para melhorar a adesão celular na matriz polissacarídica;
- c. Estudar a bioimpressão empregando o hidrogel combinado a células isoladas ou a agregados celulares, e avaliar como o processo de deposição afeta a viabilidade celular;
- d. Conduzir o ensaio de citotoxicidade das condições de reticulação de forma semelhante à que se teria na aplicação, com as células encapsuladas no gel;
- e. Avaliar formas adicionais de esterilização dos componentes da biotinta como, por exemplo, com a utilização de dióxido de carbono supercrítico;
- f. Estudar formas adicionais de estabilizar as cadeias poliméricas tanto na etapa de esterilização; quanto na etapa de extrusão, para que o material seja mais eficiente na recuperação da viscosidade após a aplicação de altas taxas cisalhantes;
- g. Verificar outras abordagens, como a utilização de concentrações mais altas de goma xantana, que poderiam melhorar a capacidade de impressão do material e se estas seriam possíveis pelo aspecto biológico da aplicação;
- h. No caso da bioimpressão de estruturas condrais, avaliar a possibilidade de impressão com diferentes materiais, de forma que se possa ter estruturas semelhantes à nativa, que apresenta quatro zonas distintas, com diferentes propriedades.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARSTAD, O.; HEGGSET, B. E.; PEDERSEN, S. I.; BJØRNØY, H. S.; SYVERUD, K.; STRAND, L. B. Mechanical Properties of Composite Hydrogels of Alginate and Cellulose Nanofibrils. **Polymers**, v. 9, n. 8, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/farmacopeias-virtuais>>.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological profile for Strontium**. Atlanta, GA: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp159.pdf>>.
- ALGER, M. **Polymer Science Dictionary**. 3. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2017.
- ALMEIDA, H. V.; SATHY, B. N.; DUDURYCH, I.; BUCKLEY, C. T.; O'BRIEN, F. J.; KELLY, D. J. Anisotropic Shape-Memory Alginate Scaffolds Functionalized with Either Type I or Type II Collagen for Cartilage Tissue Engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 23, n. 1–2, p. 55–68, 2016.
- ASTM INTERNATIONAL. **ASTM D1621-16 Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Plastics** West Conshohocken ASTM International, , 2016.
- AXPE, E.; OYEN, M. L. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1976, 2016.
- BALAKRISHNAN, B.; BANERJEE, R. Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 8, p. 4453–4474, 2011.
- BAUMGARTNER, S.; PAVLI, M.; KRISTL, J. Effect of calcium ions on the gelling and drug release characteristics of xanthan matrix tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 698–707, 2008.
- BERTRAN, M. S.; DALE, B. E. Determination of cellulose accessibility by differential scanning calorimetry. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 32, n. 3, p. 4241–4253, 1986.
- BHOSALE, A. M.; RICHARDSON, J. B. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. **British Medical Bulletin**, v. 87, n. 1, p. 77–95, 2008.
- BONEN, D. K.; SCHMID, T. M. Elevated extracellular calcium concentrations induce

- type X collagen synthesis in chondrocyte cultures. **The Journal of Cell Biology**, v. 115, n. 4, p. 1171 LP – 1178, 1991.
- BROWN, R. M.; SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 5, p. 149–156, 1996.
- BRUYÈRE, O.; REGINSTER, J. Y.; BELLAMY, N.; CHAPURLAT, R.; RICHELLE, P.; COOPER, C. Clinically meaningful effect of strontium ranelate on symptoms in knee osteoarthritis: A responder analysis. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 53, n. 8, p. 1457–1464, 2014.
- BUCKWALTER, J. A.; MOW, V. C.; RATCLIFFE, A. Restoration of Injured or Degenerated Articular Cartilage. **JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 2, n. 4, 1994.
- CARNALI, J. O. A dispersed anisotropic phase as the origin of the weak-gel properties of aqueous xanthan gum. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 43, n. 5, p. 929–941, 1991.
- CHUNG, J. H. Y.; NAFICY, S.; YUE, Z.; KAPSA, R.; QUIGLEY, A.; MOULTON, S. E.; WALLACE, G. G. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. **Biomaterials Science**, v. 1, n. 7, p. 763–773, 2013.
- CP KELCO. **Product Data Sheet - Xantural 180**, 2017.
- CP KELCO. **Certificate of analysis**, 2019.
- D'AQUINO, R.; PAPACCIO, G.; LAINO, G.; GRAZIANO, A. Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. **Stem Cell Reviews**, v. 4, n. 1, p. 21–26, 2008.
- DÁVILA, J. L.; FREITAS, M. S.; NETO, P. I.; SILVEIRA, Z. C.; SILVA, J. V. L.; D'ÁVILA, M. A. Software to generate 3-D continuous printing paths for the fabrication of tissue engineering scaffolds. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 84, n. 5–8, p. 1671–1677, 2016.
- DÁVILA, J. L.; D'ÁVILA, M. A. Laponite as a rheology modifier of alginate solutions: Physical gelation and aging evolution. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1–8, 2017.
- DÁVILA, J. L.; D'ÁVILA, M. A. Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 101, n. 1, p. 675–686, 2019.

- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
- DONATI, I.; HOLTAN, S.; MØRCH, Y. A.; BORGOGNA, M.; DENTINI, M. New Hypothesis on the Role of Alternating Sequences in Calcium–Alginate Gels. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1031–1040, 2005.
- DONNAN, F. G.; ROSE, R. C. OSMOTIC PRESSURE, MOLECULAR WEIGHT, AND VISCOSITY OF SODIUM ALGINATE. **Canadian Journal of Research**, v. 28b, n. 3, p. 105–113, 1950.
- DRAGET, K. I. Alginates. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Handbook of Hydrocolloids**. 2. ed. [s.l.] Woodhead Publishing, 2009. p. 807–828.
- DRAGET, K. I.; ØSTGAARD, K.; SMIDSRØD, O. Alginate-based solid media for plant tissue culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 79–83, 1989.
- DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, n. 1–2, p. 47–55, 1997.
- DUAN, B.; HOCKADAY, L. A.; KANG, K. H.; BUTCHER, J. T. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101A, n. 5, p. 1255–1264, 2013.
- FERNÁNDEZ FARRÉS, I.; NORTON, I. T. Formation kinetics and rheology of alginate fluid gels produced by in-situ calcium release. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 76–84, 2014.
- FOX, A. J. S.; BEDI, A.; RODEO, S. A. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. **Sports Health**, v. 1, n. 6, p. 461–468, 2009.
- FREEMAN, F. E.; KELLY, D. J. Tuning Alginate Bioink Stiffness and Composition for Controlled Growth Factor Delivery and to Spatially Direct MSC Fate within Bioprinted Tissues. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 17042, 2017.
- GALANTE, R.; PINTO, T. J. A.; COLAÇO, R.; SERRO, A. P. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 6, p. 2472–2492, 2018.

- GAO, T.; GILLISPIE, G. J.; COPUS, J. S.; PR, A. K.; SEOL, Y.-J.; ATALA, A.; YOO, J. J.; LEE, S. J. Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. **Biofabrication**, v. 10, n. 3, p. 34106, 2018.
- GJÖNNES, J.; NORMAN, N.; VIERVOLL, H. The State of Order in Cellulose as Revealed from X-Ray Diffractograms. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 12, p. 489–494, 1958.
- GÓMEZ-DÍAZ, D.; NAVAZA, J. M. Rheology of aqueous solutions of food additives: Effect of concentration, temperature and blending. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 4, p. 387–392, 2003.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.
- GORIN, P. A. J.; SPENCER, J. F. T. EXOCELLULAR ALGINIC ACID FROM AZOTOBACTER VINELANDII. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 44, p. 993–998, 1966.
- GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973.
- GROLL, J.; BOLAND, T.; BLUNK, T.; BURDICK, J. A.; CHO, D.-W.; DALTON, P. D.; DERBY, B.; FORGACS, G.; LI, Q.; MIRONOV, V. A.; MORONI, L.; NAKAMURA, M.; SHU, W.; TAKEUCHI, S.; VOZZI, G.; WOODFIELD, T. B. F.; XU, T.; YOO, J. J.; MALDA, J. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. **Biofabrication**, v. 8, n. 1, p. 13001, 2016.
- GROLL, J.; BURDICK, J. A.; CHO, D.-W.; DERBY, B.; GELINSKY, M.; HEILSHORN, S. C.; JÜNGST, T.; MALDA, J.; MIRONOV, V. A.; NAKAYAMA, K.; OVSIANIKOV, A.; SUN, W.; TAKEUCHI, S.; YOO, J. J.; WOODFIELD, T. B. F. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, v. 11, n. 1, p. 13001, 2018.
- GUNGOR-OZKERIM, P. S.; INCI, I.; ZHANG, Y. S.; KHADEMHOSEINI, A.; DOKMECI, M. R. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 5, p. 915–946, 2018.

- HAN, G.; WANG, G.; ZHU, X.; SHAO, H.; LIU, F.; YANG, P.; YING, Y.; WANG, F.; LING, P. Preparation of xanthan gum injection and its protective effect on articular cartilage in the development of osteoarthritis. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1837–1842, 2012.
- HAQ, I.; MURPHY, E.; DACRE, J. Osteoarthritis. **Postgraduate medical journal**, v. 79, n. 933, p. 377–383, 2003.
- HARDY, C. J.; FINDLAY, C. M. **Sterile gel compositions for wound treatment** United States, 1997.
- HAUG, A.; SMIDSRØD, O. Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 24, p. 843–854, 1970.
- HE, Y.; YANG, F.; ZHAO, H.; GAO, Q.; XIA, B.; FU, J. Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. **Scientific Reports**, v. 6, p. 29977, 2016.
- HENROTIN, Y.; LABASSE, A.; ZHENG, S. X.; GALAIS, P.; TSOUDEROS, Y.; CRIELAARD, J. M.; REGINSTER, J. Y. Strontium ranelate increases cartilage matrix formation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 2, p. 299–308, 2001.
- HOSPODIUK, M.; DEY, M.; SOSNOSKI, D.; OZBOLAT, I. T. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 2, p. 217–239, 2017.
- HSUEH, M.-F.; ONNERFJORD, P.; BOLOGNESI, M. P.; EASLEY, M. E.; KRAUS, V. B. Differential cartilage turnover along the human lower limb revealed by protein deamidation. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 26, p. S32, 2018.
- HUBBE, M. A.; ROJAS, O. J. Colloidal stability and aggregation of lignocellulosic materials in aqueous suspension: A review. **BioResources**, v. 3, n. 4, p. 1419–1491, 2008.
- HUNTER, D. J.; FELSON, D. T. Osteoarthritis. **BMJ : British Medical Journal**, v. 332, n. 7542, p. 639–642, 2006.
- HUNZIKER, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 10, n. 6, p. 432–463, 2002.
- HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529–2543, 2000.

- HUTMACHER, D. W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 12, n. 1, p. 107–124, 2001.
- INFORÇATTI NETO, P. **Adaptação e construção de uma máquina para prototipagem rápida de projeto aberto para fins de pesquisa**. [s.l.] Faculdade Independente do Nordeste, 2007.
- INGAR DRAGET, K.; ØSTGAARD, K.; SMIDSRØD, O. Homogeneous alginate gels: A technical approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 14, n. 2, p. 159–178, 1990.
- ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **BS EN ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices. Tests for in vitro cytotoxicitye**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://bsol.bsigroup.com/Bibliographic/BibliographicInfoData/000000000030160958>>.
- ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **BS EN ISO/ASTM 52900:2017 Additive manufacturing. General principles. Terminology**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://bsol.bsigroup.com/Bibliographic/BibliographicInfoData/000000000030343265>>.
- JANSSON, P.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from xanthomonas campestris. **Carbohydrate Research**, v. 45, n. 1, p. 275–282, 1975.
- JEANES, A.; PITTSLEY, J. E.; SENTI, F. R. Polysaccharide B-1459: A new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 5, n. 17, p. 519–526, 1961.
- JIN, R.; DIJKSTRA, P. J. Hydrogels for Tissue Engineering Applications. In: OTTENBRITE, R. M.; PARK, K.; OKANO, T. (Eds.). **Biomedical Applications of Hydrogels Handbook**. 1. ed. New York, NY: Springer New York, 2010. p. 203–225.
- KAKLAMANI, G.; CHENELER, D.; GROVER, L. M.; ADAMS, M. J.; BOWEN, J. Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 36, p. 135–142, 2014.

- KARPPINEN, A.; SAARINEN, T.; SALMELA, J.; LAUKKANEN, A.; NUOPPONEN, M.; SEPPÄLÄ, J. Flocculation of microfibrillated cellulose in shear flow. **Cellulose**, v. 19, n. 6, p. 1807–1819, 2012.
- KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 81–84, 1998.
- KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTRÖM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.
- KONG, H. J.; KAIGLER, D.; KIM, K.; MOONEY, D. J. Controlling Rigidity and Degradation of Alginate Hydrogels via Molecular Weight Distribution. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1720–1727, 2004.
- KUMAR, A.; RAO, K. M.; HAN, S. S. Development of sodium alginate-xanthan gum based nanocomposite scaffolds reinforced with cellulose nanocrystals and halloysite nanotubes. **Polymer Testing**, v. 63, p. 214–225, 2017.
- KUMAR, A.; RAO, K. M.; HAN, S. S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 128–144, 2018.
- KUNDU, J.; SHIM, J.-H.; JANG, J.; KIM, S.-W.; CHO, D.-W. 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, 2015.
- KUO, C. K.; LI, W.-J.; TUAN, R. S. Chapter II.6.8 - Cartilage and Ligament Tissue Engineering: Biomaterials, Cellular Interactions, and Regenerative Strategies A2 - Ratner, Buddy D. In: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. (Eds.). **Biomaterials Science: An Introduction to Materials**. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 1214–1236.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 1993.
- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1–2, p. 1–22, 2001.
- LEE, D.; ZHANG, H.; RYU, S. Elastic Modulus Measurement of Hydrogels. In: MONDAL, M. I. H. (Ed.). **Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels**. 1. ed.

- Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 1–21.
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.
- LÉO, P.; GALESI, A. L. L.; SUAZO, C. A. T.; MORAES, Â. M. Animal cells: basic concepts. In: CASTILHO, L. R.; MORAES, Â. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. (Eds.). **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2008. p. 13–38.
- LEO, W. J.; MCLOUGHLIN, A. J.; MALONE, D. M. Effects of Sterilization Treatments on Some Properties of Alginate Solutions and Gels. **Biotechnology Progress**, v. 6, n. 1, p. 51–53, 1990.
- LEROUX, M. A.; GUILAK, F.; SETTON, L. A. Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration. **Journal of Biomedical Materials Research Part B**, v. 47, n. 1, p. 46–53, 1999.
- LI, H.; TAN, Y. J.; LEONG, K. F.; LI, L. 3D Bioprinting of Highly Thixotropic Alginate/Methylcellulose Hydrogel with Strong Interface Bonding. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 23, p. 20086–20097, 2017.
- LI, Z.; ZHANG, M. Chitosan–alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 75A, n. 2, p. 485–493, 2005.
- LIANG, X.; WANG, X.; XU, Q.; LU, Y.; ZHANG, Y.; XIA, H.; LU, A.; ZHANG, L. Rubbery Chitosan/Carrageenan Hydrogels Constructed through an Electroneutrality System and Their Potential Application as Cartilage Scaffolds. **Biomacromolecules**, v. 19, p. 340–352, 2018.
- LINKER, A.; JONES, R. S. A Polysaccharide resembling Alginic Acid from a Pseudomonas Micro-organism. **Nature**, v. 204, p. 187–188, 1964.
- LIU, Z.; BHANDARI, B.; PRAKASH, S.; MANTHAL, S.; ZHANG, M. Linking rheology and printability of a multicomponent gel system of carrageenan-xanthan-starch in extrusion based additive manufacturing. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 413–424, 2019.
- LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Viscosimetria. In: **Caracterização de Polímeros - Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. p. 125–149.

- LYNN, A. K.; YANNAS, I. V.; BONFIELD, W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 71B, n. 2, p. 343–354, 2004.
- MAKRIS, E. A.; GOMOLL, A. H.; MALIZOS, K. N.; HU, J. C.; ATHANASIOU, K. A. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 21, 2014.
- MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4, p. 207–233, 2007.
- MALDA, J.; VISSER, J.; MELCHELS, F. P.; JÜNGST, T.; HENNINK, W. E.; DHERT, W. J. A.; GROLL, J.; HUTMACHER, D. W. 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. **Advanced Materials**, v. 25, n. 36, p. 5011–5028, 2013.
- MALVERN INSTRUMENTS. **Understanding Yield Stress**Worcestershire, 2012. Disponível em: <<https://bit.ly/2BVNyvc>>
- MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. Rheological behaviour of aqueous dispersions of algal sodium alginates. **Journal of Food Engineering**, v. 28, n. 3–4, p. 283–295, 1996.
- MARK, K. VON DER; KIRSCH, T.; NERLICH, A.; KUSS, A.; WESELOH, G.; GLÜCKERT, K.; H STÖSS. Type x collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. indication of chondrocyte hypertrophy. **Arthritis & Rheumatism**, v. 35, n. 7, p. 806–811, 1992.
- MARKSTEDT, K.; MANTAS, A.; TOURNIER, I.; MARTÍNEZ ÁVILA, H.; HÄGG, D.; GATENHOLM, P. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 5, p. 1489–1496, 2015.
- MARTINSEN, A.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O.; ZANETTI, F.; PAOLETTI, S. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, n. 2, p. 171–193, 1991.
- MARTINSEN, A.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel

- beads. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, n. 1, p. 79–89, 1989.
- MØRCH, Ý. A.; DONATI, I.; STRAND, B. L.; SKJÅK-BRÆK, G. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on Alginate Microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471–1480, 2006.
- MØRCH, Ý. A.; HOLTAN, S.; DONATI, I.; STRAND, B. L.; SKJÅK-BRÆK, G. Mechanical Properties of C-5 Epimerized Alginates. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 9, p. 2360–2368, 2008.
- MORONI, L.; BOLAND, T.; BURDICK, J. A.; DE MARIA, C.; DERBY, B.; FORGACS, G.; GROLL, J.; LI, Q.; MALDA, J.; MIRONOV, V. A.; MOTA, C.; NAKAMURA, M.; SHU, W.; TAKEUCHI, S.; WOODFIELD, T. B. F.; XU, T.; YOO, J. J.; VOZZI, G. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 384–402, 2018.
- MORRISON, F. A. **Understanding Rheology**. New York: Oxford University Press, 2001.
- MOW, V. C.; KUEI, S. C.; LAI, W. M.; ARMSTRONG, C. G. Biphasic Creep and Stress Relaxation of Articular Cartilage in Compression: Theory and Experiments. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 102, n. 1, p. 73–84, 1980.
- MOW, V. C.; GUO, X. E. Mechano-Electrochemical Properties Of Articular Cartilage: Their Inhomogeneities and Anisotropies. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 175–209, 2002.
- MURPHY, S. V.; ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 773, 2014.
- NORMAND, V.; LOOTENS, D. L.; AMICI, E.; PLUCKNETT, K. P.; AYMARD, P. New Insight into Agarose Gel Mechanical Properties. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 730–738, 2000.
- O'CONNELL, G.; GARCIA, J.; AMIR, J. 3D Bioprinting: New Directions in Articular Cartilage Tissue Engineering. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 3, n. 11, p. 2657–2668, 2017.
- ONSØYEN, E. Alginates. In: IMESON, A. P. (Ed.). **Thickening and Gelling Agents for Food**. Boston, MA: Springer US, 1997. p. 22–44.
- OUYANG, L.; YAO, R.; ZHAO, Y.; SUN, W. Effect of bioink properties on printability

- and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, p. 35020, 2016.
- PÄÄKKÖ, M.; ANKERFORS, M.; KOSONEN, H.; NYKÄNEN, A.; AHOLA, S.; ÖSTERBERG, M.; RUOKOLAINEN, J.; LAINE, J.; LARSSON, P. T.; IKKALA, O.; LINDSTRÖM, T. Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007.
- PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v. 106, n. 1, p. 1–12, 2011.
- PAMIES, R.; SCHMIDT, R. R.; MARTÍNEZ, M. DEL C. L.; TORRE, J. G. DE LA. The influence of mono and divalent cations on dilute and non-dilute aqueous solutions of sodium alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 1, p. 248–253, 2010.
- PARK, J.-H.; YOON, J.-K.; LEE, J. B.; SHIN, Y. M.; LEE, K.-W.; BAE, S.-W.; LEE, J.; YU, J.; JUNG, C.-R.; YOUN, Y.-N.; KIM, H.-Y.; KIM, D.-H. Experimental Tracheal Replacement Using 3-dimensional Bioprinted Artificial Trachea with Autologous Epithelial Cells and Chondrocytes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2103, 2019.
- PAXTON, N.; SMOLAN, W.; BÖCK, T.; MELCHELS, F.; GROLL, J.; JUNGST, T. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. **Biofabrication**, v. 9, n. 4, p. 44107, 2017.
- PEAK, C. W.; STEIN, J.; GOLD, K. A.; GAHARWAR, A. K. Nanoengineered Colloidal Inks for 3D Bioprinting. **Langmuir**, v. 34, n. 3, p. 917–925, 2018.
- PELLEGRINI, M. P.; PINTO, R. C. V.; CASTILHO, L. DOS R. Mechanisms of cell proliferation and cell death in animal cell culture in vitro. In: CASTILHO, L. R.; MORAES, Â. M.; AUGUSTO, E. F. P.; BUTLER, M. (Eds.). **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. 1. ed. New York: Taylor & Francis Group, 2008. p. 147–180.
- PEPPAS, N. A.; HUANG, Y.; TORRES-LUGO, M.; WARD, J. H.; ZHANG, J. Physicochemical Foundations and Structural Design of Hydrogels in Medicine and Biology. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 2, n. 1, p. 9–29,

2000.

- PEPPAS, N. A.; HOFFMAN, A. S. Chapter I.2.5 - Hydrogels. In: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. (Eds.). **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 3. ed. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 166–179.
- PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 23, 2015.
- QIU, Q.-Q.; LEAMY, P.; BRITTINGHAM, J.; POMERLEAU, J.; KABARIA, N.; CONNOR, J. Inactivation of bacterial spores and viruses in biological material using supercritical carbon dioxide with sterilant. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 91B, n. 2, p. 572–578, 2009.
- QIU, Q.-Q.; SUN, W.-Q.; CONNOR, J. Sterilization of Biomaterials of Synthetic and Biological Origin. **Comprehensive Biomaterials**, v. 4, p. 127–144, 2011.
- REGINSTER, J.-Y.; BADURSKI, J.; BELLAMY, N.; BENSEN, W.; CHAPURLAT, R.; CHEVALIER, X.; CHRISTIANSEN, C.; GENANT, H.; NAVARRO, F.; NASONOV, E.; SAMBROOK, P. N.; SPECTOR, T. D.; COOPER, C. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of knee osteoarthritis: results of a double-blind, randomised placebo-controlled trial. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 2, p. 179–186, 2013.
- RINAUDO, M.; GRAEBLING, D. On the viscosity of sodium alginates in the presence of external salt. **Polymer Bulletin**, v. 15, n. 3, p. 253–256, 1986.
- RINAUDO, M.; MILAS, M. Polyelectrolyte behavior of a bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: Comparison with carboxymethylcellulose. **Biopolymers**, v. 17, n. 11, p. 2663–2678, 1978.
- SAMIR, M. A. S. A.; ALLOIN, F.; PAILLET, M.; DUFRESNE, A. Tangling Effect in Fibrillated Cellulose Reinforced Nanocomposites. **Macromolecules**, v. 37, n. 11, p. 4313–4316, 2004.
- SAXENA, I. M.; BROWN JR, R. M. Cellulose biosynthesis: Current views and evolving concepts. **Annals of Botany**, v. 96, n. 1, p. 9–21, 2005.
- SHEN, J.; LY, K.; HOANG, Y. Cell Culture Medium. In: LORING, J. F.; PETERSON,

- S. E. (Eds.). **Human Stem Cell Manual**. 2. ed. London: Academic Press, 2012. p. 53–69.
- SHENOY, A. V. Basic rheological concepts. In: **Rheology of Filled Polymer Systems**. 1. ed. Pune, India: Springer Science+Business Media Dordrech, 1999. p. 54–111.
- SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulose Whiskers versus Microfibrils: Influence of the Nature of the Nanoparticle and its Surface Functionalization on the Thermal and Mechanical Properties of Nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 2, p. 425–432, 2009.
- SKALAK, R.; FOX, C. **NSF Workshop, UCLA Symp. Molecular and Cellular Biology**. New York, NY: 1988
- SKJÅK-BRÆK, G.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 10, n. 1, p. 31–54, 1989.
- SLAUGHTER, B. V.; KHURSHID, S. S.; FISHER, O. Z.; KHADEMHOSEINI, A.; PEPPAS, N. A. Hydrogels in Regenerative Medicine. **Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 21, p. 3307–3329, 2009.
- SMIDSRØD, O. Solution properties of alginate. **Carbohydrate Research**, v. 13, n. 3, p. 359–372, 1970.
- SMIDSRØD, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. **Faraday Discussions of the Chemical Society**, v. 57, p. 263–274, 1974.
- SMIDSRØD, O.; GLOVER, R. M.; WHITTINGTON, S. G. The relative extension of alginates having different chemical composition. **Carbohydrate Research**, v. 27, n. 1, p. 107–118, 1973.
- SMIDSRØD, O.; HAUG, A. A light scattering study of alginate. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 22, p. 797–810, 1968.
- SMIDSRØD, O.; HAUG, A. Properties of Poly(1,4-hexuronates) in the Gel State. II. Comparison of Gels of Different Chemical Composition. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 26, p. 79–88, 1972.
- SMIDSRØD, O.; HAUG, A.; LIAN, B. Properties of Poly(1,4-hexuronates) in the Gel State. I. Evaluation of a Method for the Determination of Stiffness. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 26, p. 71–78, 1972.
- SMIDSRØD, O.; SKJÅK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells.

- Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 71–78, 1990.
- SMITH, I. H.; PACE, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 32, p. 119–129, 1982.
- STOKKE, B. T.; SMIDSRØD, O.; ZANETTI, F.; STRAND, W.; SKJÅK-BRÆK, G. Distribution of uronate residues in alginate chains in relation to alginate gelling properties — 2: Enrichment of β -d-mannuronic acid and depletion of α -l-guluronic acid in sol fraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 21, n. 1, p. 39–46, 1993.
- STRATTON, S.; SHELKE, N. B.; HOSHINO, K.; RUDRAIAH, S.; KUMBAR, S. G. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. **Bioactive Materials**, v. 1, n. 2, p. 93–108, 2016.
- TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 655–663, 2009.
- VAN ALSTINE, J. M.; JAGSCHIES, G.; ŁĄCKI, K. M. Alternative Separation Methods: Flocculation and Precipitation. In: JAGSCHIES, G.; LINDSKOG, E.; ŁĄCKI, K.; GALLIHER, P. (Eds.). **Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 221–239.
- VANDEBOSSCHE, G. M. R.; REMON, J.-P. Influence of the sterilization process on alginate dispersions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, n. 5, p. 484–486, 1993.
- WANG, K. Die swell of complex polymeric systems. In: VICENTE, J. DE (Ed.). **Viscoelasticity – From Theory to Biological Applications**. 1. ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. p. 77–96.
- WANG, L.; NEUMANN, M.; FU, T.; LI, W.; CHENG, X.; SU, B.-L. Porous and responsive hydrogels for cell therapy. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 38, p. 135–157, 2018.
- WATKINS, J.; MATHIESON, I. CHAPTER 4 - Connective tissues BT - The Pocket Podiatry Guide: Functional Anatomy. In: Edinburgh: Churchill Livingstone, 2009. p. 107–156.
- WILLIAMS, D.; THAYER, P.; MARTINEZ, H.; GATENHOLM, E.; KHADEMHOSEINI, A. A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D

- bioprinting. **Bioprinting**, v. 9, p. 19–36, 2018.
- WILSON, S. A.; CROSS, L. M.; PEAK, C. W.; GAHARWAR, A. K. Shear-Thinning and Thermo-Reversible Nanoengineered Inks for 3D Bioprinting. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 50, p. 43449–43458, 2017.
- WITTENAUER, R.; SMITH, L.; ADEN, K. **Priority Medicines for Europe and the World “A Public Health Approach to Innovation” Update on 2004 Background Paper 6.12 Osteoarthritis** World Health Organisation. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/areas/priority_medicines/BP6_12Osteo.pdf>.
- WOODFIELD, T. B. F.; MALDA, J.; DE WIJN, J.; PÉTERS, F.; RIESLE, J.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4149–4161, 2004.
- YANG, X.; LU, Z.; WU, H.; LI, W.; ZHENG, L.; ZHAO, J. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 83, p. 195–201, 2018.