

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Mecânica

INGRI JULIETH MANCILLA CORZO

Reologia e impressão tridimensional de hidrogéis nanocompósitos de Carboximetilcelulose (CMC)/Laponita visando aplicações em engenharia tecidual

CAMPINAS

INGRI JULIETH MANCILLA CORZO

Reologia e impressão tridimensional de hidrogéis nanocompósitos de Carboximetilcelulose (CMC)/Laponita visando aplicações em engenharia tecidual

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestra em Engenharia Mecânica, na Área de Materiais e Processos de Fabricação

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA INGRI JULIETH MANCILLA CORZO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCOS AKIRA d'ÁVILA.

CAMPINAS 2021 Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Corzo, Ingri Julieth Mancilla, 1995-

C819r Reologia e impressão tridimensional de hidrogéis nanocompósitos de carboximetilcelulose (CMC)/Laponita visando aplicações em engenharia tecidual / Ingri Julieth Mancilla Corzo. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Marcos Akira d'Ávila. Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Hidrogeis. 2. Nanocompósitos (materiais). 3. Biopolímeros. 4. Industria 4.0. 5. Scaffolds. 6. Engenharia tecidual. I. Akira d'Ávila, Marcos, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Rheology and 3d printing of carboxymethylcellulose/laponite nanocomposite hydrogels for tissue engineering applications

Palavras-chave em inglês: Hydrogels Nanocomposite (materials) Biopolymers Industry 4.0 Scaffolds Tissue engineering Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação Titulação: Mestra em Engenharia Mecânica Banca examinadora: Marcos Akira d'Ávila [Orientador] Marisa Masumi Beppu Janaina de Andréa Dernowsek Data de defesa: 23-06-2021 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

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

⁻ ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-6181-7290 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/9284261286725626

Dedicatória

A Dios, porque ha sido el motor de mi vida. Por medio de la espiritualidad he logrado conocer el verdadero amor por las cosas, y la importancia de sentir su compañía en los tiempos más difíciles. «Todo se reduce a la última persona en la que piensas en las noches, allí esta tu corazón» GABO.

A mi madre Martha Cecilia Corzo, porque sin su compañía, sin su templanza y sin el ejemplo que nos transmitió desde chicos no hubiese logrado esta meta. Ella fue, es y seguirá siendo el combustible de este carro llamado vida y mi mayor alegría será verla feliz. «El amor de una madre es como la paz. No necesita ser adquirido, no necesita ser merecido» Erich Fromm.

A mi padre Juan de Jesús Mancilla, mis dos hermanos Juan Gabriel y Leidy Tatiana, y Victor por su apoyo incondicional y por el amor que me han brindado durante todo este tiempo estando lejos de casa.

A mi abuela María Gabriela Amado, mis tíos, mis primitos y mis vecinos (Julio y Mery) los cuales como familia y amigos han orado por mí y me han dado las fuerzas y la energía para seguir haciendo lo que amo.

Agradecimentos

Quero expressar minha sincera gratidão às seguintes pessoas e entidades que contribuíram significativamente para a realização deste trabalho:

Ao professor Marcos Akira, por me dar a oportunidade de iniciar este processo em seu grupo de pesquisa, pela gentileza, por ter-me orientado e me motivado.

A minha parceira de laboratório Jéssica Heline Lopes, por ter sido minha guia, e ter-me brindado a correta e desinteressada orientação em cada uma das atividades que desenvolvi, assim como sua constante motivação.

À Professora Maria Helena Andrade e Carla França por me permitirem usar o equipamento Zetasizer e realizar os testes de citotoxicidade no *Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos*.

Aos meus colegas do laboratório João de Deus, Ana Flavia, Rosana e Eronildo pelas sugestões, disponibilidade e ajuda durante o desenvolvimento deste projeto.

A Victor, Tatiana, Wilmer, Pablo, Jessica, Lorena e Maria Paula pelo apoio, motivação e carinho, vitais para melhorar a cada dia.

Aos meus tios Dora, Liseth, Gabriel e Gerardo Corzo, por me dar seu apoio, seu amor e sua energia na viagem e no início deste mestrado.

Aos meus pais (Marta e Jesus), meus irmãos, minha avó e todos os meus tios e primos pelo apoio incondicional e pela oração familiar que me permitiu cumprir esta nova meta.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001".

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo no 2017/23776-5".

"Sejam fortes e corajosos. Não tenham medo nem fiquem apavorados por causa delas, pois o Senhor, o seu Deus, vai com vocês; nunca os deixará, nunca os abandonará".

Deuteronômio 31:6

Resumo

Hidrogéis são materiais capazes de absorver grandes quantidades de água, resultando em sistemas com características únicas que possuem grande aplicabilidade na área biomédica, principalmente como scaffolds na engenharia tecidual. A manufatura aditiva é uma técnica promissora para a obtenção de *scaffolds* com precisão dimensional. A impressão tridimensional de géis e hidrogéis biocompatíveis tem se mostrado promissora nas novas tecnologias de bioimpressão, onde esses materiais são chamados de "tintas". Para que a bioimpressão possa ser viável, estudos sobre as propriedades reológicas relevantes das tintas, bem como a correlação dessas propriedades com os parâmetros de processo e características finais das estruturas impressas são necessários. No entanto, esses estudos ainda são poucos na literatura, mas a sua relevância tem sido reconhecida nos últimos anos. Nesta pesquisa de mestrado, foi estudada a reologia de hidrogéis nanocompósitos de carboximetilcelulose (CMC) e Laponita dispersos em água, visando aplicações em processos de manufatura aditiva baseados em extrusão. Interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre os grupos silanol (Si-O) da Laponita e hidroxila (-OH) do CMC, influenciaram diretamente as propriedades reológicas, estabilidade da dispersão e raio hidrodinâmico. A adição de CMC em dispersões de Laponita resultou num aumento considerável nas propriedades viscoelásticas lineares, bem como a viscosidade e pseudoplasticidade, resultado em géis fracos e fortes dependendo da composição do sistema. Foi também observado que a presença de CMC inibe os efeitos de envelhecimento da Laponita. Posteriormente, foi avaliada a capacidade de impressão do sistema CMC/Laponita, onde foi definida a uma composição de tinta adequada para a impressão por extrusão. Além das propriedades reológicas, testes de capacidade de impressão, formação, fusão e colapso de filamento foram realizados. Após a impressão dos scaffolds, esses foram reticulados em soluções de cloreto de cálcio (CaCl₂) e ácido cítrico, resultando em hidrogéis de rede simples não tóxicos. Os géis de CMC/Laponita mostraram boa capacidade de impressão, características mecânicas e biológicas aptas para aplicações como tintas para bioimpressão.

Palavras-Chave: *Hidrogéis, nanocompósitos (materiais), biopolímeros, indústria 4.0 scaffolds, engenharia tecidual.*

Abstract

Hydrogels are materials capable of absorbing large amounts of water, resulting in systems with unique characteristics that have applicability in the biomedical area, mainly as scaffolds in tissue engineering. Additive manufacturing is a promising technique for obtaining scaffolds with dimensional accuracy. In the field of tissue engineering, three-dimensional printing of biocompatible gels and hydrogels has shown promising results in new bioprinting technologies, where these materials are called "inks". For bioprinting to be viable in tissue engineering applications, studies on the relevant rheological properties of inks and the correlation of these properties with the process parameters and final characteristics of the printed structures are necessary. However, these studies are still few in the literature, but their relevance has been recognized in recent years. In this master research, the rheology of carboxymethylcellulose (CMC) and Laponite nanocomposite hydrogels dispersed in water was studied, aiming at applications in additive manufacturing processes based on extrusion. Electrostatic interactions and hydrogen bonds between the silanol (Si-O) groups of Laponite and hydroxyl (-OH) of CMC directly influenced the rheological properties, dispersion stability, and hydrodynamic radius. The addition of CMC in Laponite dispersions resulted in a considerable increase in linear viscoelastic properties and viscosity and pseudoplasticity, resulting in weak and strong gels depending on the composition of the system. It was also observed that the presence of CMC inhibits the aging effects of Laponite. Subsequently, the printing capacity of the CMC/Laponite system was evaluated, where an appropriate ink composition for extrusion printing was defined. In addition to the rheological properties, formation, fusion, and collapse filament tests were performed. After printing the scaffolds, they were crosslinked in calcium chloride (CaCl₂) and citric acid solutions, resulting in non-toxic simple network hydrogels. The CMC/Laponite gels showed good printability, mechanical and biological characteristics suitable for applications as inks in bioprinting.

Key Word: *Hydrogels, nanocomposite (materials), biopolymers, industry 4.0, scaffolds, tissue engineering.*

Lista de Figuras

Figura 2.1. Bioimpressão 3D de tecidos e órgãos. As biotintas são criadas combinando células cultivadas e vários materiais biocompatíveis. Posteriormente elas são impressas por um dos três métodos de manufatura aditiva e finalmente os constructos impressos podem ser usados para triagem de drogas, modelagem de doenças e transplante in vitro. Fonte: (TASNIM et al., 2018).

Figura 2.6: Fórmula química da carboximetilcelulose (CMC). Fonte: (HABIB et al., 2018) .35

Figura 2.11: Perfil de viscosidade, de cisalhamento tensão e deformação42
Figura 2.12: Representação esquemática do comportamento de viscosidade. Fonte: Baseado em (MORRISON, 2001)
Figura 2.13: Curvas de fluxo para fluidos Pseudoplásticos: Viscosidade de corte zero, pseudoplasticidade e segundo prato newtoniano. Fonte: (AHO et al., 2015)
Figura 2.14: Esquema de uma amostra carregada no meio de duas placas com um oscilatório perfil de cisalhamento. Fonte: (WORLDWIDE, 2016)45
Figura 2.15:Teste de amplitude que mostra a faixa linear viscoelástica (LVE), ponto de escoamento (τy) e a transição do comportamento sólido para o líquido no ponto de fluxo. Fonte: Autoria própria
Figura 2.16: Resposta do teste de frequência para as soluções poliméricas emaranhadas (a) e os géis (b)47
Figura 2.17: Teste de tixotropia com a viscosidade dependente do tempo (3ITT). Fonte: (WORLDWIDE, 2016)
Figura 2.18: Curva de histerese para avaliação da tixotropia de fluidos. Fonte: Autoria própria. 49
Figura 2.19: Propriedades reológicas essenciais nos processos de impressão 3D: (a) Ilustração gráfica das etapas do processo baseado em extrusão 3D. (b) Propriedades de fluxo de iniciação e yield stress. (c) Comportamento pseudoplástico para prever ou processo de extrusão. (d) Recuperação da tinta post processo de impressão. Adaptado de (PAXTON et al., 2017)50
Figura 2.20: Aumento da complexidade de impressão conforme seja a aplicabilidade do <i>scaffolds</i> ou constructo impresso
Figura 2.21. Parâmetros geométricos envolvidos na avaliação da fidelidade da bioimpressão

i iguita 2.21. i arainettos	geometrieos envolvia	uos na avanação	du macmadae du	orompressuo
3D. Adaptado de (THEU	S et al., 2020)			53

Figura 3.2: Espectros FTIR de soluções CMC, dispersões de Laponita e dispersões de CMC/Laponita com 2% em massa de Laponita na faixa de 4000 cm⁻¹-2000 cm⁻¹ e 2000 cm⁻¹.

Figura 3.3: (a) Curvas de viscosidade em estado estacionário para várias concentrações de CMC em solução, a linha sólida corresponde ao ajuste do modelo cruzado para CMC e os símbolos abertos correspondem aos dados experimentais (Cp é a concentração do polimero). (b) Dependência da viscosidade específica para soluções CMC. (c) Dependência de G' (símbolos sólidos) e G'' (símbolos abertos) em função da frequência angular (ω) para soluções CMC. .64

Figura 3.4: Curva mestre de viscosidade CMC (concentração de referência de 1,0% em massa) e fatores de deslocamento horizontal (a_x) e vertical (a_y) vs. Concentração de CMC......67

Figura 3.8: Dependência de G' (símbolos sólidos) (a) e o (b) fator de amortecimento $(tan (\delta))$ da frequência angular (ω) para misturas CMC/Laponita com 2% em massa de Laponita em diferentes concentrações de CMC (Cp é a concentração do polimero). (c)

Fotografia das dispersões de CMC/Laponita com 2% em massa de Laponita (i) e concentrações de CMC/Laponita de: 0,25-2 (ii); 0,5-2 (iii); 0,75-2 (v); 1-2 (v); 2-2 (vi); 3-2 (vii) e 4-2 (viii).

Figura 4.1: Fotografia da impressora Educational Starter™ (3DBS, Brasil)......82

Figura 4.2: (a) Filamento depositado a 0°-90 °, (b) modelo e áreas medidas na plataforma. ..84

Figura 4.4: Teste de fusão de filamentos	91

Figura 4. 6:Teste de colapso do filamento (a) e fator da área de colapso (b).....92

Figura 4. 8: Gráfico de efeitos principais para a largura do filamento (médias ajustadas)95
Figura 4.9: Diagrama de Pareto de efeitos normatizados96
Figura 4.10: Amostras impressas: Influências da concentração de Laponita na capacidade de impressão
Figura 4.11: Scaffolds de 15, 30 e 50 camadas fabricadas para uma concentração de 1 CMC/4
Laponita
Figura 4.12: Testes de compressão para as amostras reticuladas com diferentes concentrações
de (a) $CaCl_2$ e (b) ácido cítrico. As concentrações das amostras de ácido cítrico são em % em
massa
Figura 4.13: (a) Taxa de intumescimento de amostras reticuladas com ácido cítrico, $CaCl_2$ e
sem reticular, e (b) fotos digitais de <i>scaffolds</i> antes e depois da reticulação
Figura 4. 14: Citotoxicidade dos agentes de reticulação: ácido cítrico e Cloreto de Calcio. 100

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Principais métodos de manufatura aditiva e suas características. Fonte: (JUNGST
et al., 2016; MALDA et al., 2013; WÜST; MÜLLER; HOFMANN, 2011; XU et al., 2020)27
Tabela 2.2: Principais modelos de ajuste matemático44
Tabela 3.1: Valores de pH para soluções CMC/Laponita
Tabela 3.2: Fatores de deslocamento para curva mestre de viscosidade experimental e
parâmetros de ajuste para o modelo de Cross para várias soluções CMC a 25 °C66
Tabela 3. 3: Parâmetros de ajuste do modelo de Ostwald-de Waele para dispersão de Laponita69
Tabela 3.4: Parâmetros de ajuste do modelo Ostwald-de Waele para misturas CMC/Laponita.71
Tabela 4.1: Nomenclatura das dispersões CMC-Laponita
Tabela 4.2: Parâmetros de impressão para realizar um estudo estadístico da influência destas
variáveis na largura do filamento usando a tinta ótima85
Tabela 4.3: Parâmetros de ajuste do modelo Ostwald-de Waele para misturas CMC/Laponita.88

Lista de Abreviaturas e Siglas

- C_P Concentração do polímero
- C_L Concentração de Laponita
- η Viscosidade
- η_{sp} Viscosidade específica
- η_0 Viscosidade em cisalhamento cero
- η_0 Viscosidade em cisalhamento infinito
- γ Deformação
- $\dot{\gamma}$ Taxa de cisalhamento
- ω Frequência angular
- *G'* Modulo de armazenamento
- G" Modulo de perda
- $tan(\delta)$ Fator de amortecimento
- m Índice de consistência
- n Índice de lei de potencias
- Df_r Taxa de difusão
- P_r Índice de capacidade de impressão
- C_f Fator de área de colapso

Sumário

Lista de Ilustrações
Lista de Tabelas
Lista de Abreviaturas e Siglas
CONTEUDO
1 INTRODUÇÃO
1.1 Objetivos
1.1.1 Objetivo geral
1.1.2 Objetivos específicos
1.2 Esboço da dissertação23
2 REVISÃO DA LITERATURA25
2.1 Manufatura aditiva25
2.2 Seleção das tintas (hidrogel precursor)29
2.3 Hidrogéis nanocompósitos
2.3.1 Carboximetilcelulose
2.3.2 Laponita
2.4 Comportamento reológico41
2.4.1 Viscosidade41
2.4.2 Comportamento pseudoplastico
2.4.3 Comportamento viscoelastico

2.5 Comportamento reológico nos processos de manufatura aditiva
2.6 Avaliações pós-impressão51
2.6.1 Fidelidade da estrutura impressa
2.6.2 Estabilidade mecânica e elasticidade54
2.6.3 Intumescimento dos <i>scaffolds</i>
3 INFLUÊNCIA DAS SOLUÇÕES DE CARBOXIMETILCELULOSE NAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE DISPERSÕES DE LAPONITA
3.1 Introdução
3.2 Materiais e Métodos
3.2.1 Preparação dos géis58
3.2.2 Potencial Zeta
3.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz
3.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)59
3.2.5 Caracterização reológica60
3.3 Resultados e discussão61
3.3.1 Formação da Estrutura61
3.3.2 Comportamento reológico de soluções CMC e dispersões de Laponita64
3.3.3 Comportamento reológico de soluções CMC em dispersões de Laponita69
4 CAPACIDADE DE IMPRESSÃO DE GÉIS DE
CARBOXIMETILCELULOSE/LAPONITA E RETICULAÇÃO PARA FORMAÇÃO
DE HIDROGÉIS77
4.1 Introdução

4.2 Materiais e Métodos
4.2.1 Materiais
4.2.2 Preparação de hidrogéis80
4.2.3 Caracterização reológica
4.2.4 Fabricação de <i>scaffolds</i> 82
4.2.5 Testes de formação e fusão de filamentos
4.2.6 Teste de colapso de filamento83
4.2.7 Impressão de padrão angular84
4.2.8 Efeito do multiplicador de extrusão, velocidade de impressão e distância de impressão
4.2.9 Teste de intumescimento
4.2.10 Ensaio de compressão
4.2.11 Ensaio de citotoxicidade80
4.2.12 Análise estatística
4.3 Resultados e discussão87
4.3.1 Propriedades reológicas
4.3.3 Teste de colapso de filamento92
4.3.4 Impressão de padrões angulares93
4.3.5 Efeito da velocidade do bico, multiplicador de extrusão e distância de impressão na largura do filamento
4.3.6 Fabricação de <i>scaffolds</i> em grande escala90
4.3.9 Teste de citotoxicidade100

5 CONCLUSÕES	
REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

Hidrogéis são estruturas poliméricas que possuem capacidade de absorver grande quantidade de água sem perder sua integridade estrutural (FERNANDES; DE MOURA; AOUADA, 2017). Devido à presença de ligações cruzadas químicas e/ou físicas, esses materiais permitem a entrada de água, moléculas ou solventes em sua estrutura, deformando-a, mas sem a separação física das cadeias (ULLAH et al., 2015). Uma das principais caraterísticas dos hidrogéis é a sua aplicabilidade como biomateriais, pois apresentam características biológicas e de suporte mecânico relevantes para o crescimento e proliferação celular (MALDA et al., 2013). Sua alta hidrofilicidade, baixa tensão superficial, consistência macia e elástica proporcionam um microambiente aquoso semelhante ao da matriz extracelular, que podem promover o crescimento celular (FEDOROVICH et al., 2007). Além disso, os hidrogéis possuem estrutura com alta porosidade, permitindo a passagem de nutrientes e solutos de baixo peso molecular, oxigenação e liberação de excretas, fundamentais para o crescimento e proliferação celular (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013; MURPHY; ATALA, 2014).

Dentro da área de biomateriais, muitos sistemas baseados em polímeros sintéticos e naturais são estudados para a obtenção de hidrogéis. Os polímeros naturais, quando comparados com os sintéticos, apresentam maior semelhança com a matriz extracelular, assim como melhores propriedades de adesão, crescimento e proliferação celular; porém, possuem baixa resistência mecânica e reprodutibilidade, limitando sua aplicabilidade (ZUMAYA QUIÑONES et al., 2009). Por outro lado, os polímeros sintéticos, possuem melhor desempenho mecânico e reprodutibilidade (ZHAO et al., 2013).

A partir dos biomateriais é possível obter estruturas biocompatíveis, chamadas *scaffolds*, que são suportes com características físicas, mecânicas e biológicas que promovem um ambiente adequado para o crescimento e proliferação celular (FEDOROVICH et al., 2007), assim como propriedades mecânicas específicas para uma dada aplicação (RIBEIRO et al., 2018).

Uma das técnicas mais promissoras para a obtenção de *scaffolds* é a manufatura aditiva (MA), a qual permite fabricar estruturas com geometrias complexas, sem necessidade de

moldes, com alta precisão e baixo custo para diferentes tipos de materiais (JUNGST et al., 2016). A MA tem sido utilizada em diversas aplicações nas últimas três décadas, com aplicações relevantes nas áreas aeroespacial, automotiva, médica, de arquitetura e educacional (BERMAN, 2012; BOSE et al., 2018; NING et al., 2015). Atualmente, tecnologias de MA baseadas em extrusão de hidrogéis são as mais usadas na obtenção de *scaffolds* para aplicações biomédicas. Esta técnica consiste basicamente na deposição controlada de camadas de gel, também chamado de tinta ou biotinta, resultando em uma estrutura tridimensional que pode ser usada para a regeneração de tecidos vivos (DONDERWINKEL; VAN HEST; CAMERON, 2017; GROLL et al., 2019). (MOBARAKI et al., 2020).

O uso de técnicas de MA por extrusão para a impressão de *scaffolds* está limitado às propriedades mecânicas e reológicas do material que será impresso. (FREEMAN et al., 2019). Em relação às propriedades reológicas, as características mais relevantes são: alta viscosidade e pseudoplasticidade, viscoelasticidade com predominância elástica e recuperação rápida da viscosidade (KRETLOW; KLOUDA; MIKOS, 2007; MURPHY; ATALA, 2014). Além disso, as propriedades mecânicas finais são influenciadas pelo processo de reticulação, pois, a química da reticulação determinará a capacidade do hidrogel de formar uma estrutura estável, influenciando propriedades como migração celular e difusão de nutrientes das estruturas impressas (MOUSER et al., 2017; TIGNER et al., 2020).

Dentre os materiais com as características descritas acima, destacam-se os chamados hidrogéis nanocompósitos (HNCs), os quais são caracterizados pela presença de nanopartículas na composição. A presença de nanopartículas pode conferir propriedades reológicas adequadas para a MA por meio do ajuste da composição, além da possibilidade de apresentar características mecânicas e biológicas apropriadas para aplicações em engenharia tecidual (XAVIER et al., 2015). Dentre os tipos de nanopartículas usadas em formulações de hidrogéis nanocompósitos destacam-se os nanotubos de carbono (NTC), grafeno, nanopartículas metálicas/óxidos metálicos (ouro, prata, óxido de ferro), nanopartículas de celulose (NC), e nanopartículas cerâmicas, como OS nanossilicatos (GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSSEINI, 2014; XAVIER et al., 2015).

A Laponita é um nanossilicato biocompatível, quimicamente composto por SiO₂ (66,6%); MgO (30,2%); Na₂O (2,9%) e Li₂O (0,7%), possui formato de disco com diâmetro de aproximadamente de 150 nm e 10 nm de espessura (JENNINGS et al., 1969). Quando disperso em água, a Laponita possui carga negativa na superfície do disco e carga positiva nas laterais, gerando interações eletrostáticas entre as partículas, o que faz com que este material seja usado como modificador reológico (JATAV; JOSHI, 2014), promovendo pseudoplasticidade e tixotropia em produtos aquosos (DÁVILA; D'ÁVILA, 2017; PEAK et al., 2018). Em estudos recentes, a Laponita foi usada para reforçar hidrogéis para aplicações biomédicas em processos de impressão tridimensional (AHLFELD et al., 2017; HONG et al., 2015; NAGHIEH et al., 2020; PEAK et al., 2018; WILSON et al., 2017; ZHAI et al., 2017) e bioimpressão (CHIMENE et al., 2018; XAVIER et al., 2015; ZHAI et al., 2018). Os nanocompósitos reforçados com Laponita promovem a adesão celular e melhoram a estabilidade fisiológica *in vitro*, obtendo novas aplicações deste nanossilicato no campo da engenharia tecidual (XAVIER et al., 2015).

Carboximetilcelulose (CMC) é um polissacarídeo celulósico hidrossolúvel obtido pela reação de celulose alcalina em NaOH aquoso com ácido monocloroacético ou seu sal de sódio. A partir desta reação, o CMCs produzido, pode ter a capacidade de formar filmes e géis, apresentando boa adesividade e propriedades polieletrolíticas (SHUI et al., 2017). Além disso, o CMC tem ampla aplicação na indústria alimentícia e biomédica, sendo utilizada como curativo (GARRETT et al., 2007). Na fabricação de hidrogéis, a CMC atua como um polímero hidrofílico que responde ao pH da solução, aumentando o intumescimento dos hidrogéis (MA et al., 2007).

Nesta pesquisa, foi estudado o sistema CMC/Laponita em dispersão aquosa visando aplicações na impressão por extrusão de *scaffolds*. O sistema foi escolhido devido a que tanto o polímero como a nanopartícula já foram estudados em outros sistemas por nosso grupo de pesquisa (DA FONSÊCA; D'ÁVILA, 2021; DÁVILA; D'ÁVILA, 2017, 2019; PINTO; DÁVILA; D'ÁVILA, 2019). Assim, no sistema CMC/Laponita foram avaliadas as propriedades reológicas, bem como as interações coloidais, buscando compreender os efeitos do polímero e das nanopartículas nas propriedades do sistema. Posteriormente, foram estabelecidos as composições e os parâmetros de impressão para a obtenção de *scaffolds* a partir de géis desse sistema. Uma vez obtidos os *scaffolds*, esses foram reticulados e caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho (FTIR). Testes *in vitro* de citotoxicidade foram realizados com fibroblastos, visando uma avaliação inicial do potencial de aplicação desses materiais na engenharia tecidual.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Obter *scaffolds* de hidrogéis nanocompósitos do sistema CMC/Laponita a partir do processo de manufatura aditiva baseada em extrusão, com potencial aplicação na engenharia tecidual.

1.1.2 Objetivos específicos

- i) Estudar o comportamento reológico dos géis de CMC/Laponita, analisando as interações, estabilidade coloidal, além da capacidade de formação de filamento do sistema, para posterior aplicação nos processos de impressão por extrusão.
- ii) Obter tintas imprimíveis de CMC/Laponita a partir da caracterização reológica dos géis, bem como avaliação da capacidade de impressão e reticulação dos *scaffolds* impressos.
- iii) Avaliar o desempenho mecânico e biológico *in vitro*, usando fibroblastos em hidrogéis de CMC/Laponita.

1.2 Esboço da dissertação

Esta dissertação está estruturada em cinco capítulos. Inicialmente, o **capítulo 1** mostrou uma visão geral do uso de hidrogéis nos processos de impressão tridimensional. O **capítulo 2** expõe uma revisão da literatura aprofundando nos conceitos de hidrogéis, manufatura aditiva e reologia, visando a aplicação em impressão tridimensional por extrusão, mecanismo de reticulação e, finalmente, o sistema CMC/Laponita, estudado nesta dissertação. O **capítulo 3** apresenta um estudo reológico dos mecanismos de interação do sistema CMC/Laponita de soluções diluídas, além da avaliação do fenômeno de envelhecimento dos géis contendo Laponita. Este estudo foi fundamental para entender a interação polímero/nanopartícula em soluções aquosas. O **capítulo 4** apresenta um estudo sobre a capacidade de impressão das tintas (mistura CMC/Laponita), mediante o estudo de parâmetros de impressão e capacidade de

formação de filamento, obtendo géis imprimíveis adequados para a construção de *scaffolds*. Dois diferentes tipos de reticuladores foram testados para obter hidrogéis de rede simples (RS). Posteriormente, foi avaliado o comportamento citotóxico dos hidrogéis, além de ser realizada análises de intumescimento e adesão celular nas amostras impressas. Finalmente, a conclusão geral desta pesquisa é apresentada no **capítulo 5**.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Manufatura aditiva

A manufatura aditiva (MA) é uma técnica de processamento e criação de protótipos tridimensionais a partir do uso de diferentes materiais (metais, polímeros, cerâmicos, areia, cera e células). O processo baseia-se na deposição em camadas do material a partir de um arquivo de CAD (*computer aided design*) (BOSE et al., 2018). Os primeiros sistemas foram comercializados em 1987 e hoje em dia são usados em diversas aplicações, que vão desde a criação de protótipos, até produtos de uso final.

Uma das principais vantagens da MA é a obtenção de objetos personalizados sem a necessidade de moldes, com menor uso de material quando comparado a outras técnicas. A MA tem evoluído nos últimos anos, sendo considerada como uma das principais tecnologias da próxima revolução industrial (BERMAN; ZARB; HALL, 2012). Uma das áreas promissoras de aplicação da MA é a engenharia tecidual (ET), visto que esta técnica permite precisão no controle do processo, reprodutibilidade e fabricação de estruturas com geometrias complexas (JUNGST et al., 2016). Os materiais impressos devem integrar os três componentes principais para permitir aplicações em ET: *scaffolds* impressos, células e fatores de crescimento. Esses três componentes permitem a biofabricação de uma estrutura que pode ser implantada diretamente (*in situ*) (GROLL et al., 2016) ou armazenada *in vitro* para maturação antes de ser implantada (VACANTI; LANGER, 1999).

Atualmente, o principal desafio da MA está na criação de tecidos funcionais carregados com células em que seja possível obter a integração de células, biomateriais e compostos bioativos em um processo conhecido como bioimpressão (GOPINATHAN; NOH, 2018; GROLL et al., 2016). Esta tecnologia permite a obtenção de *scaffolds* carregados com células de forma homogênea e controlada, proporcionando um ambiente ideal para o crescimento celular (nutrientes + oxigênio) (GROLL et al., 2016). Nesses processos de impressão, os polímeros derivados de celulose, colágeno, alginato, quitosana e ácido hialurônico são alguns dos mais utilizados para a obtenção de *scaffolds* (HONG et al., 2015; ZHAO et al., 2013).

A geração de tecidos funcionalmente viáveis requer um nicho e uma microestrutura que forneça suporte estrutural e mecânico, suprimento de nutrientes requeridos pelas células e a capacidade de se remodelar e integrar com o organismo, quando implantado. O uso da MA pode proporcionar estruturas com esses requisitos por meio da seleção adequada de biomateriais e técnicas de impressão. Assim, dentro das diferentes técnicas de manufatura aditiva utilizadas na fabricação de *scaffolds* estão a impressão assistida por laser, estereografia, impressão por jato de tinta e impressão baseada em extrusão (WANG et al., 2018) (Figura 2.1).



Figura 2.1. Bioimpressão 3D de tecidos e órgãos. Métodos de manufatura aditiva para a obtenção de constructos impressos que podem ser usados para triagem de drogas, modelagem de doenças e transplante in vitro. Fonte: (TASNIM et al., 2018).

Diversos fatores como viscosidade, tamanho do bico e temperatura influenciam diretamente na capacidade de impressão de uma tinta, sendo necessária uma escolha assertiva da técnica e tipo de material a ser utilizado no processo. A Tabela 2.1 mostra uma comparação das características principais dos diferentes métodos de manufatura aditiva: viscosidade das tintas, integridade estrutural e mecânica, resolução, tamanho do bico, tempo de fabricação e custo de impressão.

	Impressão por jato de tinta	Impressão por extrusão	Impressão por Laser	Estereografia
Processo de impressão	Serial (gota a gota)	Serial (linha por linha)	Serial (ponto a ponto)	Paralelo e contínuo (baseado em projeção)
Viscosidade da tinta	3.5-12mPa.s ⁻¹	30- 6 x 10 ⁷ mPa.s ⁻¹	1-300 mPa.s ⁻¹	Não tem limitação
Integridade mecânica e estrutural	Baixa	Alta	Baixa	Dependendo do dispositivo estereolitográfico
Resolução	~1µm	10μm para uma faixa de mm	10-100µm	1,3µm
Tamanho do bico	20- 250 µm	Faixa de 20 µm a mm	Tamanho de bico livre	Tamanho do bico livre
Tempo de fabricação	Médio para longo	Curto	Longo	Médio para longo
Custo de impressão	Baixo	Médio	Alto	Baixo
Vantagens	Accessível e versátil	Impressão de maiores geometrias (cm)	Precisão e boa qualidade de impressão	Precisão na fabricação e melhor qualidade de superfície
Limitações	Entupimento do bico e complexidade na fabricação de grandes estruturas de tecido	Depende fortemente das propriedades mecânicas da tinta e do método de reticulação do material	Desafios com a formação de tecido em testes <i>in vivo</i>	Potencial dano celular causado por fontes de luz ultravioleta e lasers no momento da fotopolimerização do material

Tabela 2.1. Principais métodos de manufatura aditiva e suas características. Fonte: (JUNGST et al., 2016; MALDA et al., 2013; WÜST; MÜLLER; HOFMANN, 2011; XU et al., 2020).

A impressão por jato de tinta e por extrusão são as técnicas mais relevantes deste grupo, onde usualmente são carregadas tintas de impressão baseadas em materiais coloidais e nanopartículas. As principais diferenças destas técnicas estão na maneira como as tintas são depositadas. No caso da técnica por jato de tinta, o processo é realizado por jateamento de gotículas, enquanto na impressão por extrusão, o processo se dá por meio de formação e deposição de filamentos em camadas. Os processos de impressão baseados em extrusão têm capacidade de impressão para uma maior faixa de viscosidade e menor tempo de fabricação quando comparados com aqueles baseados em jato de tinta (JUNGST et al., 2016). Estudos recentes de impressão por extrusão de tintas e biotintas de diversos materiais, como polímeros naturais e sintéticos, géis, hidrogéis e esferoides mostram o grande potencial desta técnica (HABIB et al., 2018).

A impressão baseada em extrusão é uma técnica que consiste a passagem de material através de um bico de extrusão e sua posterior deposição camada por camada, mantendo a estrutura impressa, permitindo a produção de objetos de dimensões relevantes (MALDA et al., 2013). As diferentes variações do processo de extrusão estão ilustradas na Figura 2.2. Conforme mostrado, o material é carregado em uma seringa, onde o escoamento pode ser controlado por um sistema pneumático, de pistão ou de roscas (JUNGST et al., 2016; WANG et al., 2018). Na deposição por sistema pneumático, o controle de pressão se dá através de gás pressurizado. No caso dos sistemas de pistão, o material é transportado por um parafuso até a bico de extrusão (JUNGST et al., 2016).



Figura 2.2: Dispensação robótica. Desenho dos diferentes mecanismos de extrusão (pneumático, pistão e parafuso). Fonte: (JUNGST et al., 2016; MALDA et al., 2013).

Comparando estes três mecanismos, os sistemas de parafuso têm uma configuração complexa. Os sistemas pneumáticos têm configuração simples e podem ser usados para materiais de alta viscosidade; no entanto, o uso de gás pode gerar atrasos na aplicação da força de injeção. Os sistemas de pistão têm um controle mais direto sobre a deposição, já que o deslizamento conduz diretamente a deposição do material, sendo um dos métodos mais viáveis para uso na bioimpressão, visto que permite a impressão de estruturas complexas em menores intervalos de tempo (MALDA et al., 2013). Nesta pesquisa de mestrado, o método utilizado foi a impressão por extrusão com um sistema de pistão.

Os processos de impressão tridimensional de tintas formadas a partir de hidrogéis envolvem critérios de projeto mais complexos quanto comparados com outras técnicas de fabricação típicas. Por exemplo, as tintas (precursores de hidrogel) devem ser transportadas através de uma agulha e ser capazes de manter a geometria depositada após a extrusão. Ainda, a seleção apropriada do polímero é essencial para manter a viabilidade das células, além de apresentar propriedades reológicas adequadas para a impressão (DEO et al., 2020; MOBARAKI et al., 2020; NAGHIEH et al., 2020; PAXTON et al., 2017; THEUS et al., 2020). Nas seções 2.2 e 2.3 estão mostradas as principais considerações pré e pós-impressão de tintas.

2.2 Seleção das tintas (hidrogel precursor)

Os hidrogéis são definidos como redes poliméricas tridimensionais reticuladas que possuem uma grande capacidade de absorção de água ou fluidos biológicos de até milhares de vezes seu peso seco (AHMED, 2015; HOFFMAN, 2012). Estas redes poliméricas intumescidas podem ser projetadas para controlar várias funções celulares, como adesão, propagação, proliferação e diferenciação (BRANDL; SOMMER; GOEPFERICH, 2007; NAGHIEH et al., 2020; ZELTINGER et al., 2001). A principal diferença entre os géis e hidrogéis está em suas características físicas. Géis são materiais que se dissolvem em água, enquanto os hidrogéis são redes reticuladas de polímeros que mantêm sua estrutura tridimensional quando são submergidos em água (GUPTA; VERMANI; GARG, 2002). Estas redes reticuladas resultam em comportamentos viscoelásticos que possuem flexibilidade e podem, em alguns casos, apresentar semelhança em suas características mecânicas com os tecidos naturais (PEPPAS et al., 2000).

Os hidrogéis podem ser classificados dependendo de seu mecanismo de reticulação em hidrogéis físicos e hidrogéis químicos (Figura 2.3). Os hidrogéis físicos são estruturas formadas

a partir de uma interação não covalente entre cadeias poliméricas hidrofílicas. Eles são formados por emaranhamentos moleculares e forças secundárias, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e interações iônicas. Esta reticulação física pode não ser de natureza permanente, mas são suficientes para fazer com que os hidrogéis mantenham sua integridade estrutural em meio aquoso (MAITRA; SHUKLA, 2014). Os géis físicos são frequentemente reversíveis e é possível dissolvê-los alterando as condições ambientais, como o pH e a força iônica da solução ou temperatura (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; NGUYEN; WEST, 2002).

Os hidrogéis químicos ou permanentes são formados a partir de ligações covalentes das cadeias poliméricas (CONNELL, 1975). A obtenção de uma rede reticulada por ligações covalentes pode ocorrer por meio da polimerização de macrômeros funcionalizados nas extremidades. Durante o processo de reticulação química ocorre um aumento constante da viscosidade até a obtenção de uma rede polimérica tridimensional. Alguns dos métodos de reticulação química para a formação de hidrogéis são: polimerização, reações orgânicas clássicas, reações redox e reações enzimáticas (HENNINK; NOSTRUM, 2002). Os processos de reticulação que requerem fotopolimerização posterior ao processamento geram uma rápida reticulação garantindo a forma da estrutura.



Figura 2.3: Representação gráfica dos tipos de reticulação: física e química. Fonte: (RAMACHANDRAN; JUNG; SPOKOYNY, 2019).

No processo de biofabricação de *scaffolds* para engenharia tecidual, a composição da biotinta deve suportar a alta viabilidade das células encapsuladas e protege-las das tensões de cisalhamento durante a extrusão (BLAESER et al., 2016). A massa molar e a densidade de reticulação são as características físicas mais críticas que influenciam o comportamento celular, independentemente do polímero utilizado (CRUISE; SCHARP; HUBBELL, 1998; DIKOVSKY; BIANCO-PELED; SELIKTAR, 2006).

O tipo e o grau de reticulação influenciam diretamente nas propriedades da rede, como propriedades de intumescimento, mecânicas e de transporte de moléculas (KUO; MA, 2001). Os hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros híbridos naturais, sintéticos ou sintéticos/naturais. Os polímeros sintéticos fornecem um melhor controle das propriedades mecânicas e de degradação quando comparados com os polímeros naturais. No entanto, algumas desvantagens são propriedades biológicas pobres e perda de propriedades mecânicas devido à degradação (AHMED, 2015; GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSSEINI, 2014). Por outro lado, os hidrogéis de polímeros naturais não são tóxicos e apresentam melhor biocompatibilidade e biodegradabilidade, mas exibem baixas propriedades mecânicas (HABIB et al., 2018; WANG et al., 2018). Os polímeros sintéticos possuem propriedades físicas e químicas mais reprodutíveis em comparação com os naturais, o que pode ser um fator importante para a fabricação de *scaffolds* em engenharia tecidual, garantindo maior estabilidade mecânica do hidrogel. A força dos hidrogéis pode ser aumentada incorporando agentes de reticulação, assim como aumentando o grau de reticulação (HOFFMAN, 2012; LIN; METTERS, 2006; MAITRA; SHUKLA, 2014). Diversos estudos das propriedades mecânicas e estruturais sobre o uso de polímeros sintéticos e naturais com diferentes graus de reticulação foram realizados (AVERY; RAMSAY, 1986; BENCHABANE; BEKKOUR, 2008; DÁVILA; D'ÁVILA, 2019).

Algumas das propriedades e caraterísticas necessárias para o processo de impressão e posterior crescimento celular, estão resumidas na Figura 2.4, incluindo características reológicas, parâmetros de impressão e reticulação.



Figura 2.4: Mapa conceitual de variáveis e relações críticas a levar em consideração nos processos de impressão. Fonte: (MALDA et al., 2013)

A seleção do polímero também é influenciada pelo tipo de funcionalidade desejada. Propriedades como intumescimento e degradabilidade do hidrogel influenciam no comportamento celular com a suplementação de nutrientes, remoção de resíduos, remodelagem e degradação da matriz (JI et al., 2019; RODELL et al., 2015). Alguns dos tipos de polímeros comuns utilizados, suas abordagens de reticulação e funcionalidades desejadas são resumidos na Figura 2.5.



Figura 2.5: Considerações antes da impressão. Tipo de polímero, mecanismos de reticulação e funcionalidades celulares necessárias para alcançar a viabilidade celular aprimorada.

2.3 Hidrogéis nanocompósitos

A engenharia tecidual nasceu como uma ciência que busca imitar, estimular e regenerar as funções dos tecidos nativos que apresentaram falhas resultantes de lesões, envelhecimento e doenças (GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSSEINI, 2014; VACANTI; LANGER, 1999). Desenvolver estruturas com arquitetura complexa que proporcionem um microambiente celular é um dos principais desafios para a formação de tecidos funcionais (GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSSEINI, 2014). Dentro dos recentes progressos, o uso de nanopartículas com aplicações em biomedicina (GOENKA; SANT; SANT, 2014; PIRICH et al., 2017; SUKTHAM et al., 2018) e medicina regenerativa (GOENKA; SANT; SANT, 2014), combinada com redes de hidrogéis, torna-se um candidato viável para o desenvolvimento de estruturas com propriedades físicas, químicas e biológicas que podem se aproximar com a dos tecidos vivos.

Segundo reportado por Gaharwar, Peppas e Khademhosseini, (2014) as tendências recentes indicam o interesse significativo no desenvolvimento de hidrogéis nanocompósitos em aplicações biomédicas. Os hidrogéis nanocompósitos são definidos como redes de polímeros reticuladas com presença de nanopartículas ou nanoestruturas. O tipo de reticulação pode ser química ou física, dependendo do tipo de aplicação, como foi explicado anteriormente. A presença de nanopartículas pode ser utilizada com a finalidade de adsorção de cadeias de polímero nas partículas, conferindo novas propriedades ao hidrogel. Algumas propriedades

físicas que podem ser modificadas com a adição de nanopartículas são as propriedades mecânicas, reológicas, ópticas, térmicas, magnéticas, entre outras. Com isso, é possível a partir desses sistemas, encontrar uma ampla gama de aplicações em setores como a eletrônica, óptica, medicina regenerativa, biosensores, bioatuadores, liberação de fármacos, dentre outras (GOENKA; SANT; SANT, 2014; SCHEXNAILDER; SCHMIDT, 2009).

A combinação de polímeros com nanopartículas permite o desenvolvimento de formulações nas quais podem-se ajustar propriedades químicas, físicas e biológicas que podem se mostrar vantajosas em processos de bioimpressão. Nas próximas seções será abordado o sistema de géis nanocompósitos baseados em carboximetilcelulose (CMC) e Laponita.

2.3.1 Carboximetilcelulose

A celulose é um polímero natural de glicose que está presente como componente principal de plantas, algodão e linho. Devido à sua estrutura química, apresenta alta cristalinidade e insolubilidade em água e outros solventes. A presença de grupos hidroxila na celulose permite seu uso na preparação de hidrogéis com excelentes propriedades. Estes hidrogéis são promissores para aplicação em diversas áreas como superabsorventes para produtos de higiene pessoal, depósitos de água na agricultura, dispositivos para entrega de fármacos e fabricação de *scaffolds* em engenharia tecidual (SANNINO; ESPOSITO; NICOLAIS, 2000). A celulose é adequada para uso nos processos de MA, devido ao comportamento pseudoplástico, além da biodegradabilidade e biocompatibilidade, características principais para uso em aplicações biomédicas (SANNINO; DEMITRI; MADAGHIELE, 2009; WANG et al., 2018).

A carboximetilcelulose (CMC) é um biopolímero aniônico solúvel em água derivado da celulose por modificação química. Este é formado por β -D-glicose e sal de β -D-glucopiranose-2-O-(carboximetil)-monosódio conectados por meio de ligações β -1,4 glucosídicas (HAN; WANG, 2016), conforme o mostrado na Figura 2.6. CMC é atóxico e não alergênico, sensível ao pH e a variações de forca iônica. sendo amplamente utilizado como espessante (TONGDEESOONTORN et al., 2011). Cada monômero de glicose possui três grupos hidroxila que podem ser substituídos por um grupo carboxila. A celulose torna-se mais solúvel, espessa e estável, quanto maior a substituição do grupo hidroxila por carboxila (HAN; WANG, 2016).



Figura 2.6: Fórmula química da carboximetilcelulose (CMC). Fonte: (HABIB et al., 2018)

Quando o CMC é dissolvido em água, um processo eletrolítico separa uma molécula de CMC em cátions de sódio e um aníon polimérico. Estes íons em solução interagem por meio de forças eletrostáticas, além disso, as moléculas de água e os grupos OH da molécula de CMC exibem um dipolo elétrico que realiza uma força de interação eletrostática, as chamadas pontes de hidrogênio. Essas interações eletrostáticas desempenham um papel fundamental para entender a viscosidade da solução poli eletrolítica de CMC (LIU; YU; LIN, 2007).

A CMC apresenta alta viscosidade, excelente estabilidade térmica, alta solubilidade em água e boas propriedades biodegradáveis, devido à presença de grupos hidroxila e carboxila presentes na rede. Algumas de suas aplicações incluem usos como produtos farmacêuticos, detergentes, agente emulsificante, cosméticos e alimentos (BARBUCCI; MAGNANI; CONSUMI, 2000; OLIVEIRA et al., 2015; REIFLER et al., 2010). Aplicações na biomedicina para a liberação de fármacos e como apócitos para processos de cicatrização são outras das aplicações deste polímero (OLIVEIRA et al., 2015; SHUI et al., 2017).

Os hidrogéis de CMC são preparados a partir de uma solução aquosa ou gel, reticulado por métodos químicos ou físicos. Diferentes métodos de reticulação têm sido testados para a construção de hidrogéis de CMC. O uso de ácido cítrico, *Epichlorhydrin*, aldeídos e reagentes aldeídos e ácidos multifuncionais são referenciados na literatura (SANNINO; ESPOSITO; NICOLAIS, 2000).

As propriedades reológicas do CMC têm sido estudadas em concentrações no intervalo de 1 a 5 % em massa, reportando comportamentos quase Newtonianos em baixas concentrações e comportamento pseudoplástico e viscoelástico em altas concentrações (BENCHABANE; BEKKOUR, 2008). Outros estudos reológicos realizados mostraram o mesmo comportamento reológico para concentrações de polímero com concentrações de 5 a 8% em massa (EDALI;

ESMAIL; VATISTAS, 2001). Baseado nos estudos disponíveis na literatura, as propriedades reológicas do CMC evidenciam seu potencial para obtenção de *scaffolds* tridimensionais, ao serem associados com nanopartículas,, permitindo sua exploração em outros campos como a bioimpressão (AHLFELD et al., 2017; HABIB et al., 2018; HABIB; KHODA, 2019; MALLAKPOUR; TUKHANI; HUSSAIN, 2021; MELILLI et al., 2020; OLADAPO; OSHIN; OLAWUMI, 2020).

2.3.2 Laponita

Nos últimos anos, nanomateriais derivados de argila têm sido investigados para diversas aplicações em biomedicina devido às suas características biocompatíveis (GAHARWAR et al., 2019). Os biomateriais à base de nanoargilas apresentam, em suspensão, um alto teor de água, biocompatibilidade e comportamento reológico altamente pseudoplástico (CHIMENE; ALGE; GAHARWAR, 2015; GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSSEINI, 2014; SCHEXNAILDER; LOIZOU; PORCAR, 2009). Dentro deste grupo a Laponita XLG tem-se destacado como um modificador reológico usado na composição de hidrogéis para os processos de fabricação.

Laponita é uma Esmectita tri octaédrica, composta de silicato sintético em camadas (Laponita é uma marca registrada pela companhia BYK Additives Ltd). Na Figura 2.7 é mostrada a geometria da Laponita, a qual é em forma de disco de 20–50 nm de diâmetro e 1–2 nm de espessura com fórmula empírica (Na⁺_{0.7}[(Si₈Mg_{5.5}Li_{0.3})O₂₀(OH)₄]^{-0.7} (GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSSEINI, 2014). Devido à sua composição, a Laponita possui uma distribuição dual de carga eletrostática em sua estrutura quando em dispersão aquosa: a superfície é carregada negativamente, enquanto que as bordas são carregadas positivamente em pH < 11 nas bordas (PAINEAU et al., 2011).


Figura 2.7: Tamanho, forma e composição química da Laponita individual. Fonte: (GAHARWAR et al., 2019).

Conforme mostrado na Figura 2.8, quando a Laponita é dispersa em água, ocorrem interações eletrostáticas entre as superfícies e as bordas das partículas. Dependendo da concentração de partículas, essas interações resultam em diferentes sistemas, que vão desde fluidos de baixa viscosidade até géis coloidais ordenados, formando uma estrutura do tipo "castelo de cartas" (*house of cards*) e formação de hidrogéis (AFEWERKI et al., 2019; GAHARWAR et al., 2019).



Figura 2.8: Esquema mostrando a esfoliação da Laponita. Em alta concentração > 3% em massa, forma-se uma estrutura de castelo de cartas que resulta na formação de gel. Fonte: (GAHARWAR et al., 2019).

A adição de sais no meio de dispersão, tal como a dispersão em tampão fosfato salino ou *Phosphate-buffered saline* (PBS), pode alterar a estabilidade da dispersão. As interações entre as nanopartículas de Laponita são as responsáveis pela sua organização interna em meios aquosos, e dependem de fatores como temperatura, pH, força iônica, presença de íons e a sua concentração (JATAV; JOSHI, 2014; THOMPSON; BUTTERWORTH, 1992).

Dispersões aquosas de Laponita em concentrações superiores a 2% em massa resultam em géis com comportamento tixotrópico (RODRIGUEZ et al., 2018). Esta propriedade permite a injeção do gel através de um bico de extrusão no processo de impressão. Além disso, a Laponita é um reticulador físico que melhora as propriedades mecânicas como resistência e tenacidade de géis físicos formados por polímeros (AVERY et al., 2016; SHEIKHI et al., 2018). Interações eletrostáticas podem ocorrer entre as moléculas polares presentes no ambiente e as cargas negativas/positivas presentes na superfície e bordas do nanossilicato. Estas interações dão como resultado géis altamente resistentes (AFEWERKI et al., 2019; RUZICKA; ZACCARELLI, 2011a).

Além de ter propriedades adequadas para impressão, a Laponita apresenta alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, morfologia anisotrópica e grande área de superfície, características uteis para posteriores aplicações em área da engenharia tecidual. Tomás e colaboradores, (2018) relataram a não toxicidade da Laponita XLG em células tronco mesenquimais humanas (hMSC) em concentrações menores de 1 mg.mL⁻¹, o que permite o seu uso na liberação controlada de fármacos e na obtenção de *scaffolds* (AFEWERKI et al., 2019; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018). Em contraste, a rede polimérica de Laponita/hidroxipropilmetilcelulose silanizada (Si-HPMC) sugeriram nos ensaios de

citotoxicidade que a Laponita XLS é toxica em concentrações acima de 0,001%, mas com a internalização da célula controlada esta rede se adaptou para o uso em engenharia tecidual (XIE et al., 2018). Para o desenvolvimento de nosso projeto e tomando em consideração a literatura nós usamos a Laponita XLG.

Ao combinar soluções poliméricas com dispersões de Laponita, o comportamento solgel se torna complexo, e a determinação das interações entre as cadeias poliméricas e a nanoargila torna-se um desafio. Por exemplo, as cadeias poliméricas adsorvidas podem ter diferentes regiões, como caudas, trens e laços (Figura 2.9). Ainda que os mecanismos de interações entre polímeros e Laponita ainda não estejam elucidados, geralmente assume-se que as duas interações mais importantes sejam as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (RUZICKA; ZACCARELLI, 2011a). Essas podem dar-se entre os grupos carregados na estrutura polimérica com a superfície e as bordas da Laponita. Assim, como pode ocorrer interações físicas entre a Laponita e os polímeros, interações químicas podem formar ligações covalentes. Dopamina (LIU et al., 2014) ou siloxano (BOYER et al., 2018) são alguns dos terminais ativos necessários para que o nanosilicato atue como epicentro da reticulação, conectando só uma partícula com várias cadeias poliméricas, reforçando a rede (GAHARWAR et al., 2019).



Figura 2.9: Mecanismos de reticulação da Laponita com cadeias poliméricas. Fonte: (GAHARWAR et al., 2019).

As interações entre polímeros e nanopartículas são dadas por diversos parâmetros, como a estrutura polimérica, massa molar, temperatura, e hidrofilicidade (SCHMIDT et al., 2002a; SCHMIDT; NAKATANI; HAN, 2002). Esses parâmetros conduzem as cadeias de polímeros mais curtas (menor massa molar) a serem adsorvidas fisicamente na superfície da Laponita. Com o aumento da massa molar do polímero, as caudas do polímero se entrelaçam resultando na formação de rede reticulada fisicamente (Figura 2.10). Se as cadeias de polímero são adsorvidas sem formar ligações covalentes, a dispersão final terá comportamento pseudoplástico imposto pela Laponita (NEL et al., 2009a; SCHEXNAILDER; SCHMIDT, 2009).



Interações Laponita- polímero

Incremento do peso molecular do polímero

Figura 2.10: Interações da Laponita com o polímero em diferentes pesos moleculares. O tamanho crítico da cadeia polimérica resulta na formação da rede fisicamente reticulada. Fonte: (GAHARWAR et al., 2019).

Uma variedade de polímeros sintéticos e naturais incluindo poli (etileno glicol/óxido) (PEG/PEO) (NELSON; COSGROVE, 2004a; SCHMIDT et al., 2002a), Pluronics (LOH; JARVIS, 2010), gelatina (PAWAR; BOHIDAR, 2009a) entre outros, foram combinados com Laponita para obter nanocompósitos para aplicações biomédicas. Misturas entre Laponita e CMC tem sido abordadas para a fabricação de películas de nanocompósitos biomiméticos, permitindo a melhora das propriedades mecânicas e térmicas da mistura (OLIVEIRA et al., 2015; XU; ERDEM; EISER, 2020). No entanto, até o nosso conhecimento não há estudos detalhados que tenham abordado o sistema de Laponita adicionado à matriz polimérica de CMC para uso como tinta ou biotinta em processos de manufatura aditiva por extrusão, que é o objeto de estudo dessa dissertação.

2.4 Comportamento reológico

A reologia é o estudo do escoamento e deformação da matéria, descrevendo a relação existente entre força, deformação e tempo. Nesta área investiga-se as relações tensão/deformação de fluidos/materiais como polímeros, alimentos, sistemas biológicos, suspensões, emulsões, entre outros. A reologia estuda o comportamento de materiais viscoelásticos e não-Newtonianos, que exibem simultaneamente propriedades de sólidos e líquidos sob a aplicação de forças e deformações em determinado tempo (MORRISON, 2001).

Para o estudo das propriedades reológicas de um material existem vários tipos de ensaios que podem ser realizados a partir de solicitações mecânicas de cisalhamento. Estas são forças aplicadas tangente ao eixo de carregamento onde o movimento deslizante resulta em atrito estático e isso pode ser medido como uma tensão de cisalhamento (ABRAMOWITCH; EASLEY, 2016). Nas próximas seções são apresentadas as características reológicas importantes em cisalhamento para o estudo de tintas para o processo de impressão por extrusão.

2.4.1 Viscosidade

A viscosidade é uma propriedade importante dos líquidos que permite descrever sua resistência ao escoamento e está relacionada com a fricção interna no líquido. Em reologia, o escoamento de cisalhamento (*shear flow*) é o caso mais usual, no qual camadas de líquido se movem umas sobre a outras, em resposta à força de cisalhamento. A força externa adota uma forma de tensão de cisalhamento atuando sobre uma determinada área de unidade de líquido dando como resultado um gradiente de velocidade em todo o comprimento da amostra, denominado taxa de cisalhamento (MORRISON, 2001). A viscosidade de cisalhamento neste processo é obtida como a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, como é mostrado na Figura 2.11.



Figura 2.11: Perfil de viscosidade, de cisalhamento tensão e deformação

Como observado na Figura 2.12, os fluidos podem ser classificados de acordo com sua viscosidade em três grandes grupos. Os fluidos newtonianos são aqueles nos quais a viscosidade é independente da quantidade de cisalhamento aplicado, como a água e os hidrocarbonetos simples. Conforme a complexidade do líquido aumenta, por exemplo, pela presença de gotículas, partículas ou polímeros, os fluidos podem apresentar uma resposta não newtoniana, na qual a viscosidade depende da taxa de cisalhamento aplicada. Estes líquidos são chamados de líquidos estruturados e seu comportamento reológico pode ser medido usando reômetros, que proporcionam a realização de medições de uma ampla faixa de viscosidades, de taxas de cisalhamento, tensões de cisalhamento e temperatura (MORRISON, 2001).



Figura 2.12: Representação esquemática do comportamento de viscosidade. Fonte: Baseado em (MORRISON, 2001).

O comportamento não newtoniano é comum em diversos produtos industriais e comerciais incluindo alimentos, cosméticos, cimentos, dentre outros. Estes podem ser classificados em dois grupos: pseudoplásticos e dilatantes. No caso de materiais pseudoplásticos, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, e para os dilatantes, a viscosidade aumenta com a taxa de cisalhamento (MORRISON, 2001).

Para processos de impressão baseados em extrusão, uma alta viscosidade em baixa taxa de cisalhamento é necessária para garantir que a tinta ou biotinta tenha boa fidelidade de forma, evitando o espalhamento e o colapso das estruturas. No caso dos polímeros, a viscosidade

depende da massa molar, grau de ramificação, concentração e presença de aditivos (JIA et al., 2014).

2.4.2 Comportamento pseudoplastico

O comportamento pseudoplástico é um comportamento não Newtoniano característico dos polímeros fundidos, soluções concentradas de polímeros e dispersões coloidais (RUTZ et al., 2015). Como previamente mencionado, os materiais pseudoplásticos apresentam uma alta viscosidade em baixas taxas de cisalhamento e baixa viscosidade em altas taxas de cisalhamento, respectivamente. Este comportamento resulta do rearranjo microestrutural que acontece durante a aplicação de cisalhamento (WORLDWIDE, 2016). No caso de fluidos poliméricos, este fenômeno pode ser explicado em um nível molecular, como mostrado na Figura 2.13.



Figura 2.13: Curvas de fluxo para fluidos Pseudoplásticos: Viscosidade de corte zero, pseudoplasticidade e segundo prato newtoniano. Fonte: (AHO et al., 2015).

Na curva de escoamento, em baixas taxas de cisalhamento, os materiais apresentam um ordenamento irregular com uma alta viscosidade (η_0) como resultado das interações de partícula/molécula e os efeitos restauradores do movimento browniano. Neste caso, as cadeias estão emaranhadas aleatoriamente, dificultando o deslizamento de umas sobre outras gerando um platô newtoniano. Com o aumento da taxa de cisalhamento, estes efeitos podem ser superados e as partículas e cadeias podem desemaranhar-se e rearranjar-se em camadas,

alinhando-se na direção do escoamento, resultando no comportamento pseudoplástico. Finalmente, em taxas de cisalhamento muito altas, as cadeias poliméricas não podem mais orientar-se e um segundo platô de viscosidade constante é observado, chamado platô de viscosidade de cisalhamento infinito, η_{∞} . A viscosidade η_{∞} está associada ao grau máximo de orientação possível sob cisalhamento (AHO et al., 2015; OSSWALD; RUDOLPH, 2014). Como na maioria dos casos este platô é ligeiramente superior à viscosidade do solvente e não é relevante nos processos de impressão.

A região pseudoplástica mostrada nas curvas de viscosidade pode ser descrita por diferentes modelos matemáticos. Na Tabela 2.2 são resumidos alguns deles.

Modelo	Equação	Parâmetros	Referências		
Ostwald-de Waele	$n(\dot{y}) = m\dot{y}^{n-1}$	<i>m</i> índice de consistência	(MORRISON, 2001)		
	η(γ) – mγ	<i>n</i> índice de power-law			
Cross		η_0 Viscosidade de			
	$\frac{\eta(\dot{\gamma}) - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = 1 + (\lambda \dot{\gamma})^{-n}$	cisalhamento zero	(CROSS, 1964)		
		η_{∞} Viscosidade de			
Carreau	$\frac{\eta(\dot{\gamma}) - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \left[1 + (\lambda \dot{\gamma})^2\right]^{\frac{n-1}{2}}$	$\eta_{\infty} = 0$ Simplifica o modelo	(CARREAU, 1972)		
		λ constate de tempo do fluido			
Carreau-Yasuda	$\frac{\eta(\dot{\gamma}) - \eta_{\infty}}{\eta(\dot{\gamma}) - \eta_{\infty}} = \left[1 + (\lambda \dot{\gamma})^a\right]^{\frac{n-1}{a}}$	a parâmetro de transição	(YASUDA; ARMSTRONG [.]		
	$\eta_0 - \eta_\infty = \left[1 + (\lambda \gamma) \right]^{-1}$	a paramento de transição	COHEN, 1981)		

Tabela 2.2. Principais modelos de ajuste matemático.

Classicamente, o modelo de Ostwald- de Waele, também conhecido por lei de potências, é um dos mais usados em fluidos onde o patamar newtoniano de viscosidade em baixas taxas de cisalhamento não é observado. Neste modelo, o índice da lei de potência descreve o grau de pseudoplasticidade. Quando n = 1, a solução é newtoniana; n < 1, pseudoplastica; e n > 1, dilatante (SUNTORNNOND et al., 2016). A capacidade de para a impressão por extrusão de um tinta está diretamente relacionada com as características pseudoplásticas dessas (DEO et al., 2020). Por exemplo, o perfil reológico de geis de alginato foi investigado usando a equação de lei de potências que $n \sim 0.3 - 0.4$ apresenta um perfil de viscosidade apropriado para aplicações em bioimpressão desse sistema (BLAESER et al., 2016).

2.4.3 Comportamento viscoelastico

Ensaios de reologia utilizando solicitações oscilatórias em cisalhamento permitem definir o caráter viscoelástico de um dado material/fluido. Nestes ensaios, quando são realizados dentro do regime de viscoelasticidade linear, é possível identificar a contribuição viscosa e a contribuição elástica, permitindo, portanto, uma caracterização do comportamento viscoelástico do material. O comportamento elástico está associado com o modulo de armazenamento (G') e o comportamento viscoso com o modulo de perda (G''). Estas funções materiais podem ser analisadas mediante testes de amplitude e varredura de frequência.

Nos ensaios oscilatórios, a tensão e deformação são definidas da seguinte forma:

$$\gamma(t) = \gamma_A \operatorname{sen}(\omega t) \tag{2.1}$$

$$\tau(t) = \tau_A \operatorname{sen}(\omega t) \tag{2.2}$$

onde $\gamma e \tau$ são a deformação e tensão respetivamente, ω a frequência angular e t o tempo.

No teste de amplitude, ilustrado na Figura 2.14, a amostra é colocada entre duas placas paralelas em uma altura conhecida (h), onde a frequência angular permanece constante enquanto, a amplitude de tensão ou deformação aumentam em função do tempo.



Figura 2.14: Esquema de uma amostra carregada no meio de duas placas com um oscilatório perfil de cisalhamento. Fonte: (WORLDWIDE, 2016).

O teste oscilatório de amplitude consiste em aplicar uma tensão ou deformação e monitorar o modulo de armazenamento (G') e o modulo de perda (G'') com o aumento da amplitude em uma frequência angular constante. Como observado na Figura 2.15 com a curva obtida é possível determinar a região linear viscoelástica (LVE), a tensão de escoamento (τ_y) e o ponto de escoamento (τ_f).



Figura 2.15:Teste de amplitude que mostra a faixa linear viscoelástica (LVE), ponto de escoamento (τ_y) e a transição do comportamento sólido para o líquido no ponto de fluxo. Fonte: Autoria própria.

Como se observa, na região de LVE, G' e G'' são constantes. O valor de tensão limite da faixa de LVE é definido como tensão de escoamento (*yield stress*), abaixo desse valor as tensões aplicadas são insuficientes para causar ruptura estrutural. Quando o valor de tensão de escoamento é excedido, aparecem não linearidades correspondendo ao ponto em que G' se torna dependente da tensão. Finalmente, o ponto de escoamento ou ponto de cruzamento entre G' e G'' permite observar na amostra a transição de um comportamento do tipo sólido (*solid-like*) (G' > G'') para um comportamento do tipo líquido (*liquid-like*) (G'' > G').

Dentro do regime LVE, testes oscilatórios variando a frequência são realizados para determinar o caráter viscoelástico do material, que é conhecido como ensaio de cisalhamento oscilatório de pequena amplitude (SAOS, do inglês "*Small Amplitude Oscillatory Shear*"). Como é mostrado na Figura 2.16a, para fluidos viscoelásticos, como soluções poliméricas concentradas, em baixas frequências se tem um comportamento viscoso G'' > G', enquanto a frequências maiores há uma transição do comportamento viscoso para o comportamento

elástico. A Figura 2.16b mostra o comportamento viscoelástico para materiais com comportamento de gel, onde G' e G'' são paralelos, e os módulos são quase independentes da frequência, sem ocorrer a transição entre os módulos elásticos e viscosos.



Figura 2.16: Resposta do teste de frequência para as soluções poliméricas emaranhadas (a) e os géis (b).

A razão entre o modulo de perda (G'') e o modulo de armazenamento (G') é denominada fator de amortecimento (*damping factor*), dada por:

$$\tan \delta = \frac{G^{\prime\prime}}{G^{\prime}} \tag{2.3}$$

Quando $tan(\delta) > 1$, predomina o comportamento viscoso (G'' > G'). Quando $tan(\delta) < 1$, predomina o comportamento elástico (G' > G''). Entretanto, quando $tan(\delta) = 1$ o material está em transição do comportamento viscoso para elástico ou vice-versa.

2.4.4 Comportamento tixotrópico

Para uma ampla gama de fluidos, o comportamento pseudoplástico é reversível, ou seja, estes recuperam sua viscosidade inicial após retirado o cisalhamento. Esta característica é o resultado da reorganização das moléculas e/ou partículas. Quando este processo de recuperação é dependente do tempo, o fluido é chamado de tixotrópico. Enquanto um material pseudoplástico nem sempre é tixotrópico, um material tixotrópico sempre será pseudoplástico

(WORLDWIDE, 2016). Exemplos de materiais tixotrópicos encontrados no dia a dia são o mel de abelha, manteiga, clara de ovos, ketchup, entre outros.

Na Figura 2.17 é observada a resposta típica de um material com comportamento tixotrópico submetido a um ensaio escalonado de três intervalos, conhecido por ensaio de tixotropia de 3 pontos (3ITT). Inicialmente, é aplicada uma taxa de cisalhamento de pequena magnitude para simular o comportamento em "repouso" das amostras. Em seguida ocorre a aplicação súbita de uma alta taxa de cisalhamento durante um determinando tempo, onde ocorre a quebra estrutural da amostra, que, no caso da impressão por extrusão, está associada com a passagem da amostra pelo bico de extrusão. Por último, uma baixa taxa de cisalhamento por um período maior de tempo é aplicada novamente, onde ocorre a recuperação estrutural da amostra (ÖZKAN et al., 2017).

Existem diferentes métodos para analisar os processos de restruturação logo após a impressão. O método mais utilizado consiste na recuperação após um determinado tempo, no qual é definido o tempo (t) em que a viscosidade da estrutura é recuperada (η_{trec}) e esta é comparada com a viscosidade em repouso (η_i).

$$\eta_{rec} = \frac{\eta_{trec}}{\eta_i} * 100 \tag{2.4}$$

Para avaliar o comportamento tixotrópico em sistemas para impressão por extrusão, uma porcentagem de recuperação de pelo menos 80% é considerada adequada (PEAK et al., 2018). O tempo de recuperação pode ser visto como uma medida relativa da tixotropia, sendo que pequenos tempos de recuperação significam que a amostra é menos tixotrópica se comparado com uma amostra com maior tempo de recuperação (WORLDWIDE, 2016).



Figura 2.17: Teste de tixotropia com a viscosidade dependente do tempo (3ITT). Fonte: (WORLDWIDE, 2016).

O teste de histerese é uma outra forma de avaliar o comportamento tixotrópico. Este consiste em impor, a partir do repouso, a uma determinada taxa, uma taxa de cisalhamento crescente até um valor máximo e posteriormente um decréscimo a essa mesma taxa até o repouso, gerando uma rampa crescente e outra decrescente. Quando o fluido é tixotrópico, um comportamento de histerese é observado e a área da curva de histerese indica a energia consumida para a quebra da estrutura nas condições do ensaio. Se o fluido não apresenta diferença entre as rampas, o comportamento da amostra é independente do tempo e, portanto, não é tixotrópico. Porém, quando a tensão de cisalhamento na rampa de subida é maior que da rampa de descida, a amostra é dependente do tempo sob cisalhamento e, portanto, tixotrópica. A Figura 2.18 mostra de forma esquemática o resultado de um teste de histerese.



Taxa de cisalhamento

Figura 2.18: Curva de histerese para avaliação da tixotropia de fluidos. Fonte: Autoria própria.

2.5 Comportamento reológico nos processos de manufatura aditiva

Para avaliar a capacidade de impressão das tintas, as propriedades reológicas e o processo de impressão por extrusão se correlacionam em 3 etapas, segundo ilustrado na Figura 2.19a: (i) Antes de imprimir (repouso e início do escoamento), (ii) durante a impressão (alta taxa de cisalhamento no interior do bico ou matriz de extrusão) e (iii) após a impressão (recuperação da estrutura).



Figura 2.19: Propriedades reológicas essenciais nos processos de impressão 3D: (a) Ilustração gráfica das etapas do processo baseado em extrusão 3D. (b) Propriedades de fluxo de iniciação e *yield stress*. (c) Comportamento pseudoplástico para prever ou processo de extrusão. (d) Recuperação da tinta post processo de impressão. Adaptado de (PAXTON et al., 2017).

Antes da impressão, o material está em repouso, onde este possui alta viscosidade e um comportamento do tipo sólido. Um escoamento é gerado sob a aplicação de forças externas, através, por exemplo, de um pistão. Devido à pseudoplasticidade do material, esse irá escoar. Portanto, um comportamento pseudoplástico acentuado é desejável (Figura 2.19b).

Durante a impressão, o material deve fluir facilmente por meio da ponta do bico, devido à diminuição da viscosidade em função da magnitude da taxa de deformação. O ponto de escoamento (*flow point*) indica essa transição. Nesta etapa, o comportamento pseudoplástico permite alcançar baixas viscosidades, possibilitando o escoamento do fluido na matriz de extrusão (Figura 2.19c).

Finalmente, após a impressão, o objeto deve conservar o seu formato, sendo necessária a recuperação da estrutura quando o material é depositado sobre a plataforma de impressão. Uma alta recuperação elástica e viscosa é ideal para este caso, evitando o colapso do material depositado (Figura 2.19d).

Atingir um equilíbrio sinérgico entre o comportamento pseudoplastico, as propriedades viscoelásticas, e a recuperação da viscosidade após o cisalhamento é necessário à medida que a complexidade da impressão aumenta de unidimensional (1D) para 3D (*Figura 2.20*) (COFIÑO et al., 2019).



Figura 2.20: Aumento da complexidade de impressão conforme seja a aplicabilidade do *scaffolds* ou constructo impresso.

2.6 Avaliações pós-impressão

2.6.1 Fidelidade da estrutura impressa

Análises anteriores como a reologia permitem determinar o potencial uso de um hidrogel como tinta avaliando a capacidade de se deformar e recuperar após um cisalhamento aplicado. No entanto, após da impressão uma análise qualitativa é necessária para avaliar a fidelidade e qualidade do extrudado. A partir do desenho CAD da estrutura impressa é possível caracterizar a fidelidade de impressão pela comparação das dimensões do projeto com as dimensões finais (HOCKADAY et al., 2008; PEAK et al., 2018).

Nos filamentos impressos, a fidelidade de forma (estabilidade) afeta diretamente a difusão das moléculas, migração celular, rigidez e elasticidade. Portanto, uma inspeção visual após impressão, com base na avaliação microscópica de filamentos únicos impressos ou camadas como modelos para a avaliação pode ajudar a avaliar a fidelidade (THEUS et al., 2020). Essas avaliações consistem em análises qualitativas e quantitativas das características geométricas dos modelos impressos (Figura 2.21). As características geométricas que têm sido comumente usadas para avaliações de fidelidade incluem diâmetro e uniformidade do filamento (SOLTAN et al., 2019). A uniformidade quantifica o comprimento dos filamentos impressos e é usada para determinar a consistência dos filamentos impressos em comparação com o modelo projetado. Filamentos com bordas retas apresentam maior uniformidade e, portanto, fidelidade de impressão. Pelo contrário, fios impressos com bordas irregulares resultariam em menor fidelidade de bioimpressão (THEUS et al., 2020).

A avaliação da fidelidade de impressão normalmente caracteriza a geometria externa (por exemplo, altura, largura e comprimento) e a estrutura interna (por exemplo, tamanho de poro, porosidade e ângulo de impressão) de *scaffolds* 3D. Como a avaliação do filamento, a geometria externa é medida com base na inspeção visual-microscópica, e a fidelidade da impressão é avaliada de acordo com a comparação do tamanho e forma entre as estruturas impressas e seus projetos CAD (GAO et al., 2019; SOLTAN et al., 2019).



Angulo da camada e tamanho dos poros

Figura 2.21. Parâmetros geométricos envolvidos na avaliação da fidelidade da bioimpressão 3D. Adaptado de (THEUS et al., 2020).

Habib et al., (2018) propuseram outra série de testes para avaliar e quantificar a capacidade de impressão das tintas extrudadas. A formação, fusão e colapso de filamento permitiram avaliar a taxa de difusão (taxa de espalhamento do material) (Dfr) e a capacidade de impressão (Pr) e a fidelidade de forma. Matematicamente, a capacidade de impressão (Pr) foi definida como $Pr = \frac{L^2}{16A}$, onde L é o perímetro do poro e A é a área teórica. Valores de Pr < 1 indicam baixa fidelidade com espalhamento e cantos curvos e grandes. Conforme Pr se aproxima de 1, a impressão "corresponde exatamente ao modelo", com ângulos precisos, impressões suaves e deposição exata de material (Figura 2.22a).

Outro fator importante para avaliar a capacidade de impressão é a taxa de difusão do filamento definida como $Dfr = \frac{A_t - A_a}{A_t} * 100$, onde A_t e A_a são as áreas do modelo e atual do *scaffolds*, respectivamente. Uma taxa de difusão de 0 indica uma deposição do material sem escoamento do material. Em valores de 100% o material não apresenta poros devido ao escoamento do material (HABIB et al., 2018).

Definições de parâmetros que quantificam a fidelidade de impressão é de grande importância para a avaliação da qualidade dimensional de estruturas obtidos por bioimpressão. No entanto, ainda não existem protocolos definidos para avaliar a capacidade de impressão que integre e relacione todos os parâmetros e considerações durante e após da impressão dos biomateriais (NAGHIEH et al., 2020).

2.6.2 Estabilidade mecânica e elasticidade

O uso de hidrogéis em aplicações na engenharia tecidual requer estabilidade mecânica similar a dos tecidos de organismos vivos (MUIZNIEKS; KEELEY, 2013; PAWLACZYK; LELONKIEWICZ; WIECZOROWSKI, 2013). A estabilidade mecânica dos géis impressos permite quantificar a capacidade das tintas em resistir à deformação. Assim testes de força de compressão são realizados nas amostras reticuladas para calcular a força máxima que o material aguenta antes de se deformar (Figura 2.22b).

Nos processos de impressão as tintas são depositadas camada por camada tendo-se que aderir umas às outras para formar uma estrutura mecanicamente rígida. Quando não se tem uma aderência entre as camadas defeitos na estrutura são observados, aumentando a probabilidade de se apresentar falhas estruturais e propagação de trincas no material (MUIZNIEKS; KEELEY, 2013).

2.6.3 Intumescimento dos scaffolds

Uma vez que a tinta é reticulada e aplicada em um local implantado ou em meio de cultura de células, ocorre o intumescimento da estrutura (DEO et al., 2020). Esta característica dos hidrogéis varia de acordo com o tipo de reticulação (física ou química) e a interação do hidrogel com o meio onde está submerso. O intumescimento pode influenciar diretamente na estabilidade estrutural e variações dimensionais das amostras impressas (JOHNSON; BEEBE; CRONE, 2004). Assim, a caracterização do intumescimento impressos é muito importante para a compreensão de seu comportamento *in vivo* (DEO et al., 2020) (Figura 2.22c).



Figura 2.22: Considerações de pós-impressão. (a) A análise óptica da imagem. (b) A análise mecânica compressiva. (c) A análise de intumescimento. Adaptado de (DEO et al., 2020).

3 INFLUÊNCIA DAS SOLUÇÕES DE CARBOXIMETILCELULOSE NAS PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE DISPERSÕES DE LAPONITA

Neste capítulo, o comportamento reológico da carboximetilcelulose (CMC), Laponita e dispersões de CMC/Laponita em água foram estudadas. Foi observado que as propriedades reológicas das dispersões foram influenciadas por interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre os grupos silanol (Si-O) da Laponita e hidroxila (-OH) do CMC. Verificou-se que o efeito do comportamento reológico da Laponita é fortemente afetado pela concentração de CMC, resultando em géis fracos ou fortes, conforme indicou os ensaios oscilatórios. Os géis de CMC/Laponita apresentaram forte pseudoplasticidade e tixotropia devido a rearranjos estruturais quando submetidos a tensões de cisalhamento. Finalmente, os testes de varredura de tempo revelaram que o envelhecimento da Laponita foi inibido pela adição de CMC.

3.1 Introdução

A adição de polímeros em suspensões de argila, resultando em materiais coloidais com propriedades reológicas específicas, tem encontrado aplicações biomédicas em áreas como bioimpressão e géis injetáveis para liberação controlada de fármacos e regeneração tecidual (AHLFELD et al., 2017; CHIMENE; ALGE; GAHARWAR, 2015; GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSSEINI, 2014). Sistemas coloidais de biomateriais modificados por nanoengenharia, como carboximetilcelulose e Laponita, têm encontrado interesse em aplicações biomédicas devido ao alto teor de água e biocompatibilidade.

A Laponita é uma esmectita trioctaédrica com a fórmula empírica Na^{+0,7}[(Mg_{5,5}Li_{0,3}) Si₈O₂₀ (OH) 4] ^{-0.7}, geometria em forma de disco e tamanho de 30-50 nm de diâmetro e 1-2 nm de espessura (GAHARWAR et al., 2019; RUZICKA; ZACCARELLI, 2011b; XAVIER et al., 2015). A Laponita é amplamente utilizada como um modificador reológico em vários produtos (BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS, 2014). Quando dispersos em água, os íons de sódio são liberados, criando um desequilíbrio de carga, dando origem a cargas permanentes negativas e positivas, respectivamente, na superfície e borda das partículas em pH \leq 11. Nesse processo, as plaquetas sofrem um rearranjo físico ou "envelhecimento" ao longo do tempo, que depende da concentração de Laponita. Outros fatores externos, como temperatura, sais e concentrações

iônicas também influenciam significativamente o processo de envelhecimento da solução de Laponita (DÁVILA; D'ÁVILA, 2017; GAHARWAR et al., 2019; MONGONDRY; TASSIN; NICOLAI, 2005; NELSON; COSGROVE, 2004b; RUZICKA; ZACCARELLI, 2011b).

Dependendo da concentração de Laponita, os arranjos internos da estrutura podem resultar em dispersões de baixa viscosidade, géis coloidais ou vidros *Wigner* durante o processo de hidratação (RUZICKA; ZACCARELLI, 2011b). A Laponita até 2,0% em massa forma um líquido isotrópico com as plaquetas totalmente esfoliadas sem interagir umas com as outras. Enquanto em concentrações superiores a 3,0% em massa, géis nemáticos são formados por interações eletrostáticas devido ao movimento térmico aleatório das plaquetas e distribuição de cargas, criando uma estrutura de "castelo de cartas". Técnicas como espalhamento de luz dinâmico, espalhamento de nêutrons de baixo ângulo, espalhamento de raios-x e reologia tornaram possível o estudo das interações de Laponita e propriedades macroscópicas (GAHARWAR et al., 2019; MONGONDRY; TASSIN; NICOLAI, 2005; RUZICKA; ZACCARELLI, 2011b).

Ao adicionar polímeros em dispersões de Laponita, o envelhecimento e as propriedades reológicas do sistema são modificadas, tornando o estudo da interação entre a Laponita e as cadeias de polímero interessante devido à sua complexidade (GAHARWAR et al., 2019; PEAK et al., 2018). Assim, uma ampla gama de polímeros foi combinada com Laponita para obter géis nanocompósitos para aplicações biomédicas, como poli (etilenoglicol / óxido) (PEG / PEO) (NELSON; COSGROVE, 2004b; PEAK et al., 2018; SCHMIDT; NAKATANI; HAN, 2002), Pluronic (WU et al., 2011), gelatina (PAWAR; BOHIDAR, 2009b) e k-carrageenan (kCA) (THAKUR et al., 2016). A carboximetilcelulose (CMC) é um polissacarídeo natural derivado da celulose de alta massa molar, quando associado com algumas suspensões de argila, as interações polímero-partícula promovem fortes efeitos nas propriedades reológicas como aumento da viscosidade e Gelificação (OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, o CMC é um biopolímero aniônico com alguns grupos hidroxila substituídos por grupos carboxila, o que proporciona ligações de hidrogênio, servindo como uma fase de adsorção de carga (BARBUCCI; MAGNANI; CONSUMI, 2000). Algumas das principais aplicações deste polímero é na indústria farmacêuticas, cosméticas, alimentícias e atualmente em tecnologias de impressão tridimensional (HAN; WANG, 2017; MALLAKPOUR; TUKHANI; HUSSAIN, 2021; OLIVEIRA et al., 2015). A reologia do CMC é influenciada pela massa molar do polímero, concentração e grau de substituição (DS), conforme relatado na literatura (BENCHABANE; BEKKOUR, 2008; EDALI; ESMAIL; VATISTAS, 2001; YANG; ZHU, 2007).

Ao misturar soluções de polímero com plaquetas de Laponita, ocorrem interações eletrostáticas de partículas de polímero e ligações de hidrogênio (RUZICKA; ZACCARELLI, 2011b; THOMPSON; BUTTERWORTH, 1992). Cadeias de polímero de baixa massa molar podem ser fisicamente adsorvidas na superfície da nanoargila, enquanto que para polímeros de alta massa molar, as interações de finais de cadeia formam uma rede fisicamente reticulada (GAHARWAR et al., 2019; NEL et al., 2009b). Essa adsorção física resulta em géis com uma estrutura de "castelo de cartas" que destrói e reconstrói sob tensão, resultando em comportamento viscoso pseudoplástico (WANG et al., 2010). Essas interações eletrostáticas são reversíveis e podem ser quebradas e reformadas pela aplicação de tensões mecânicas e posterior relaxamento do sistema (GAHARWAR et al., 2019).

Assim, um sistema coloidal de pseudoplasticidade e comportamento viscoelástico de tipo sólido pode ser obtido adicionando CMC em dispersões aquosas de Laponita, o que pode ser interessante para processos de manufatura aditiva, como impressão de gel por extrusão. São poucos os estudos sobre o comportamento reológico de dispersões de CMC/Laponita relatados na literatura (A.S PEREIRA; F.T PINHO, 2002; ESCUDIER et al., 1995; TARHINI; JARNY; TEXIER, 2017; TIWARI et al., 2020). Assim, neste trabalho, o objetivo foi estudar as propriedades reológicas de diferentes dispersões aquosas de CMC/Laponita e correlacionar o comportamento reológico com possíveis mecanismos de interação coloidal.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Preparação dos géis

Os materiais usados nesta pesquisa foram carboximetilcelulose de Sódio (CMC- M_w = 250.000 g.mol⁻¹, DS = 0,7, Sigma-Aldrich, Saint Louis-MO, EUA) e Laponita (Laponita XLG, Southern Clay Products, Inc., EUA). Soluções de CMC com concentrações de 0,25 a 4,0% em massa e dispersões de Laponita de 0,5 a 6% em massa foram dispersas em água deionizada (DI)

com pH 7,0 utilizando um misturador de vórtice por 15 minutos, seguido de agitação magnética por 8 horas a 23° C.

As misturas de CMC e Laponita foram preparadas adicionando diferentes concentrações de CMC (0,25 a 4,0% em massa) em 2,0% em massa de Laponita. Ambas as misturas foram dissolvidas em água DI sob agitação magnética por 15 minutos seguido de uma misturada com espátula até obter uma dispersão homogênea. As amostras foram armazenadas por 16 h a 23° C para a obtenção de dispersões estáveis.

3.2.2 Potencial Zeta

As medições de potencial Zeta foram realizadas em dispersão diluída de Laponita e misturas de CMC/Laponita. As amostras foram previamente diluídas (1:30) em água DI e agitadas em vórtice por 5 minutos. As medições do potencial Zeta foram realizadas em um instrumento *Malvern Zeta sizer Nano-S* com um ângulo de detecção de 173°. Todas as análises foram conduzidas em triplicata a 25° C.

3.2.3 Espalhamento Dinâmico de Luz

A distribuição de tamanho de partículas na dispersão de Laponita e misturas de CMC/Laponita foram realizados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) (Malvern Zeta Sizer Nano-S). Os diâmetros hidrodinâmicos médios foram obtidos por:

$$Z_{average} = \frac{\sum nidi^3}{\sum nidi^2}$$
(3.1)

onde n é o número da partícula e d é o diâmetro da partícula e i é o índice. Todas as análises foram realizadas em triplicata a 25° C.

3.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Ensaios de FTIR foram realizados em amostras liofilizadas de CMC, Laponita e CMC/Laponita, utilizando um espectrômetro (Thermo Scientific- Charis Technologies). As amostras foram misturadas com KBr na proporção de massa de 1: 100 (amostra: KBr), e a mistura foi comprimida (2,5 MPa por 2 min) para formar um pellet transparente, que foi

analisado usando o método de transmissão (4000-750 cm⁻¹, 16 varreduras e resolução de 8 cm⁻¹).

3.2.5 Caracterização reológica

As medições reológicas foram realizadas em um reômetro modular compacto Anton Paar MCR-102 com geometria cone-placa de 50 mm de diâmetro, ângulo de cone de 0,9815° e truncamento de 0,97 μ m. Antes de cada teste, um pré-cisalhamento constante de 200 s⁻¹ foi aplicado por 300 s para eliminar os efeitos de memória e rejuvenescer as amostras. Silicone foi usado nas bordas da amostra para evitar a evaporação da água. As medições em regime permanente foram realizadas em taxas de cisalhamento variando de 0,01 a 1000 s⁻¹. A viscosidade de cisalhamento em estado estacionário foi ajustada pelo modelo de viscosidade de Cross (Equação 3.2) para soluções de CMC, e o modelo Ostwald –de Waele (Equação 3.3) para dispersões de Laponita e CMC/Laponita:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^n}$$
(3.2)

e,

$$\eta(\dot{\gamma}) = K \dot{\gamma}^{n-1} , \qquad (3.3)$$

onde η_{∞} é a viscosidade de cisalhamento infinita, η_0 a viscosidade de cisalhamento zero, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, $\dot{\gamma}_c$ é a taxa de cisalhamento crítica, *K* é a consistência e é o índice da lei de potência. Quando n = 1 obtemos uma viscosidade newtoniana; quando n < 1 e n > 1 obtemos comportamento não newtoniano pseudoplástico e dilatante, respectivamente.

Varreduras de tensão de cisalhamento oscilatória foram realizadas na faixa de 10^{-1} a 10^{3} Pa para determinar a tensão de escoamento. Os testes de varredura de frequência foram realizados dentro da região de viscoelasticidade linear ($\gamma_0 = 1\%$) na faixa de frequência de 0,1 a 240 s⁻¹. O equipamento não mediu os valores de *G*' e *G*'' inferiores a 10^{-2} Pa devido à fluidez da solução em concentrações inferiores a 1% em massa de CMC.

O comportamento tixotrópico foi analisado por testes de *loop* de histerese e testes de tixotropia de três intervalos (3ITT). As áreas dos *loops* de histerese foram obtidas com um

aumento contínuo da taxa de cisalhamento de 2 a 100 s⁻¹ (curva para cima) durante 165 s, mantida por 50 s, seguida de uma redução gradual para 2 s⁻¹. Para o ensaio de 3ITT, a viscosidade foi medida em três intervalos de taxa de cisalhamento em ordem sequencial: 1 s⁻¹ (25 s), 100 s⁻¹ (50 s) e 1 s⁻¹ (250 s). A porcentagem de recuperação da viscosidade é dada pela relação entre a viscosidade no tempo de recuperação $t (\eta_{trec})$ e a viscosidade inicial no intervalo de descanso (η_i) .

Testes de varredura de tempo foram realizados para um tempo total de 1000 s, em uma frequência de 10 rad.s⁻¹, visando avaliar a evolução do envelhecimento.

Todos os testes foram realizados em triplicata a 25º C e as amostras centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos antes das medições para eliminação de bolhas de ar.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Formação da Estrutura

Usamos o potencial Zeta (ZP) para analisar a estabilidade das amostras CMC/Laponita com base na carga superficial. A Figura 3.1a mostra os resultados do potencial Zeta para CMC/Laponita. Notamos que o ZP foi negativo na faixa que indica dispersões estáveis para todas as amostras estudadas. Para dispersões de Laponita, o ZP médio foi -41,25 \pm 5,92 mV com pH neutro devido à dissociação do Na⁺. Na presença de CMC, a magnitude negativa aumentou para cerca de -50 mV, o que pode estar associado à presença de cargas aniônicas e à adsorção de cadeias de CMC nas superfícies carregadas negativamente da Laponita. Além disso, esse aumento pode ser devido às interações eletrostáticas que ocorrem entre os grupos hidroxila (OH-) do CMC e o Silanol (Si-O) da Laponita (XU; ERDEM; EISER, 2020). Além disso, todas as amostras têm um pH \leq 11, sugerindo que as cadeias poliméricas aniônicas estão sendo adsorvidas na borda carregada positivamente da Laponita (Tabela 3.1) (DÁVILA; D'ÁVILA, 2017).



Figura 3.1: (a) Potencial Zeta e (b) diâmetro hidrodinâmico (DH) do sistema CMC/Laponita em função da concentração de CMC com 2,0% em massa de Laponita.

C _L (% massa)	0,25 CMC	0,50 CMC	0,75 CMC	1,0 CMC	2,0 CMC	3,0 CMC	4,0 CMC
2	9,853	9,883	9,820	9,843	9,820	9,800	9,710

Tabela 3.1: Valores de pH para soluções CMC/Laponita.

O diâmetro hidrodinâmico médio das misturas CMC/Laponita obtidas por DLS estão apresentados na Figura 3.1b. Esta técnica permite determinar o tamanho das nanopartículas e macromoléculas em suspensões ou soluções diluídas através do espalhamento da luz devido ao movimento browniano das partículas/macromoléculas. Notamos que o diâmetro hidrodinâmico médio das misturas aumenta com a adição de CMC, o que pode estar relacionado à adsorção de cadeias poliméricas nas plaquetas de Laponita. Em baixas concentrações de CMC, géis fracos podem ser formados devido a interações eletrostáticas. O aumento nas concentrações de CMC leva à aproximação dos finais da cadeia polimérica levando a uma rede fisicamente reticulada, aumentando quase três vezes o diâmetro hidrodinâmico em comparação com as proporções 8: 8 a 8:12.

A Figura 3.2 mostra os espectros de FTIR de CMC e pó de Laponita e amostras húmidas do sistema CMC/Laponita. No caso da Laponita, os picos em 1634 cm⁻¹ estão associados à

flexão de H-OH, os picos em 962 cm⁻¹ foram atribuídos ao alongamento da ligação Si-O na superfície e os picos em 647 cm⁻¹ estão associados à vibração de Mg-O, conforme relatado anteriormente na literatura (CAI et al., 2016).



Figura 3.2: Espectros FTIR de soluções CMC, dispersões de Laponita e dispersões de CMC/Laponita com 2% em massa de Laponita na faixa de 4000 cm⁻¹-2000 cm⁻¹ e 2000 cm⁻¹-750 cm⁻¹.

O espectro CMC exibiu cinco picos característicos em 3507, 2934, 1592, 1408 e 1322 cm⁻¹. A banda de transmissão típica de 3507 cm⁻¹ é atribuída à vibração de alongamento -OH, correspondendo às ligações de hidrogênio intermoleculares dentro da cadeia CMC. O pico de 2934 cm⁻¹ corresponde ao alongamento C-H associado aos átomos de hidrogênio do anel de metano. A banda de 1592 cm⁻¹ e 1408 cm⁻¹ corresponde às vibrações de alongamento C = O simétricas e assimétricas dos íons carboxilato, respectivamente. O pico de 1322 cm⁻¹ é atribuído às vibrações de alongamento C-O. Finalmente, as bandas de 1105 e 1020 cm⁻¹ são características do alongamento C-O na cadeia principal de polissacarídeos (CHAI; ISA, 2013; SU et al., 2010; ZAÏDI et al., 2011).

Para todos os espectros CMC/Laponita, observamos picos característicos de ambos, Laponita (962 cm⁻¹) e CMC (3525 cm⁻¹), indicando interações entre eles. No entanto, a largura da banda O-H diminuiu e a posição do pico mudou de 3507 para 3404 cm⁻¹ em comparação com o CMC puro; e a posição do pico de alongamento Si-O mudou de 962 para 1002 cm⁻¹. Esses resultados sugerem uma fraca ligação de hidrogênio entre os grupos Silanol da Laponita (Si-O) e hidroxila do CMC (-OH) e uma redução da extensão das ligações de hidrogênio no CMC puro (XU; ERDEM; EISER, 2020).

3.3.2 Comportamento reológico de soluções CMC e dispersões de Laponita

A Figura 3.3 mostra as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento e a variação dos módulos de armazenamento e perda com o aumento da frequência para soluções CMC. Na Figura 3.3a, observamos um comportamento pseudoplastico bem definido em altas taxas de cisalhamento em concentrações de CMC acima de 0,75% em massa e platô Newtoniano em taxas de cisalhamento mais baixas. Em contraste, observamos um comportamento quase Newtoniano em todas as taxas de cisalhamento para concentrações de CMC abaixo de 0,75% em massa. A transição entre comportamento Newtoniano a pseudoplastico está relacionada as ligações de hidrogênio intermoleculares entre cadeias de celulose, conforme relatado por Peak e colaboradores, (2018).



Figura 3.3: (a) Curvas de viscosidade em estado estacionário para várias concentrações de CMC em solução, a linha sólida corresponde ao ajuste do modelo cruzado para CMC e os símbolos abertos correspondem aos dados experimentais (Cp é a concentração do polimero). (b) Dependência da viscosidade específica para soluções CMC. (c) Dependência de G' (símbolos sólidos) e G'' (símbolos abertos) em função da frequência angular (ω) para soluções CMC.

Os dados de viscosidade em regime permanente foram ajustados usando o modelo de viscosidade de Cross (Equação 3.2), e os parâmetros estão apresentados na Tabela 3.2. Observamos uma dependência da viscosidade nas concentrações de CMC, onde um aumento drástico nas concentrações de CMC de 1,0 a 2,0% em massa foi observado. Este aumento foi de quase 16 vezes o valor da viscosidade a 1,0% em massa (Tabela 3.2). O aumento significativo da viscosidade está correlacionado com os regimes distintos da solução. Conforme observado na Figura 3.3b, a faixa de soluções de CMC estudadas possui dois regimes diferentes, evidenciados pela mudança da inclinação da curva de 1,5 para 3,75. De acordo com a lei de escala da solução de polieletrólitos, $\eta_s \sim C_p^{3/2}$ corresponde à solução semi-diluída emaranhada e $\eta_s \sim C_p^{15/4}$, à solução concentrada emaranhada (WU et al., 2009). A transição do regime semi-diluído emaranhado para o regime concentrado deve-se ao aumento das interações intermoleculares devido a maior proximidade entre as cadeias poliméricas.

Com base no ajuste de modelo de Cross, fizemos uma curva mestre com 1,0% em massa de CMC como referência (Figura 3.4) observamos que em todas as concentrações, a superposição das curvas indica que o cisalhamento é um mecanismo comum que rege a viscosidade CMC e se ajusta ao modelo de viscosidade cruzada. O comportamento de cisalhamento ocorre devido ao desemaranhamento e orientação das cadeias poliméricas na direção do escoamento (BENCHABANE; BEKKOUR, 2008; CLASEN; KULICKE, 2001; DUNSTAN; HILL; WEI, 2004).

Experimental									
c _p (% massa)	0,25	0,5 0,75		1,0	2,0 3,0		4,0		
a _x	0,463	0,312	0,661	1,0	91,534	369,354	329,427		
a_y	8,094	3,792 1,567		1,0	0,058	0,011	0,002		
Ajuste									
c _p (% massa)	n	η_0 (Pa,s)		η_{∞} (Pa,s)	$\dot{\gamma}_c(s^{-1})$		R^2		
0,25	0,81	0,011		0,005	486,3		0,99		
0,50	0,66	0,024		0,005	719,3		0,99		
0,75	0,68	0,06		0	340,3		0,99		
1,0	0,59	0,09		0	224,9		0,99		
2,0	0,38	1,55		0	2,46		0,99		
3,0	0,44	8,04		0	0,61		0,99		
4,0	0,83	48,11		0	0,68		0 0,68 0,99		0,99
Master curve	0,51	0,09		0	395,1		1,00		

Tabela 3.2: Fatores de deslocamento para curva mestre de viscosidade experimental e parâmetros de ajuste para o modelo de Cross para várias soluções CMC a 25 °C.

A Figura 3.3c mostra os resultados de cisalhamento oscilatório de pequena amplitude (SAOS) para soluções CMC. Observamos que G'' > G' nas frequências baixas enquanto nas frequências mais altas G' > G'', indicando uma redução das propriedades viscosas em favor das propriedades elásticas devido aos emaranhamentos de cadeias, que são continuamente destruídos e reformados, restringindo a mobilidade. Além disso, com o aumento da concentração, a diferença entre $G' \in G''$ é menor, o que indica uma tendência para gelificar com o aumento da concentração.



Figura 3.4: Curva mestre de viscosidade CMC (concentração de referência de 1,0% em massa) e fatores de deslocamento horizontal (a_x) e vertical (a_y) vs, Concentração de CMC.

A Figura 3.5 mostra as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as dispersões de Laponita. A viscosidade de cisalhamento em regime permanente de dispersões de Laponita apresentou aumento na viscosidade e no cisalhamento pelo aumento da concentração de nanopartículas, como mostrado na Figura 3.5a. Concentrações acima de 2,0% em massa apresentaram pseudoplasticidade mais acentuada quando comparadas com concentrações menores.



Figura 3.5: (a) curvas de viscosidade em estado estacionário para várias concentrações de Laponita (C_L é a concentração da Laponita) e (b) dependência de G' (símbolos sólidos) e G'' (símbolos abertos) em função da frequência angular (ω) para dispersões de laponita,

O modelo de viscosidade Ostwald- de Waele foi utilizado para descrever o comportamento da viscosidade em função da taxa de cisalhamento, onde os parâmetros ajustados estão mostrados na Tabela 3.3. Para concentrações de Laponita acima de 2,0% em massa, as dispersões são altamente viscosas e pseudoplásticas, pois formam uma estrutura de castelo de cartas. Essa estrutura é formada devido a interações eletrostáticas, levando a um aumento significativo na viscosidade aparente (m) e no comportamento de cisalhamento (n) (GAHARWAR et al., 2019). Por outro lado, para a concentração de 2,0% em massa, as nanopartículas estão totalmente esfoliadas, mas sem interações significativas entre elas, resultando em baixa viscosidade e comportamento próximo ao Newtoniano. Ao comparar os valores de m de 2,0 a 3,0% em massa, notamos um aumento de 303 vezes. Ainda, ao comparar de 3,0 a 4,0% em massa, esse aumento é de apenas 22 vezes, evidenciando a formação da estrutura do castelo de cartas em concentrações superiores a 2,0% em massa de Laponita.

Parâmetro	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0
m	0,0045	1,368	31,199	76,339	179,33
n	0,950	0,426	0,082	0,051	0,016
R ²	0,963	0,995	0,999	0,999	0,999

Tabela 3.3: Parâmetros de ajuste do modelo de Ostwald-de Waele para dispersão de Laponita.

Os testes de varredura de frequência de dispersões de Laponita estão mostrados na Figura 3.5b. Para concentrações de 3,0% em massa, o comportamento do tipo líquido é dominante devido à esfoliação das nanopartículas e às fracas interações entre elas. Por outro lado, acima de 3,0% em massa, o comportamento do tipo sólido (G'' > G') é observado para todas as faixas de frequência. Além disso, os módulos de armazenamento e perda são quase independentes da frequência, o que é característico dos géis físicos. Esse comportamento se deve à baixa mobilidade das partículas e maiores interações eletrostáticas, que resultam na formação da estrutura de castelo de cartas, induzindo a gelificação física.

3.3.3 Comportamento reológico de soluções CMC em dispersões de Laponita

A Figura 3.6 mostra gráficos de viscosidade de cisalhamento estável de dispersões de CMC/Laponita, variando as concentrações de CMC nos regimes semi-diluído e concentrado, com uma concentração fixa de Laponita de 2,0% em massa.



Figura 3.6: (a) Curvas de viscosidade em estado estacionário para misturas de CMC/Laponita contendo 2,0% em massa de Laponita com aumento gradual em carboximetilcelulose (CMC) (Cp é a concentração do polimero) e (b) viscosidade de baixa taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma} = 1 \text{ s}^{-1}$) em função da concentração de CMC.

Na Figura 3.6a, observamos que a adição de soluções de CMC no regime semidiluído (0,25, 0,5 e 0,75% em massa) na dispersão de Laponita a 2,0% em massa resulta em aumento de viscosidade na ordem de 5×10^3 , 12×10^3 e 16×10^3 vezes , respectivamente. Em comparação, a adição de CMC no regime emaranhado a 4,0% em massa aumentou 91×10^3 vezes o valor da viscosidade se compararmos a viscosidade aparente (*m*) obtida pelo modelo de viscosidade *Oswald-de Waele* (Tabela 3.4). Esses resultados mostram que a ordem de magnitude do aumento na viscosidade não é determinada pelo regime de concentração de CMC (Figura 3.6b). O aumento da viscosidade pode ser devido à adsorção de cadeias de CMC na superfície de argila, formando pontos de adsorção em partículas de argila por meio de ligações de hidrogênio (XU; ERDEM; EISER, 2020).

Considerando a pseudoplasticidade, uma diminuição de 24 vezes no valor n foi observada pela adição de apenas 0,25% em massa de CMC, onde um forte comportamento pseudoplástico

(n = 0,039) foi observado ao invés de um comportamento quase newtoniano para 2,0% em massa de dispersão de Laponita (n = 0,92). Esta forte diminuição em *n* foi observada para todas as faixas de concentração de CMC, que pode ser observadas na Tabela 3.4. Como visto anteriormente, o comportamento pseudoplástico está associado ao desemaranhamento das cadeias de polímero e alinhamento junto com as plaquetas de Laponita na direção do escoamento, à medida em que a taxa de cisalhamento aumenta, (SCHMIDT et al., 2002b).

Tabela 3.4: Parâmetros de ajuste do modelo Ostwald-de Waele para misturas CMC/Laponita.

Amostra	Parâmetro	0CMC	0,25CMC	0,5CMC	0,75CMC	1,0CMC	2,0CMC	3,0CMC	4,0CMC
2 % em	т	0,0048	26,577	61,136	80,39	98,874	180,22	287,66	440,54
massa de	n	0,916	0,039	0,043	0,079	0,082	0,109	0,109	0,088
Laponita	<i>R</i> ²	0,851	0,993	0,995	0,993	0,994	0,994	0,992	0,991

A Figura 3.7a mostra a tensão de escoamento das misturas CMC/Laponita medidas através de ensaios oscilatórios. A tensão de escoamento é definida como a tensão que deve ser aplicada à mistura antes que ela comece a fluir, deformando-se elasticamente abaixo do valor da tensão de escoamento e fluindo como um líquido acima dele. Uma forma de medir a tensão de escoamento é a partir de uma varredura de amplitude em que a queda inicial em G' é uma medida do ponto de escoamento, representando o início do regime viscoelástico não-linear (RIBEIRO et al., 2018). Para a concentração de CMC de 0,25% em massa, o limite de escoamento de 29 ± 2 Pa foi observado. Quanto a concentração de CMC foi aumentada para 1,0 e 4,0% em massa, um aumento de 2,55 e 7,93 vezes neste valor pode ser observado, respectivamente (Figura 3.7b). Este aumento na tensão de escoamento com a adição de CMC indica maior tensão de cisalhamento necessária para iniciar o escoamento.



Figura 3.7: (a) Modulo de armazenamento (G') como função da tensão de cisalhamento usando testes de varreduras de tensão (Cp é a concentração do polimero) e (b) quantificação da tensão de escoamento (*Yield Point*).

A análise das propriedades viscoelásticas lineares de CMC/Laponita é mostrada na Figura 3.8. Como visto anteriormente, as soluções de CMC em todas as faixas de concentração e dispersões de Laponita de 3,0% em massa apresentaram comportamento predominantemente líquido. No entanto, a adição de apenas 0,25% em massa de CMC na dispersão de Laponita causou a predominância das propriedades elásticas (G' > G'') em todas as faixas de frequência. Aumentando a concentração de CMC, a magnitude de ambos os módulos aumentou e G' tornouse quase independente da frequência angular (Figura 3.8a), que é característica de géis com fortes ligações físicas. A adição de CMC nas dispersões de Laponita aumentou o tempo de relaxação e os módulos, que foram atribuídos à adsorção e ponte entre as cadeias de CMC e as plaquetas de Laponita. Todos os géis obtidos se apresentaram homogêneos e transparentes (Figura 3.8c). Para facilitar a visualização, cada composição foi misturada com corante vermelho. O corante não alterou as propiedades reologicas das soluções e dispersões.

A Figura 3.8b mostra o fator de amortecimento tan $\delta = G''/G'$ em função da frequência. O fator de amortecimento indica a força de um gel. Como mostrado, em todas as frequências, o comportamento do tipo sólido é dominante (tan $\delta < 1$). Além disso, até 0,75, o fator de amortecimento diminui, evidenciando a força do gel, porém com o aumento da concentração de CMC, o efeito modificador reológico da Laponita foi inibido, levando a um aumento nos valores do fator de amortecimento. Valores de tan $\delta < 0,1$ indicam um comportamento de gel
forte, enquanto tan $\delta > 0,1$ indica um gel fraco (XIN et al., 2004); portanto, em baixas frequências, obtivemos géis fortes em todas as concentrações e uma transição para géis fracos com altas frequências.



Figura 3.8: Dependência de G' (símbolos sólidos) (a) e o (b) fator de amortecimento (tan (δ)) da frequência angular (ω) para misturas CMC/Laponita com 2% em massa de Laponita em diferentes concentrações de CMC (Cp é a concentraçõe do polimero), (c) Fotografia das dispersões de CMC/Laponita com 2% em massa de Laponita (i) e concentrações de CMC/Laponita de: 0,25-2 (ii); 0,5-2 (iii); 0,75-2 (v); 1-2 (v); 2-2 (vi); 3-2 (vii) e 4-2 (viii).

Para investigar a tixotropia de misturas CMC/Laponita, realizamos dois tipos de experimentos: histerese e 3ITT. Esses testes permitem determinar a energia absorvida durante a deformação e a porcentagem de viscosidade recuperada após o cisalhamento, respectivamente. A Figura 3.9a mostra os ciclos ascendentes e descendentes aplicados no teste de histerese. A área delimitada entre as curvas pode ser considerada uma estimativa do grau de tixotropia e da energia absorvida pela rede durante a deformação. Os ciclos ascendentes e

descendentes se sobrepõem às dispersões de Laponita puras e a área de histerese não é observada. Assim, a adição de CMC gerou uma área de loop de histerese durante o cisalhamento, indicando um aumento significativo na quantidade de energia absorvida pelas redes CMC/Laponita durante o tempo de teste.

A Figura 3.9b resume a quantidade de energia absorvida durante o cisalhamento para dispersões de CMC/Laponita. A adição de apenas 0,25% em massa de CMC em 2,0% em massa de Laponita aumentou 6,5 vezes a energia absorvida, enquanto 4,0% em massa de CMC resultou em um aumento de 98 vezes quando comparado ao sistema sem CMC. Notamos que a energia absorvida aumentou com o aumento da concentração de CMC, principalmente para concentrações superiores a 1,0% em massa. O aumento na área do *loop* de histerese é um indicador das propriedades tixotrópicas das misturas. Além disso, esse aumento está relacionado à maior energia necessária para romper a ponte na interface polímero-plaquetas, induzindo o desemaranhamento e alinhamento das cadeias poliméricas por cisalhamento. Vários autores relataram esse fenômeno para diferentes soluções de polímero (BENCHABANE; BEKKOUR, 2008; MAO; CHEN, 2006) e esse efeito com adição de Laponita (GAHARWAR et al., 2011; SCHEXNAILDER et al., 2009; XAVIER et al., 2015),



Figura 3.9: Tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para misturas CMC/Laponita contendo: (a) 2,0% em massa de Laponita (Cp é a concentração do polimero) e (b) área do loop de histerese para recuperação da estrutura.

A Figura 3.10 mostra a recuperação da viscosidade no ensaio de 3ITT. Em todas as concentrações de CMC/Laponita estudadas, a recuperação da viscosidade em curtos tempos após o cisalhamento é observada (Figura 3.10a), indicando rápida quebra e reconstrução da estrutura. Ao representar graficamente a dependência da recuperação da viscosidade pela concentração de CMC em momentos diferentes, observamos que a concentração de CMC inferior a 2,0% em massa recupera parcialmente a viscosidade em um curto intervalo de tempo (Figura 3.10b). Nessas concentrações, quando o cisalhamento é removido, a recuperação da viscosidade ocorre quase que instantaneamente, o que estaria associado à regeneração da estrutura do castelo de cartas e das propriedades elásticas armazenadas pelas cadeias CMC (DÁVILA; D'ÁVILA, 2019). Em contraste, em concentrações de CMC acima de 2,0% em massa, a recuperação da viscosidade diminuiu. A remoção das cadeias de polímero adsorvidas às nanopartículas por cisalhamento pode não adsorver novamente à mesma partícula anterior ao aumento do cisalhamento, mas, em vez disso, pode estar adosrvida a plaquetas vizinhas, resultando em uma baixa porcentagem de recuperação (GAHARWAR et al., 2011). Portanto, a adição de CMC em dispersões de Laponita afeta o tempo e o grau de recuperação da viscosidade devido às interações entre as cadeias de CMC e as plaquetas de Laponita.



Figura 3.10: (a) Curvas de viscosidade em função do tempo para 3ITT, exibindo o comportamento tixotrópico das misturas CMC/Laponita (Cp é a concentração do polimero) e (b) recuperação da viscosidade percentual em função do tempo com 2,0% em massa de Laponita.

Finalmente, conforme mostrado na Figura 3.11, os testes de varredura de tempo foram realizados para estudar os efeitos da adição de CMC no envelhecimento de dispersões de Laponita. Obtivemos o módulo de armazenamento (G') em $\omega = 10$ rad.s⁻¹ em função do tempo. Podemos observar um aumento no módulo de armazenamento (G') em função do tempo para concentrações de CMC de até 0,75% em massa, indicando que as amostras sofrem envelhecimento devido à rápida adsorção e dessorção de CMC às partículas de Laponita. Por outro lado, em concentrações mais elevadas de polímero, a taxa de crescimento de G' diminui, indicando uma inibição no envelhecimento das amostras.



Figura 3.11: Evolução do envelhecimento: (a) dependência de G' (símbolos abertos) no tempo de espera (t_w) para frequências de 10 rad.s⁻¹ para diferentes composições de CMC e 2% em massa de Laponita (Cp é a concentração do polimero).

4 CAPACIDADE DE IMPRESSÃO DE GÉIS DE CARBOXIMETILCELULOSE/LAPONITA E RETICULAÇÃO PARA FORMAÇÃO DE HIDROGÉIS

Neste capítulo, a impressão por extrusão de dispersões de CMC/Laponita em água foi estudada com o objetivo de obter uma tinta com a formulação mais adequada. Assim, a impressão por extrusão de géis do sistema CMC/Laponita foi avaliada a partir do estudo das propriedades reológicas, parâmetros de impressão, formação, fusão e colapso de filamento, além de estudos de compressão e do intumescimento das tintas. Todas as misturas estudadas exibiram um comportamento pseudoplástico pronunciado. A formação de filamentos durante a impressão, áreas de colapso e boa capacidade de impressão foram observadas na tinta com concentração de 1 % em massa de CMC e de 4% em massa de Laponita. A tinta ótima foi definida em função das propriedades reológicas (viscosidade, tixotropia e viscoelasticidade) e da formação e fusão de filamentos impressos. Após definida a tinta ótima, a influência dos diferentes parâmetros de impressão foi estudada (velocidade de impressão, multiplicador de extrusão e altura de camada). Em seguida, os géis impressos foram reticulados com cloreto de cálcio (CaCl₂) e ácido cítrico. Testes de compressão permitiram avaliar o comportamento mecânico dos hidrogéis impressos. Finalmente, testes de intumescimento e citotoxicidade foram realizadas nos hidrogéis para avaliar sua possível aplicação na área de engenharia tecidual.

4.1 Introdução

A impressão tridimensional é uma técnica introduzida inicialmente em 1986 com o nome de estereolitografia ou prototipagem rápida, para gerar modelos sólidos tridimensionais. Essa técnica, também conhecida como manufatura aditiva (MA), permite a construção de objetos sólidos através da deposição de camadas de material (MURPHY; ATALA, 2014). Na área biomédica, um dos principais usos dessa tecnologia está na fabricação de *scaffolds* para aplicações em regeneração tecidual (EL-SHERBINY; YACOUB, 2013). Um *scaffold* é uma estrutura porosa tridimensional feita de biomateriais que serve temporariamente como estrutura de suporte para o crescimento e transporte de nutrientes para células isoladas (NICODEMUS; BRYANT, 2008). Tradicionalmente, as técnicas de impressão de jato de tinta, impressão

assistida por laser e impressão por extrusão são as técnicas mais utilizadas para essas aplicações (HABIB et al., 2018; MURPHY; SKARDAL; ATALA, 2013).

A impressão por extrusão é uma das técnicas mais promissoras para obtenção de *scaffolds* (DEO et al., 2020). Nos últimos anos, esta técnica tem sido utilizada para a impressão de *scaffolds* de hidrogéis, onde apresenta vantagens como baixo custo e versatilidade (NAGHIEH et al., 2020). Os hidrogéis são materiais adequados para uso como *scaffolds* devido à sua capacidade de formar e manter uma estrutura com integridade estrutural aceitável, além de mimetizar as propriedades naturais da matriz extracelular (ECM) (YOU et al., 2016).

Dentre os diferentes tipos de biomateriais que podem ser usados como hidrogéis estão polímeros naturais, como alginato de sódio, gelatina, colágeno, celulose (MOLDOVAN et al., 2017) e polímeros sintéticos, como policaprolactona (PCL), Polietilenoglicol (PEG), e ácido polilático (PLA) (CHANG et al., 2011). A carboximetilcelulose (CMC) é um polissacarídeo derivado da celulose de alta massa molar, solúvel em água, e utilizado como modificador de viscosidade (BENCHABANE; BEKKOUR, 2008). Em processos de impressão tridimensional, este polímero foi estudado junto com outros compostos para formar hidrogéis híbridos (MALLAKPOUR; TUKHANI; HUSSAIN, 2021). Sistemas como CMC-Alginato (HABIB et al., 2018) e CMC-Alginato- Montmorilonita (MMT) (HABIB; KHODA, 2019), demonstraram sua eficiência em processos de impressão e alta viabilidade celular quando usados como tintas em processos de bioimpressão.

A obtenção de *scaffolds* de hidrogéis por impressão por extrusão requer a formulação de géis poliméricos com propriedades mecânicas e reológicas adequadas para a impressão. Nesse contexto, destacam-se os hidrogéis nanocompósitos, que são associações de polímeros com nanopartículas, que permitem a obtenção de sistemas com propriedades adequadas para impressão. Esses sistemas são formados por reticulação física ou química por meio de interações entre redes poliméricas em soluções aquosas com nanopartículas inorgânicas incorporadas à matriz (GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSSEINI, 2014). As interações dos compostos permitem a solidificação do material após o processo de extrusão para suportar várias camadas sucessivas. Assim, a Laponita é um tipo de nanomaterial inorgânico com potencial uso para fins de engenharia tecidual entre as diferentes nanopartículas existentes (PEAK et al., 2018; SHEN et al., 2014).

A Laponita é uma argila de silicato de magnésio sintética, com formato de disco de dimensões 25 nm de diâmetro e 1 nm de espessura, usada como agente espessante na indústria de cosméticos (CARRETERO, 2002). Recentemente, foi reportado seu potencial em aplicações como biomaterial relacionado à propagação celular e osteogênese (GAHARWAR et al., 2019). Em suspensão aquosa com pH <11, as partículas de Laponita tem faces com carga negativa e bordas com carga positiva (SUN et al., 2012). Essas cargas promovem o arranjo das plaquetas por meio de interações eletrostáticas, formando um gel com comportamento reológico pseudoplástico (MONGONDRY; TASSIN; NICOLAI, 2005). Desta forma, a Laponita, associada a polímeros, resultam também em fortes interações entre cadeias poliméricas e nanopartículas, onde tais interações afetam consideravelmente o comportamento mecânico e reológico dos géis e hidrogéis (GAHARWAR et al., 2014, 2019). Trabalhos publicados na literatura reportaram que géis nanocompósitos de gelatina/carboximetilquitosana/Laponita (TAO et al., 2017), Laponita-alginato (DÁVILA; D'ÁVILA, 2019), Laponita-Alginato-Metilcelulose (AHLFELD et al., 2017) foram impressos por extrusão e apresentaram alta porcentagem de viabilidade celular. Neste trabalho, foi avaliada a capacidade de impressão por extrusão de uma nova tinta formada por CMC/Laponita. Com base na escolha precisa do tipo de biomaterial, uma avaliação da capacidade de impressão pode influenciar diretamente nas propriedades morfológicas e mecânicas da tinta a ser impressa. Um estudo adequado das condições operacionais e dos parâmetros de impressão antes, durante e depois da impressão reduzirá os defeitos na estrutura impressa e em sua funcionalidade. Assim, nos processos de extrusão, o material requer inicialmente uma baixa viscosidade que permite sua passagem pela agulha de extrusão. Após a deposição, a viscosidade deve ser alta o suficiente para garantir a não dispersão do material ou rápida transição sol-gel. Esse comportamento do material é estudado por meio de testes reológicos nos quais são avaliadas as propriedades pseudoplástica, viscoelásticas e tixotrópicas necessárias para imprimir as tintas (CHUNG et al., 2013; DÁVILA; D'ÁVILA, 2019; NAGHIEH et al., 2020).

Alguns estudos publicados na literatura avaliaram parâmetros de impressão que permitiriam definir a capacidade de impressão de um material, como comportamento do fluxo (CHUNG et al., 2013), caracterizações reológicas (DÁVILA; D'ÁVILA, 2019), influência de reticuladores físicos e químicos (SARKER et al., 2018), tempo de gelificação e intumescimento (MURPHY; ATALA, 2014), dentre outros. No entanto, até o momento não existe um procedimento bem definido de forma a estabelecer a capacidade de impressão de uma tinta com

suas propriedades e as diversas variáveis de processo. Assim, neste trabalho a capacidade de impressão de tintas de CMC/Laponita foi caracterizada por uma série de testes quantitativos: teste de colapso, testes de compressão, de intumescimento e finalmente testes reológicos.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Materiais

Carboximetilcelulose (CMC) com massa molar $M_w = 250000 \text{ g.mol}^{-1}$ e grau de substituição GS = 0,70 foi adquirida na Sigma-Aldrich, Saint Louis-MO, EUA. O nanosilicato de Laponita (BYK, Alemanha) foi obtido da Southern Clay Products, Inc., EUA. Os reticuladores usados (ácido cítrico e cloreto de cálcio) foram comprados pela Sigma-Aldrich, Saint Louis-MO, EUA.

4.2.2 Preparação de hidrogéis

As composições dos géis estão mostradas na Tabela 4.2 e foram realizadas em duas etapas. Primeiro, 1% em massa de CMC em pó foi disperso em água deionizada usando agitador vórtex. Logo depois, para as misturas, uma quantidade fixa de 1% em massa de CMC foi adicionada em diferentes concentrações de Laponita (1, 2, 3 e 4% em massa) e misturada cuidadosamente com água deionizada usando uma espátula até obter uma solução homogênea. As dispersões CMC/Laponita resultantes foram armazenadas durante a noite para subsequentes caracterizações e determinação da composição mais adequada para uso como tinta. A concentração da tinta que seria usada para impressão de estruturas 3D foi determinada por meio de estudos reológicos, testes de formação, fusão e colapso do filamento. A concentração de CMC foi fixada em 1 % em massa devido as concentrações maiores de CMC serem difíceis de dispersar com Laponita, o que forma aglomerados ou amostras não homogêneas. Por fim, após o processo de impressão, os *scaffolds* foram transferidos para placas de Petri e imersos por 2,5 minutos em diferentes concentrações de CaCl₂ (0,05 M- 0,1 M- 0,15 M e 0,2 M) e ácido cítrico (0,5 - 1,0 - 1,5 e 2,0 % em massa), utilizados como reticuladores. Todas as amostras foram preparadas, impressas e reticuladas a temperatura ambiente (23°C).

Rótulo	CMC (% massa)	Laponita (% massa)
1,0-0,0	1,0	0,0
1,0-1,0	1,0	1,0
1,0-2,0	1,0	2,0
1,0-3,0	1,0	3,0
1,0-4,0	1,0	4,0

Tabela 4,1: Nomenclatura das dispersões CMC-Laponita

4.2.3 Caracterização reológica

As caracterizações reológicas das dispersões foram realizadas utilizando um Reômetro Modular Compacto Anton Paar MCR-102 com geometria placa-placa (50 mm de diâmetro e gap de 1 mm) a 25 °C. A viscosidade das soluções foi determinada pela aplicação de uma taxa de cisalhamento na faixa de 0,01 a 700 s⁻¹ após a aplicação de um pré-cisalhamento constante de 200 s⁻¹ por 300 s seguido por um período de descanso de 300 s. Um teste de varredura de amplitude foi então realizado para determinar a região viscoelástica ($\gamma_o = 1\%$) em uma frequência angular de 10 rad.s⁻¹ e uma deformação de cisalhamento na faixa de 0,01-100%. Posteriormente, testes de varredura de frequência oscilatória foram realizados nas amostras no intervalo de 0,1 a 240 rad.s⁻¹, onde os módulos de armazenamento e de perda foram medidos. Por fim, para simular as condições de impressão e analisar a recuperação da estrutura, foram realizados testes de recuperação de viscosidade, ou tixotropia em três intervalos (3ITT). Os três intervalos de taxas de cisalhamento e o respectivo tempo, utilizados foram: 1 s⁻¹ (25s), 100 s⁻¹ (50s) e 1 s⁻¹ (250s), A porcentagem de recuperação da viscosidade é dada por:

$$\eta_{rec} = \frac{\eta t_{rec}}{\eta_i} * 100 \tag{4.1}$$

onde ηt_{rec} é a viscosidade de recuperação no tempo $t \in \eta_i$ é a viscosidade inicial no intervalo de descanso.

4.2.4 Fabricação de scaffolds

Os filamentos e scaffolds CMC/Laponita foram impressos usando uma impressora Educational StarterTM (3DBS, Brasil). Os géis foram armazenados em uma seringa descartável (EFD, Nordson) e o material é dispensado através de um bico dosador (EFD, Nordson, diâmetro interno 410 µm) em um leito de impressão estacionário, conforme mostra Figura 4.1. A vazão e a largura do filamento são controladas pela velocidade do bico, multiplicador da extrusão e distância de impressão. Os scaffolds foram modelados no software Solidworks, e o desenho foi levado ao software fatiador Slicer 1-2,9 para gerar as instruções camada por camada. Tais instruções são necessárias para a impressora criar os scaffolds desenhados. A deposição dos filamentos foi realizada com padrão de grade de 10*10 mm. Após a impressão, os scaffolds foram imersos e cobertos com soluções de 1,5% em massa de ácido cítrico e 0,1M CaCl₂ para realizar a reticulação. A largura do filamento e tamanho do poro (área e perímetro) foram medidos usando o software ImageJ (National Institute of Health, Gaithersburg, MD, EUA). Para os testes de formação, fusão e colapso, amostras com 1,0% em massa de CMC e diferentes concentrações de Laponita foram testadas para mostrar o efeito da Laponita no processo. Todas as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 min em uma centrífuga Kasvi K14-4000 para remover as bolhas antes da impressão.



Figura 4.1: Fotografia da impressora *Educational Starter*TM (3DBS, Brasil).

4.2.5 Testes de formação e fusão de filamentos

O teste de fusão foi feito seguindo o protocolo descrito por Habib et al, (2018). Os testes de formação de filamentos foram realizados com uma velocidade de impressão de 5 mm.s⁻¹, garantindo a formação do filamento e a passagem do material pelo bico de extrusão.

Para o teste de fusão do filamento, duas camadas consecutivas de várias concentrações de CMC/Laponita foram depositadas variando a distância entre os filamentos de 1-5 mm com aumentos de 1 mm, como mostra a Figura 4.2a. Dois fatores diferentes: a taxa de difusão (Df_r) e o índice de capacidade de impressão (P_r) foram determinados através das Equações (4,2) e (4,3) (OUYANG et al., 2016). As camadas do material foram depositadas e subsequentemente observadas em um microscópio digital USB (*Electronic magnifier*, China), em uma ampliação de 1000x. A largura do filamento depositado foi medida usando o software ImageJ. O multiplicador de extrusão (vazão), a velocidade de impressão e a distância de impressão usadas no teste foram de 1 (0,716 mm³.s⁻¹), 5 mm.s⁻¹ e 0,2 mm, respectivamente.

$$Df_{\rm r} = \frac{A_{\rm t} - A_{\rm a}}{A_{\rm t}} * 100\%$$
(4.2)

e

$$P_{\rm r} = \frac{L^2}{16A_{\rm c}},\tag{4.3}$$

onde, $A_t e A_a$ são as áreas teóricas e reais dos poros, respectivamente, e *L* é o perímetro. Quando $A_a = A_t$, o material não se espalha e a taxa de difusão é igual a 0. O índice de capacidade de impressão é 1 para um poro quadrado perfeito,

4.2.6 Teste de colapso de filamento

O teste de colapso do filamento é realizado seguindo os protocolos de HABIB et al., 2018; THERRIAULT; WHITE; LEWIS, 2007. A plataforma utilizada segue o modelo desenhado por Habib et al., (2018), onde seis pilares com distâncias entre 1 a 6 mm foram modelados e impressos, conforme mostra a Figura 4.2b. Para determinar a área de colapso do material, um único filamento é depositado na plataforma e a deflexão do filamento suspenso é medida. Os testes foram realizados com velocidade de impressão de 5 mm.s⁻¹, multiplicador de extrusão de 1 (0,716 mm³.s⁻¹), e distância de impressão de 0,2 mm. Para quantificar a deflexão do filamento, o fator de área de colapso é dado pela seguinte equação:

$$C_{f} = \frac{A_{a}^{c}}{A_{t}^{c}} * 100\%$$
(4.4)

onde $A_a{}^c$ e $A_t{}^c$ são a área real e teórica, respectivamente. Assim, $C_f = 0$ para materiais que são muito fluidos, e $C_f = 100$ para filamentos que não entram em colapso e formam uma ponte direta entre os dois pilares.



Figura 4.2: (a) Filamento depositado a 0°-90 °, (b) modelo e áreas medidas na plataforma.

4.2.7 Impressão de padrão angular

Os *scaffolds* com diferentes padrões de ângulos (45° , 90° e 135°) foram impressos para complementar os estudos da capacidade de impressão das tintas. Os parâmetros usados para a impressão dos filamentos foram: velocidade de impressão de 5 mm.s⁻¹, distância de impressão de 0,2 mm e multiplicador de extrusão de 1 (0,716 mm³.s⁻¹).

4.2.8 Efeito do multiplicador de extrusão, velocidade de impressão e distância de impressão

O efeito do multiplicador de extrusão, velocidade de impressão e distância de impressão na largura do filamento foram determinados para a composição de 1 CMC/4 Laponita. O multiplicador de extrusão, que é chamado de "taxa de fluxo", especifica a vazão na qual a impressora extrudará o material. Neste caso a taxa de fluxo usada foi de 0,716 mm³,s⁻¹. A velocidade de impressão é a velocidade na qual está sendo extrudado o material pelo bico de extrusão e a distância de impressão é a altura existente entre o bico de extrusão e a plataforma de impressão.

Neste teste, três filamentos (triplicata) de 10 mm de comprimento foram depositados usando um bico de 0,41 mm de diâmetro e subsequentemente observados e medidos sua largura usando um microscópio digital USB (*Electronic magnifier*, China), e o *software* ImageJ, respectivamente. A Tabela 4.2 resume os parâmetros de impressão avaliados. Para a realização deste teste, enquanto dois fatores permaneceram fixos o outro fator foi variando.

Velocidade de	Multiplicador	Distância de impressão		
impressão (mm.s ⁻¹)	de extrusão	(mm)		
5,00	1,00	0,30		
6,75	1,35	0,41		
9,11	1,82	0,55		
	2,46			

Tabela 4.2: Parâmetros de impressão para realizar um estudo estadístico da influência destas variáveis na largurado filamento usando a tinta ótima.

4.2.9 Teste de intumescimento

O teste de intumescimento foi realizado seguindo o protocolo descrito por YOU et al., 2016. Os *scaffolds* obtidos após o processo de reticulação foram liofilizados e o peso seco foi medido. Os *scaffolds* secos foram imersos em 2 ml de água deionizada e colocados em uma

estufa SSD (Sinergia cientifica, BR) em condições ideais de cultivo (37° C). O meio foi substituído todos os dias, e os pesos das amostras foram medidos após de 1h, 24h, 48h, 72h, para registrar qualquer alteração na massa devido ao intumescimento. A razão de expansão foi definida como:

$$\frac{W_t - W_0}{W_o} * 100\% \tag{4.5}$$

onde W_0 é o peso seco das amostras após liofilizar e W_t é o peso úmido medido das amostras nos diferentes tempos.

4.2.10 Ensaio de compressão

A força de compressão dos hidrogéis foi medido usando um texturometro TA. XT2 (Stable Microsystems SMD, Reino Unido) equipada com uma célula de carga de 50N e uma geometria cilíndrica com 12 mm de diâmetro. Uma velocidade constante de 1 mm.s⁻¹ foi aplicada nas amostras, previamente reticuladas. Os testes foram realizados em triplicata até 70% de deformação a 23°C. A força de compressão é definida como a força máxima que o material aguenta antes de se deformar.

4.2.11 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram utilizados para avaliar a compatibilidade de *scaffolds* reticulados com ácido cítrico e CaCl₂ com células BALB/c 3T3 (fibroblasto murino) por redução de MTT (3-brometo (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5 difenil-tetrazólio) (HERNANDEZ-MONTELONGO et al., 2017). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM; Sigma Chemical Co.) suplementado com 10% de soro fetal de bovino (FCS; Gibco, Grand Island, NY, EUA), 100U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37° C em atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono.

As células foram plaqueadas na concentração de 10⁴ células/poço e suplementas com o meio de cultivo. Após 2 horas, as células já aderidas na placa, foram adicionadas as amostras de AC e CaCl₂ (diâmetro: 5mm, espessura: 3mm), e incubadas por 24 horas. O controle foi o poço livre de exposição da amostra. Após 24 horas, o meio e as amostras foram removidas, os poços lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS), adicionados a meio isento de

soro contendo corante MTT (0,5 mg/ml) e incubou-se a placa por 4h a 37 ° C. Após, o meio foi cuidadosamente removido e adicionado a 100 mL de etanol (TIN, 1983) e agitou-se as placas por 5 min. A absorbância de cada poço foi lida no espectrofotômetro ($\lambda = 570$ nm). Os valores foram expressos em porcentagens de redução do MTT em relação ao controle. Uma porcentagem de viabilidade em comparação com o controle (a densidade óptica média das células foi definida como 100% de viabilidade) foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta por análise de regressão linear (LOPEZ et al., 2015).

4.2.12 Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) conduzida no Minitab® (Minitab INC., Faculdade estadual, PA).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Propriedades reológicas

A capacidade de impressão das tintas foi inicialmente avaliada por meio de medições de viscosidade em regime permanente, ensaios oscilatórios de varredura de amplitude e frequência, e teste de recuperação de viscosidade (3ITT).

Na Figura 4.3a é mostrada as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para soluções de 1% em massa de CMC e dispersões de CMC/Laponita. Como observado, a viscosidade para a amostra de CMC exibiu um comportamento pseudoplastico após um platô newtoniano. Em contrapartida, as misturas contendo Laponita exibiram um forte comportamento pseudoplastico. Este comportamento pseudoplástico das misturas é um dos requisitos necessários no processo de impressão tridimensional pois, para o material escoar, este precisa ter baixa viscosidade em altas taxas de cisalhamento, e alta viscosidade em cisalhamentos menores para manter a estrutura e evitar o colapso da estrutura impressa.

O comportamento pseudoplástico das misturas CMC/Laponita foi ajustado pelo modelo de Ostwald-de Waele (lei de potências) dado pela seguinte equação:

$$\eta(\dot{\gamma}) = K \dot{\gamma}^{n-1} , \qquad (4.6)$$

onde $\eta(\dot{\gamma})$ é a viscosidade, *m* é o índice de consistência de fluxo (viscosidade quando a taxa de cisalhamento é 1s⁻¹) e *n* é o índice de lei de potências (medida do grau de pseudoplasticidade). Em fluidos pseudoplásticos, 0 < n < 1, menores valores de *n* indicam maior pseudoplasticidade A Tabela 4.3 resume os valores de *m* e *n*.

Amostra	Parâmetros	0,0 Lap	1,0 Lap	2,0 Lap	3,0 Lap	4,0 Lap
	m	0,101	36,056	107,53	222,81	304,12
1 % CMC	n	0,868	0,126	0,062	0,051	0,095
	<i>R</i> ²	0,910	0,983	0,995	0,995	0,990

Tabela 4.3: Parâmetros de ajuste do modelo Ostwald-de Waele para misturas CMC/Laponita

Podemos observar que a adição de Laponita acentuou o comportamento pseudoplastico e o índice de consistência de fluxo nas dispersões CMC/Laponita. Este comportamento pode estar atribuído ao desemaranhamento das cadeias poliméricas e deslizamento das plaquetas de Laponita umas sobre outras na direção do fluxo quando aplicadas altas taxas de cisalhamento.

Os aumentos no valor de viscosidade, nas misturas CMC/Laponita, em baixas taxas de cisalhamento podem estar associados à formação da estrutura interna de "castelo de cartas" devido às forças eletrostáticas de repulsão e atração presentes nas nanopartículas de Laponita. Após os testes de viscosidade em estado estacionário, testes de cisalhamento oscilatório foram realizados nas amostras para analisar o comportamento viscoelástico das tintas. Na Figura 4.3b são mostrados os resultados de varredura de amplitude. A uma frequência angular constante de 10 rad.s⁻¹, as soluções de CMC apresentaram comportamento do tipo líquido (G'' > G'). No entanto, ao adicionar Laponita, todas as tintas estudadas apresentaram comportamento do tipo sólido (G' > G''), o que pode estar associado com início da gelificação física gerada entre as plaquetas da Laponita e as cadeias do CMC. No caso destas tintas, o ponto de escoamento (*flow point*) é claramente observado. Este ponto de escoamento é de vital importância nos processos de impressão devido ser a garantia do início do escoamento e está associado à transição de um comportamento sólido para um líquido.

Na Figura 4.3c estão apresentados os resultados de varredura de frequência. É observado que as amostras de CMC apresentam comportamento do tipo líquido. Porém, em altas frequências o ponto de cruzamento define uma transição de um comportamento do tipo líquido para o sólido. Para todas as amostras contendo Laponita, um comportamento do tipo sólido é observado em todo o intervalo de frequência analisado. Ao mesmo tempo, o módulo de armazenamento (G') aumenta conforme o aumento da concentração de Laponita, independentemente da frequência. Estes aumentos podem estar atribuídos à formação da estrutura de castelo de cartas (DÁVILA; D'ÁVILA, 2017),

Finalmente, os resultados dos testes de recuperação da viscosidade estão apresentados na Figura 4.3d. Pode ser observado que as tintas contendo Laponita sofreram um decréscimo rápido da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento e uma recuperação rápida da viscosidade após a diminuição do cisalhamento. Essa recuperação da viscosidade pode estar associada à regeneração da estrutura da castelo de cartas e a energia elástica armazenada pelas cadeias poliméricas (DÁVILA; D'ÁVILA, 2019). De acordo com Peak et al, (2018), uma recuperação de 80% da viscosidade inicial pode ser considerada adequada para os processos de impressão por extrusão. A tinta 1 CMC/4 Laponita exibiu praticamente uma recuperação total da viscosidade (Figura 4.3d). Essa recuperação rápida nos processos de impressão indica uma rápida reconstrução da estrutura inicial do gel, o qual é desejável para manter a estabilidade e a qualidade do objeto impresso.



Figura 4.3: (a) Curvas de viscosidade em estado estacionário para tintas CMC-Laponita (C_L é a concentração de Laponita) com concentração fixa de 1% em massa de CMC. A linha contínua corresponde ao ajuste por lei de potencias. Módulo de armazenamento (G') (símbolos sólidos) e módulo de perda (G'') (símbolos abertos) em função da: (b) deformação (γ) e (c) frequência angular (ω). (d) Viscosidade em função do tempo para o teste de recuperação.

4.3.2 Formação de filamento e teste de fusão

A Figura 4.4 mostra os filamentos impressos antes e após serem depositados na plataforma de impressão. Como observado, filamentos contínuos só são formados em concentrações acima de 2% em massa de Laponita. No caso dos filamentos depositados na plataforma de impressão, a área dos poros foi medida e avaliada nas Equações 4,2 e 4,3

correspondentes à taxa de difusão (Df_r) e índice de capacidade de impressão *Pr* (Figura 4.5a, b).



Figura 4.5: Taxa de difusão percentual e índice de capacidade de impressão no teste de fusão de filamentos.

Pode-se observar que o valor de Df_r diminui à medida que a área teórica dos poros aumenta, indicando os menores valores de difusão da estrutura em tamanhos de poros entre 2x2 e 5x5 mm². Em poros que apresentam baixa gelificação não foi possível realizar as medidas das áreas de 1x1 mm² e 2x2 mm² devido à alta fluidez do material, difundindo-se até o fechamento completo dos poros. A tinta de 1 CMC/4 Laponita apresentou os valores de Df_r mais baixos, indicando que foi a amostra onde as áreas medidas sofreram menor diferenças com as áreas do CAD e, portanto, menor colapso do material. Os valores de Pr permanecem constantes em todas as composições que continham Laponita, apresentando valores entre 0,8 e 1 para tamanhos de poros entre 2x2 e 5x5 mm². Os resultados anteriores também podem ser verificados visualmente, no qual tintas com concentrações maiores a 2 % em massa de Laponita formaram filamentos contínuos e *scaffolds* com poros mais definidos.

4.3.3 Teste de colapso de filamento

Resultados dos testes de colapso de filamento estão mostrados na Figura 4.6. Observa-se que à medida que a concentração de Laponita aumenta, a deflexão do material em suspensão é mínima, conforme mostrado na Figura 4.6a. O fator de área de colapso foi calculado de acordo com a Equação 4.4 e os resultados estão mostrados na Figura 4.6b. Pode-se observar que a composição com 1 CMC/4 Laponita tem o fator de área de colapso mínimo do material em todas as distancias entre as colunas e pouca deflexão do filamento sobre a estrutura. As composições de 1 CMC e 1 CMC/1 Laponita não foram capazes de formar ou suportar o filamento sobre a estrutura. Assim, essas duas composições apresentaram áreas de colapso iguais a zero.



Figura 4.6:Teste de colapso do filamento (a) e fator da área de colapso (b).

4.3.4 Impressão de padrões angulares

A Figura 4.7 mostra a capacidade de impressão das tintas usando diferentes tipos ângulos de impressão: agudo (45°), reto (90°) e obtuso (135°). Pode-se observar que, conforme a concentração de Laponita aumenta nas tintas, os ângulos retos medidos aproximam-se dos valores nominais definidos pelo modelo CAD. Os valores nos ângulos agudos e obtusos não variaram significativamente com o aumento da concentração de Laponita. As diferenças na qualidade de impressão para as diferentes tintas podem ser observadas nas fotografias dos filamentos impressos na forma de pinheiros. Com o aumento da concentração de Laponita, as bordas onde se formam os ângulos apresentam melhor qualidade, sem aglomerações do material.

Grupo	Ângulo	Medida de	
	CAD (°)	ângulos (°)	
	0-45	48,32 ± 0,99	
1 CMC-1	0-90	$95,29 \pm 0,87$	
Laponita	0-135	138,75 ± 0,15	
1 CMC-2	0-45	48,24 ± 0,27	
	0-90	94,43 ± 0,25	
Laponita	0-135	$138,\!58 \pm 0,\!40$	
	0-45	48,19 ± 0,38	
1 CMC-3	0-90	92,84 ± 0,39	
Laponita	0-135	$137,42 \pm 0,31$	
	0-45	$47,66 \pm 0,28$	
1 CMC-4	0-90	91,32 ± 0,36	
Laponita	0-135	137,33 ± 0,25	



1CMC-1 Laponita





1CMC-3 Laponita

1CMC-4 Laponita



Figura 4.7: Efeito do padrão angular na capacidade de impressão de scaffolds com ângulos agudos, direitos e obtusos.

Assim, a partir dos três testes anteriores é possível determinar que conforme aumenta a concentração de Laponita na qualidade na impressão e a largura do filamento vai se aproximando aos valores nominais do modelo CAD. Dentre as composições estudadas, a composição de 4% em massa de Laponita e 1% em massa de CMC foi definida como a tinta ideal. Esta composição além de garantir a passagem do material pelo bico e a formação de uma estrutura impressa com recuperação da viscosidade, permitirá o estudo dos parâmetros de impressão, reticulação e testes de citotoxicidade.

4.3.5 Efeito da velocidade do bico, multiplicador de extrusão e distância de impressão na largura do filamento

O efeito da velocidade de impressão, multiplicador de extrusão, distância de impressão na largura do filamento são apresentadas nas Figura 4.8 e Figura 4.9.

A Figura 4.8a mostra a largura do filamento impresso conforme varia a distância de impressão. Observa-se que conforme aumenta a distância de impressão, a largura do filamento diminui. Este comportamento pode ser devido às distancias maiores de impressão não permitirem o contato entre o filamento e a plataforma de impressão o que leva a tensões ao longo da direção de deposição e redução da largura do filamento.

Da mesma forma, o efeito da velocidade de impressão é mostrado na Figura 4.8b, no qual observou-se que, com o aumento da velocidade, a largura do filamento não apresentou mudanças significativas, permanecendo quase constante nas três velocidades de impressão testadas. É importante destacar que em velocidades de impressão muito altas (fora do intervalo estudado) o filamento pode fraturar e resultar em deposição descontínua do material.

Finalmente, o efeito do multiplicador de extrusão é mostrado na Figura 4.8c. Este parâmetro gera um aumento linear na largura do filamento conforme aumenta seu valor. Esse aumento de largura do filamento é devido à maior vazão de extrusão, o que resulta em filamentos mais grossos.



Figura 4.8: Gráfico de efeitos principais para a largura do filamento (médias ajustadas).

A Figura 4.9 mostra a influência dos três parâmetros do processo de impressão e suas respectivas combinações na largura do filamento impresso. Podemos notar que além da distância de impressão e do multiplicador de extrusão, a combinação entre esses dois fatores apresentaram o mesmo grau de significância nos efeitos padronizados do estudo. A velocidade de impressão foi o parâmetro que menos influenciou na largura do filamento, portanto o parâmetro com menor significância estatística.

Assim, a partir desses resultados, pode-se observar que géis impressos com velocidade de impressão de 5 mm.s⁻¹, distância de impressão de 0,55 mm e multiplicador de extrusão de 1 resultarão em filamentos contínuos e com largura próxima ao valor nominal do diâmetro do bico.



Figura 4.9: Diagrama de Pareto de efeitos normatizados

4.3.6 Fabricação de scaffolds em grande escala

Conforme mostrado na Figura 4.10, é possível imprimir hexágonos e *scaffolds* com até 5 camadas para concentrações de Laponita de até 4% em massa. Com 1% em massa de Laponita, a estrutura impressa colapsa após a segunda camada e, como evidenciado no teste de colapso, não foi possível formar um filamento contínuo. Visualmente, podemos observar que a fidelidade das estruturas impressas (hexágonos e quadrados) aumentou em função do aumento da concentração de Laponita.



Figura 4.10: Amostras impressas: Influências da concentração de Laponita na capacidade de impressão,

As diferentes análises realizadas para avaliar a capacidade de impressão das tintas mostraram que a composição de 1 CMC/4 Laponita tem propriedades reológicas e de impressão adequadas para obter objetos impressos com boa fidelidade de forma, similares aos desenhados no modelo CAD. A partir destes resultados, esta composição foi usada para avaliar a consistência estrutural em impressão de estruturas com diferentes números de camadas, conforme mostrado na Figura 4.11. Assim, observa-se que foi possível imprimir *scaffolds* com boa fidelidade de forma de até 100 camadas sem apresentar colapso do material, mas com pequenos caimentos nas camadas inferiores que fecharam os poros.



Figura 4.11: Scaffolds de 15, 30, 50 e 100 camadas fabricadas para uma concentração de 1 CMC/4 Laponita.

4.3.7 Testes de compressão dos hidrogéis

Após o processo de impressão tridimensional, o gel foi reticulado com diferentes concentrações de ácido cítrico e cloreto de cálcio. Como mostrado na Figura 4.12a, a força de compressão das amostras reticuladas com cloreto cálcio aumentou significativamente em comparação com as amostras sem CaCl₂. Concentrações de 0,10M 0,15M e 0,20M não apresentaram aumentos significativos da força de compressão entre elas. Xu, Erdem e Eiser, (2020) sugeriram que este comportamento mecânico decorre tanto da ligação entre o polímero e íons de cálcio, bem como da ligação entre duas plaquetas carregadas negativamente pelos íons Ca^{+2} .

A Figura 4.12b mostra o valor da força de compressão usando diferentes concentrações de ácido cítrico. Neste caso, a força de compressão aumentou quatro vezes nas amostras reticuladas com 1,5% em massa de AC, quando comparados com as amostras sem reticulação. Além disso, concentrações de ácido cítrico menores de 1,5% em massa não apresentaram aumentos significativos na força de compressão. Este aumento na resistência mecânica do hidrogel pode ser devido à formação de um mecanismo de esterificação na reação da celulose com o ácido cítrico (DEMITRI et al., 2008). Assim, o aumento da força de compreensão esteve diretamente relacionada ao aumento da densidade de redes formadas pela reticulação.



Figura 4.12: Testes de compressão para as amostras reticuladas com diferentes concentrações de (a) $CaCl_2 e$ (b) ácido cítrico. As concentrações das amostras de ácido cítrico são em % em massa.

4.3.8 Testes de intumescimento dos filamentos

Para a realização desse teste, os géis de CMC/Laponita foram divididos em três grupos: géis reticulados com ácido cítrico, géis reticulados com cloreto de cálcio e géis sem reticulação. Conforme observado na Figura 4.13a, o intumescimento dos três grupos apresentou diferentes taxas para o mesmo período de tempo. No caso dos géis sem reticulação, a porcentagem de intumescimento se manteve sem diferenças significativas mostrando que não houve intumescimento dos géis, sendo que esses dissolveram-se completamente após 72h do início do teste, devido à baixa densidade de reticulação física entre polímero e nanopartícula.

No caso das amostras reticuladas com ácido cítrico, a taxa de intumescimento foi similar às amostras sem reticulação, pois não apresentou aumentos significativos; no entanto, as amostras mantiveram sua estrutura após 72 h. Este resultado pode ser devido à alta densidade de reticulação das cadeias do polímero que impediram que a água fosse absorvida nos *scaffolds* (Figura 4.13).

Finalmente, nas amostras reticuladas com CaCl₂, a taxa de intumescimento foi aumentando ao longo do período de teste. Um aumento de 73,7% foi evidenciado nas amostras depois de 72h. Assim as amostras reticuladas com CaCl₂ apresentaram melhores propriedades de intumescimento quanto comparadas com as amostras reticuladas com ácido cítrico.



Figura 4.13: (a) Taxa de intumescimento de amostras reticuladas com ácido cítrico, CaCl₂ e sem reticular, e (b) fotos digitais de *scaffolds* antes e depois da reticulação,

4.3.9 Teste de citotoxicidade

Finalmente, a citotoxicidade dos *scaffolds* sem reticulação e reticulados com 1,5 % em massa de ácido cítrico e 0,1 M de CaCl₂ foi avaliada com células BALB/ c 3T3 (fibroblastos) pelo ensaio colorimétrico MTT após 72h (Figura 4.14). Observa-se que a viabilidade celular em amostras reticuladas com ácido cítrico foi menor do que a obtida para as amostras reticuladas com CaCl₂.

No caso das amostras com CaCl₂, a viabilidade celular foi ligeiramente reduzida de 100% para 81%, enquanto nas amostras reticuladas com ácido cítrico, a redução na viabilidade foi de 56%. Os hidrogéis sem reticulação apresentaram uma percentagem de viabilidade celular de 98%, valor semelhante ao do controle.



Figura 4.14: Citotoxicidade dos agentes de reticulação: ácido cítrico e Cloreto de Calcio.

O potencial citotóxico dos hidrogéis a partir da viabilidade celular pode ser classificado em três grupos de acordo com Gatenholm et al, (2016): Toxico, com viabilidade celular menor de 50%; levemente toxico, na faixa de viabilidade entre 51%-70%; e não tóxico com viabilidade acima do 71%. Assim, os géis formados pelo sistema 1 CMC/4 Laponita são não tóxicos, similar os hidrogéis reticulados com CaCl₂. Por outro lado, os hidrogéis reticulados com ácido cítrico apresentaram uma leve citotoxicidade, devido possivelmente ao pH da solução.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que a caracterização reológica e estudos de capacidade de impressão são muito importantes no desenvolvimento de tintas em processos de impressão 3D por extrusão, especificamente para géis nanocompósitos do sistema CMC/Laponita. Inicialmente, estudos reológicos e espectroscópicos permitiram analisar os mecanismos de interação entre as plaquetas de Laponita e as cadeias poliméricas de CMC. Observou-se um aumento de viscosidade e comportamento pseudoplástico pronunciado ao adicionar CMC em dispersões aquosas de Laponita de 2,0% em massa. A presença de CMC inibiu o envelhecimento da Laponita e induziu a gelificação física e tixotropia. Esses efeitos nas propriedades reológicas podem ser associados as ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre cadeias poliméricas e plaquetas de Laponita. A presença de grupos hidroxila (-OH) em CMC e grupos silanol (Si-O) em Laponita induz interações físicas que fortalecem a rede, acarretando em modificações no comportamento reológico viscoso, viscoelástico e tixotrópico, mesmo adicionando pequenas quantidades de CMC.

A partir do estudo do comportamento reológico e das interações das nanopartículas de Laponita com as cadeias poliméricas de CMC, diferentes composições foram avaliadas, visando uma formulação ótima de tinta. Testes reológicos (viscosidade, tixotropia, varredura de amplitude e testes de varredura de frequência (SAOS)), em conjunto com testes de formação, fusão e colapso de filamento permitiram definir uma tinta ótima. O comportamento pseudoplastico acentuado, a rápida recuperação da viscosidade e o comportamento viscoelástico do tipo solido garantiram que as tintas tiveram a capacidade de serem dispensadas e posteriormente reter a forma do objeto impresso. Nos estudos realizados a os parâmetros de impressão, a velocidade de impressão foi o parâmetro de menor relevância, quando comparado com o multiplicador extrusão e a distância de impressão. Após os processos de impressão, os géis foram satisfatoriamente reticulados com ácido cítrico e CaCl₂, melhorando-se as propriedades mecânicas da tinta conforme visto nos testes de força de compressão. Finalmente, visando as aplicações em engenharia tecidual a citotoxicidade dos *scaffolds* impressos foi avaliada mostrando que nenhum dos dois reticuladores apresentava toxicidade celular.

Trabalhos futuros podem ser orientados para:

- Complementar os estudos dos mecanismos de reticulação e propriedades de intumescimento nos hidrogéis de CMC/Laponita.
- Avaliar os parâmetros de impressão definidos em esta pesquisa, na fabricação de estruturas com formas complexas.
- Estudar os diâmetros das estruturas impressas após o processo de reticulação, dependendo do tipo de reticulador e tempo de reticulação.
- Imprimir tintas carregadas com células (biotintas) usando o sistema CMC/Laponita e avaliando a viabilidade celular e possível uso na área de engenharia tecidual.

REFERÊNCIAS

A.S PEREIRA; F.T PINHO. Turbulent pipe flow of thixotropic fluids. **International Journal** of Heat and Fluid Flow, v. 23, n. 1, p. 36–51, 2002.

ABRAMOWITCH, S.; EASLEY, D. Introduction to Classical Mechanics. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

AFEWERKI, S. et al. Bioprinting a Synthetic Smectic Clay for Orthopedic Applications. Advanced Healthcare Materials, v. 8, n. 13, p. 1–14, 2019.

AHLFELD, T. et al. Development of a clay based bioink for 3D cell printing for skeletal application. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, 2017.

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal** of Advanced Research, v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015.

AHO, J. et al. Rheology as a tool for evaluation of melt processability of innovative dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 494, n. 2, p. 623–642, 2015.

AVERY, R. G.; RAMSAY, J. D. F. Colloidal properties of synthetic hectorite clay dispersions. II. Light and small angle neutron scattering. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 109, n. 2, p. 448–454, 1986.

AVERY, R. K. et al. An injectable shear-thinning biomaterial for endovascular embolization. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 365, 2016.

BARBUCCI, R.; MAGNANI, A.; CONSUMI, M. Swelling behavior of carboxymethylcellulose hydrogels in relation to cross-linking, pH, and charge density. **Macromolecules**, v. 33, n. 20, p. 7475–7480, 2000.

BENCHABANE, A.; BEKKOUR, K. Rheological properties of carboxymethyl cellulose (CMC) solutions. **Colloid and Polymer Science**, v. 286, n. 10, p. 1173–1180, 2008.

BERMAN, B. 3-D printing: The new industrial revolution. **Business Horizons**, v. 55, n. 2, p. 155–162, 2012.

BERMAN, B.; ZARB, F. G.; HALL, W. 3-D printing : The new industrial revolution. **Business Horizons**, v. 55, n. 2, p. 155–162, 2012.

BLAESER, A. et al. Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 3, p. 326–333, 2016.

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

BOYER, C. et al. Laponite nanoparticle-associated silated hydroxypropylmethyl cellulose as an injectable reinforced interpenetrating network hydrogel for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 65, p. 112–122, 2018.

BRANDL, F.; SOMMER, F.; GOEPFERICH, A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. **Biomaterials**, v. 28, n. 2, p. 134–146, 2007.

BYK ADDITIVES & INSTRUMENTS. Laponite : performance additives. LAPONITE Performance Additives, p. 22, 2014.

CAI, W. R. et al. Cobalt hexacyanoferrate electrodeposited on electrode with the assistance of laponite: The enhanced electrochemical sensing of captopril. **Electrochimica Acta**, v. 198, p. 32–39, 2016.

CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, 2015.

CARREAU, P. J. Rheological Equations from Molecular Network Theories Rheological Equations from Molecular Network Theories. **Transactions of the Society of Rheology**, v. 16, p. 99–127, 1972.

CARRETERO, M. I. Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review. **Applied Clay Science**, v. 21, p. 155–163, 2002.

CHAI, M. N.; ISA, M. I. N. The Oleic Acid Composition Effect on the Carboxymethyl Cellulose Based Biopolymer Electrolyte. Journal of Crystallization Process and

Technology, v. 03, n. 01, p. 1-4, 2013.

CHANG, C. C. et al. Direct-write bioprinting three-dimensional biohybrid systems for future regenerative therapies. Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials, v. 98 B, n. 1, p. 160–170, 2011.

CHIMENE, D. et al. Nanoengineered Ionic-Covalent Entanglement (NICE) Bioinks for 3D Bioprinting. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 12, p. 9957–9968, 2018.

CHIMENE, D.; ALGE, D. L.; GAHARWAR, A. K. Two-Dimensional Nanomaterials for Biomedical Applications: Emerging Trends and Future Prospects. **Advanced Materials**, v. 27, n. 45, p. 7261–7284, 2015.

CHUNG, J. H. Y. et al. Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. **Biomaterials Science**, v. 1, n. 7, p. 763–773, 2013.

CLASEN, C.; KULICKE, W. M. Determination of viscoelastic and rheo-optical material functions of water-soluble cellulose derivatives. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 26, n. 9, p. 1839–1919, 2001.

COFIÑO, C. et al. Development of a Self-Assembled Peptide/Methylcellulose-Based Bioink for 3D Bioprinting. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 304, n. 11, p. 1–9, 2019.

CONNELL, J. J. The role of formaldehyde as a protein crosslinking agent acting during the frozen storage of cod. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, n. 12, p. 1925–1929, 1975.

CROSS, M. M. Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems. **Colloid Science**, v. 437, p. 417–437, 1964.

CRUISE, G. M.; SCHARP, D. S.; HUBBELL, J. A. Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels. **Biomaterials**, v. 19, n. 14, p. 1287–1294, 1998.

DA FONSÊCA, J. H. L.; D'ÁVILA, M. A. Rheological behavior of carboxymethylcellulose and cellulose nanocrystal aqueous dispersions. **Rheologica Acta**, v. 60, n. 9, p. 497–509, 2021.

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. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 101, n. 1–4, p. 675–686, 2019.

DEMITRI, C. et al. Novel Superabsorbent Cellulose-Based Hydrogels Crosslinked with Citric Acid. **Applied Polymer Science**, v. 110, n. 4, p. 2453–2460, 2008.

DEO, K. A. et al. Bioprinting 101: Design, Fabrication, and Evaluation of Cell-Laden 3D Bioprinted Scaffolds. **Tissue Engineering - Part A**, v. 26, n. 5–6, p. 318–338, 2020.

DIKOVSKY, D.; BIANCO-PELED, H.; SELIKTAR, D. The effect of structural alterations of PEG-fibrinogen hydrogel scaffolds on 3-D cellular morphology and cellular migration. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1496–1506, 2006.

DONDERWINKEL, I.; VAN HEST, J. C. M.; CAMERON, N. R. Bio-inks for 3D bioprinting: Recent advances and future prospects. **Polymer Chemistry**, v. 8, n. 31, p. 4451–4471, 2017.

DUNSTAN, D. E.; HILL, E. K.; WEI, Y. Direct measurement of polymer segment orientation and distortion in shear: Semi-dilute solution behavior. **Polymer**, v. 45, n. 4, p. 1261–1266, 2004.

EDALI, M.; ESMAIL, M. N.; VATISTAS, G. H. Rheological properties of high concentrations of carboxymethyl cellulose solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n. 10, p. 1787–1801, 2001.

EL-SHERBINY, I. M.; YACOUB, M. H. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. **Global Cardiology Science and Practice**, v. 2013, n. 3, p. 38, 2013.

ESCUDIER, A. M. P. et al. Taylor vortices in Newtonian and shear-thinning liquids. **Proceedings: Mathematical and Physical Sciences**, v. 449, n. 1935, p. 155–176, 1995.

FEDOROVICH, N. E. et al. Hydrogels as Extracellular Matrices for Skeletal Tissue Engineering: State-of-the-Art and Novel Application in Organ Printing. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 8, p. 1905–1925, 2007.

FERNANDES, R. S.; DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A. Otimização da síntese de hidrogéis nanocompósitos intercalados para possível aplicação na área médica. **Quimica Nova**, v. 40, n. 1, p. 60–67, 2017.

FREEMAN, S. et al. A bioink blend for rotary 3D bioprinting tissue engineered small-diameter vascular constructs. Acta Biomaterialia, v. 95, p. 152–164, 2019.

GAHARWAR, A. K. et al. Transparent, elastomeric and tough hydrogels from poly(ethylene glycol) and silicate nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 12, p. 4139–4148, 2011.

GAHARWAR, A. K. et al. Shear-Thinning Nanocomposite Hemorrhage. ACS Nano, v. 8, n. 10, p. 9833–9842, 2014.

GAHARWAR, A. K. et al. 2D Nanoclay for Biomedical Applications: Regenerative Medicine, Therapeutic Delivery, and Additive Manufacturing. **Advanced Materials**, v. 31, n. 23, p. 1– 28, 2019.

GAHARWAR, A. K.; PEPPAS, N. A.; KHADEMHOSSEINI, A. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 441–453, 2014.

GAO, T. et al. Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. **Biofabrication**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2019.

GARRETT, Q. et al. Carboxymethylcellulose Binds to Human Corneal Epithelial Cells and Is a Modulator of Corneal Epithelial Wound Healing. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 4, p. 1559–1567, 2007.

GATENHOLM, P. et al. 3D Printing and Biofabrication. **3D Printing and Biofabrication**, p. 1–23, 2016.

GOENKA, S.; SANT, V.; SANT, S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. Journal of Controlled Release, v. 173, n. 1, p. 75–88, 2014.

GOPINATHAN, J.; NOH, I. Recent trends in bioinks for 3D printing. **Biomaterials**, v. 11, p. 1–15, 2018.

GROLL, J. et al. Biofabrication: Reappraising the definition of an evolving field. **Biofabrication**, v. 8, n. 1, 2016.

GROLL, J. et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, v. 11, n. 1, 2019.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 10, p. 569–579, 2002.

HABIB, A. et al. 3D printability of alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel. **Materials**, v. 11, n. 3, 2018.

HABIB, A.; KHODA, B. Development of clay based novel hybrid bio-ink for 3D bio-printing process. **Journal of Manufacturing Processes**, v. 38, n. December 2018, p. 76–87, 2019.

HAN, Y.; WANG, L. Sodium alginate / carboxymethyl cellulose films containing pyrogallic acid : physical and antibacterial properties. **Wiley Online Library**, v. 97, n. 4, p. 1295–1301, 2016.

HAN, Y.; WANG, L. Sodium alginate/carboxymethyl cellulose films containing pyrogallic acid: physical and antibacterial properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 4, p. 1295–1301, 2017.

HENNINK, W. E.; NOSTRUM, C. F. VAN. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 223–236, 2002.

HERNANDEZ-MONTELONGO, J. et al. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cyto-toxicity assays. **Materials Science and Engineering C**, v. 71, p. 718–724, 2017.

HOCKADAY, L. et al. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 18–23, 2012.

HONG, S. et al. 3D Printing: 3D Printing of Highly Stretchable and Tough Hydrogels into
Complex, Cellularized Structures. Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.), v. 27, n. 27, p. 4034, 2015.

JATAV, S.; JOSHI, Y. M. Chemical stability of Laponite in aqueous media. **Applied Clay** Science, v. 97–98, p. 72–77, 2014.

JENNINGS, B. R. et al. Size and shape of laponite (type S) synthetic clay particles. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 30, n. 1, p. 134–139, 1969.

JI, S. et al. Polyester-based ink platform with tunable bioactivity for 3D printing of tissue engineering scaffolds. **Biomaterials Science**, v. 7, n. 2, p. 560–570, 2019.

JIA, J. et al. Engineering alginate as bioink for bioprinting. Acta Biomaterialia, v. 10, n. 10, p. 4323–4331, 2014.

JOHNSON, B. D.; BEEBE, D. J.; CRONE, W. C. Effects of swelling on the mechanical properties of a pH-sensitive hydrogel for use in microfluidic devices. **Materials Science and Engineering C**, v. 24, n. 4, p. 575–581, 2004.

JUNGST, T. et al. Strategies and Molecular Design Criteria for 3D Printable Hydrogels. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 3, p. 1496–1539, 2016.

KRETLOW, J. D.; KLOUDA, L.; MIKOS, A. G. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 4–5, p. 263–273, 2007.

KUO, C. K.; MA, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 22, n. 6, p. 511–521, 2001.

LIN, C.; METTERS, A. T. Hydrogels in controlled release formulations : Network design and mathematical modeling ☆. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 58, n. 12–13, p. 1379–1408, 2006.

LIU, W. H.; YU, T. L.; LIN, H. L. Shear thickening behavior of dilute poly(diallyl dimethyl ammonium chloride) aqueous solutions. **Polymer**, v. 48, n. 14, p. 4152–4165, 2007.

LIU, Y. et al. Injectable dopamine-modified poly(ethylene glycol) nanocomposite hydrogel with enhanced adhesive property and bioactivity. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 19, p. 16982–16992, 2014.

LOH, S.; JARVIS, S. P. Visualization of Ion Distribution at the Mica-Electrolyte Interface. **Langmuir**, v. 26, n. 12, p. 9176–9178, 2010.

LOPEZ, B. G. C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: An alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677–687, 2015.

MA, J. et al. Preparation and characterization of sodium carboxymethylcellulose/poly(N-isopropylacrylamide)/clay semi-IPN nanocomposite hydrogels. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 6, p. 2221–2228, 2007.

MAITRA, J.; SHUKLA, V. K. Cross-linking in Hydrogels - A Review. American Journal of Polymer Science, v. 4, n. 2, p. 25–31, 2014.

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

MALLAKPOUR, S.; TUKHANI, M.; HUSSAIN, C. M. Recent advancements in 3D bioprinting technology of carboxymethyl cellulose-based hydrogels: Utilization in tissue engineering. Advances in Colloid and Interface Science, v. 292, p. 102415, 2021.

MAO, C.; CHEN, J. Interchain association of locust bean gum in sucrose solutions : An interpretation based on thixotropic behavior. **Food hydrocolloids**, v. 20, p. 730–739, 2006.

MELILLI, G. et al. DLP 3D printing meets lignocellulosic biopolymers: Carboxymethyl cellulose inks for 3D biocompatible hydrogels. **Polymers**, v. 12, n. 8, p. 1–11, 2020.

MOBARAKI, M. et al. Bioinks and bioprinting: A focused review. **Bioprinting**, v. 18, n. August 2019, p. e00080, 2020.

MOLDOVAN, L. et al. Comparison of biomaterial-dependent and -independent bioprinting methods for cardiovascular medicine. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 2, p. 124–131, 2017.

MONGONDRY, P.; TASSIN, J. F.; NICOLAI, T. Revised state diagram of Laponite dispersions. Journal of Colloid and Interface Science, v. 283, p. 397–405, 2005.

MORRISON, F. A. UNDERSTANDING RHEOLOGY. [s.l: s.n.].

MOUSER, V. H. M. et al. Development of a thermosensitive HAMA-containing bio-ink for the fabrication of composite cartilage repair constructs. **Biofabrication**, v. 9, n. 1, p. 1–24, 2017.

MUIZNIEKS, L. D.; KEELEY, F. W. Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix : A fibrous protein perspective. **biochimica et Biohysica Acta**, v. 1832, n. 7, p. 866–875, 2013.

MURPHY, S. V.; ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 773–785, 2014.

MURPHY, S. V.; SKARDAL, A.; ATALA, A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101 A, n. 1, p. 272–284, 2013.

NAGHIEH, S. et al. Printability of 3D printed hydrogel scaffolds: Influence of hydrogel composition and printing parameters. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 1, 2020.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 7, p. 543–557, 2009a.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, v. 8, n. 7, p. 543–557, 2009b.

NELSON, A.; COSGROVE, T. A Small-Angle Neutron Scattering Study of Adsorbed Poly (ethylene oxide) on Laponite. **Langmuir**, v. 20, n. 17, p. 2298–2304, 2004a.

NELSON, A.; COSGROVE, T. A Small-Angle Neutron Scattering Study of Adsorbed Poly(ethylene oxide) on Laponite. Langmuir, v. 20, n. 6, p. 2298–2304, 2004b.

NGUYEN, K. T.; WEST, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, n. 22, p. 4307–4314, 2002.

NICODEMUS, G. D.; BRYANT, S. J. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 14, n. 2, p. 149–165, 2008.

NING, F. et al. Additive manufacturing of carbon fiber reinforced thermoplastic composites using fused deposition modeling. **Composites Part B: Engineering**, v. 80, p. 369–378, 2015.

OLADAPO, B. I.; OSHIN, E. A.; OLAWUMI, A. M. Nanostructural computation of 4D printing carboxymethylcellulose (CMC) composite. **Nano-Structures and Nano-Objects**, v. 21, p. 100423, 2020.

OLIVEIRA, R. L. DE et al. Transparent organic–inorganic nanocomposites membranes based on carboxymethylcellulose and synthetic clay. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 415– 423, 2015.

OSSWALD, T. A.; RUDOLPH, N. Polymer Rheology. [s.l: s.n.].

OUYANG, L. et al. Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2016.

ÖZKAN, M. et al. Inkjet-printed platinum counter electrodes for dye-sensitized solar cells. **Organic Electronics**, v. 44, p. 159–167, 2017.

PAINEAU, E. et al. Aqueous suspensions of natural swelling clay minerals. 1. structure and electrostatic interactions. **Langmuir**, v. 27, n. 9, p. 5562–5573, 2011.

PAWAR, N.; BOHIDAR, H. B. Surface selective binding of nanoclay particles to polyampholyte protein chains Surface selective binding of nanoclay particles to polyampholyte. **The Journal of Chemical Physics**, v. 131, n. 045103, 2009a.

PAWAR, N.; BOHIDAR, H. B. Surface selective binding of nanoclay particles to polyampholyte protein chains. Journal of Chemical Physics, v. 131, n. 4, 2009b.

PAWLACZYK, M.; LELONKIEWICZ, M.; WIECZOROWSKI, M. Age-dependent biomechanical properties of the skin. **Postepy Dermatol Alergol.**, v. 30, n. 5, p. 302–306, 2013.

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

PEAK, C. W. et al. Nanoengineered Colloidal Inks for 3D Bioprinting. **Langmuir**, v. 34, n. 3, p. 917–925, 2018.

PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

PINTO, E. A.; DÁVILA, J. L.; D'ÁVILA, M. A. Rheological studies on nanocrystalline cellulose/alginate suspensions. Journal of Molecular Liquids, v. 277, p. 418–423, 2019.

PIRICH, L. et al. Biosensors and Bioelectronics Piezoelectric immunochip coated with thin fi lms of bacterial cellulose nanocrystals for dengue detection. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 92, n. December 2016, p. 47–53, 2017.

RAMACHANDRAN, R.; JUNG, D.; SPOKOYNY, A. M. Cross-linking dots on metal oxides. **NPG Asia Materials**, v. 11, n. 1, p. 9–12, 2019.

REIFLER, F. A. et al. Flexible ceramic-reinforced polyurethane composite coatings on synthetic fibres: Process of continuous liquid film coating and its influence on the coating thickness. **Composites Science and Technology**, v. 70, n. 8, p. 1207–1213, 2010.

RIBEIRO, A. et al. Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. **Biofabrication**, v. 10, n. 1, 2018.

RODELL, C. B. et al. Selective Proteolytic Degradation of Guest-Host Assembled, Injectable Hyaluronic Acid Hydrogels. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 1, n. 4, p. 277–286, 2015.

RODRIGUEZ, M. J. et al. 3D freeform printing of silk fibroin. Acta Biomaterialia, v. 71, n. February, p. 379–387, 2018.

RUTZ, A. L. et al. A multimaterial bioink method for 3D printing tunable, cell-compatible hydrogels. **Advanced Materials**, v. 27, n. 9, p. 1607–1614, 2015.

RUZICKA, B.; ZACCARELLI, E. REVIEW A fresh look at the Laponite phase diagram. **Soft Matter**, v. 7, p. 1268–1286, 2011a.

RUZICKA, B.; ZACCARELLI, E. A fresh look at the Laponite phase diagram. **Soft Matter**, v. 7, n. 4, p. 1268–1286, 2011b.

SANNINO, A.; DEMITRI, C.; MADAGHIELE, M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: Design and applications. **Materials**, v. 2, n. 2, p. 353–373, 2009.

SANNINO, A.; ESPOSITO, A.; NICOLAIS, L. Cellulose-based hydrogels as body water retainers. **Materials Science: Materials in Medicine**, v. 11, p. 247–253, 2000.

SARKER, M. et al. Influence of ionic crosslinkers (Ca 2+ /Ba 2+ /Zn 2+) on the mechanical and biological properties of 3D Bioplotted Hydrogel Scaffolds. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, v. 29, n. 10, p. 1126–1154, 2018.

SCHEXNAILDER, P. et al. Heterogeneity in nanocomposite hydrogels from poly(ethylene oxide) cross-linked with silicate nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 15, p. 2760–2766, 2009.

SCHEXNAILDER, P.; LOIZOU, E.; PORCAR, L. Heterogeneity in nanocomposite hydrogels from poly (ethylene oxide) cross-linked with silicate nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, p. 2760–2766, 2009.

SCHEXNAILDER, P.; SCHMIDT, G. Nanocomposite polymer hydrogels. Colloid and Polymer Science, v. 287, n. 1, p. 1–11, 2009.

SCHMIDT, G. et al. Small-Angle Neutron Scattering from Viscoelastic Polymer - Clay Solutions. **Macromolecules**, v. 35, p. 4725–4732, 2002a.

SCHMIDT, G. et al. Small-angle neutron scattering from viscoelastic polymer-clay solutions. **Macromolecules**, v. 35, n. 12, p. 4725–4732, 2002b.

SCHMIDT, G.; NAKATANI, A. I.; HAN, C. C. Rheology and flow-birefringence from viscoelastic polymer-clay solutions. **Rheologica Acta**, v. 41, n. 1, p. 45–54, 2002.

SHEIKHI, A. et al. Effect of ionic strength on shear-thinning nanoclay–polymer composite hydrogels. **biomaterials science**, v. 6, n. 8, p. 2073–2083, 2018.

SHEN, M. et al. Rheology and adhesion of poly(acrylic acid)/Laponite nanocomposite

hydrogels as biocompatible adhesives. Langmuir, v. 30, n. 6, p. 1636–1642, 2014.

SHUI, T. et al. Synthesis of sodium carboxymethyl cellulose using bleached crude cellulose fractionated from cornstalk. **Biomass and Bioenergy**, v. 105, p. 51–58, 2017.

SOLTAN, N. et al. Printability and Cell Viability in Bioprinting Alginate Dialdehyde-Gelatin Scaffolds. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 5, n. 6, p. 2976–2987, 2019.

SU, J. F. et al. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 1, p. 145–153, 2010.

SUKTHAM, K. et al. Efficiency of resveratrol-loaded sericin nanoparticles: Promising bionanocarriers for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, n. 1–2, p. 48–56, 2018.

SUN, W. et al. Effect of adsorbed poly(ethylene glycol) on the gelation evolution of Laponite suspensions: Aging time-polymer concentration superposition. Journal of Colloid and Interface Science, v. 376, n. 1, p. 76–82, 2012.

SUNTORNNOND, R. et al. A Mathematical Model on the Resolution of Extrusion Bioprinting for the Development of New Bioinks. **Materials**, v. 9, n. 9, 2016.

TARHINI, Z.; JARNY, S.; TEXIER, A. Viscoplastic properties of laponite-CMC mixes. **Data in Brief**, v. 11, p. 581–587, 2017.

THAKUR, A. et al. Injectable shear-thinning nanoengineered hydrogels for stem cell delivery. **Nanoscale**, v. 8, n. 24, p. 12362–12372, 2016.

THERRIAULT, D.; WHITE, S. R.; LEWIS, J. A. Rheological behavior of fugitive organic inks for direct-write assembly. **Applied Rheology**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2007.

THEUS, A. S. et al. Bioprintability: Physiomechanical and biological requirements of materials for 3d bioprinting processes. **Polymers**, v. 12, n. 10, p. 1–19, 2020.

THOMPSON, D. W.; BUTTERWORTH, J. T. The Nature of Laponite and Its Aqueous Dispersions pH Titration of Laponite Dispersions Analysis of Laponite Dispersion Media and

Cation-Exchange Capacity (CEC) Measurements. v. 15, n. I, p. 236–243, 1992.

TIGNER, T. J. et al. Comparison of Photo Cross Linkable Gelatin Derivatives and Initiators for Three-Dimensional Extrusion Bioprinting. **Biomacromolecules**, v. 21, n. 2, p. 454–463, 2020.

TIN, M. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cyto-toxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

TIWARI, P. et al. Exfoliation and gelation in laponite–carboxymethyl cellulose complexes and its application in sustained drug release. **Polymer Bulletin**, v. 77, n. 10, p. 5389–5406, 2020.

TOMÁS, H.; ALVES, C. S.; RODRIGUES, J. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, n. 7, p. 2407–2420, 2018.

TONGDEESOONTORN, W. et al. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. **Chemistry Central**, v. 5, p. 1–8, 2011.

ULLAH, F. et al. Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials** Science and Engineering C, v. 57, p. 414–433, 2015.

VACANTI, J. P.; LANGER, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **The lancet**, v. 34, n. 32–34, p. 1–3, 1999.

WANG, Q. et al. High-water-content mouldable hydrogels by mixing clay and a dendritic molecular binder. **Nature**, v. 463, n. 7279, p. 339–343, 2010.

WANG, Q. et al. 3D printing with cellulose materials. **Cellulose**, v. 25, n. 8, p. 4275–4301, 2018.

WILSON, S. A. et al. Shear-Thinning and Thermo-Reversible Nanoengineered Inks for 3D Bioprinting. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 50, p. 43449–43458, 2017.

WORLDWIDE, M. I. A Basic Introduction to RheologyMalvern Instruments Limited: Malvern. [s.l: s.n.]. WU, C. J. et al. Mechanically tough Pluronic F127/Laponite nanocomposite hydrogels from covalently and physically cross-linked networks. **Macromolecules**, v. 44, n. 20, p. 8215–8224, 2011.

WU, Q. et al. Steady and dynamic rheological behaviors of sodium carboxymethyl cellulose entangled semi-dilute solution with opposite charged surfactant dodecyl-trimethylammonium bromide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 339, n. 1, p. 236–242, 2009.

WÜST, S.; MÜLLER, R.; HOFMANN, S. Controlled Positioning of Cells in Biomaterials— Approaches Towards 3D Tissue Printing. [s.l: s.n.]. v. 2

XAVIER, J. R. et al. Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: A growth-factor-free approach. **ACS Nano**, v. 9, n. 3, p. 3109–3118, 2015.

XIE, F. et al. A cellulose/laponite interpenetrated polymer network (IPN) hydrogel: Controllable double- network structure with high modulus. **Polymers**, v. 10, n. 6, 2018.

XIN, X. et al. Hyaluronic-acid-based semi-interpenetrating materials. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 15, n. 9, p. 1223–1236, 2004.

XU, J. et al. Advances in the research of bioinks based on natural collagen, polysaccharide and their derivatives for skin 3D bioprinting. **Polymers**, v. 12, n. 6, 2020.

XU, P.; ERDEM, T.; EISER, E. A simple approach to prepare self-assembled, nacre-inspired clay/polymer nanocomposites. **Soft Matter**, v. 16, n. 23, p. 5497–5505, 2020.

YANG, X. .; ZHU, W. L. Viscosity properties of sodium carboxymethylcellulose solutions. **Cellulose**, v. 14, p. 409–417, 2007.

YASUDA, K.; ARMSTRONG, R. C.; COHEN, R. E. Shear flow properties of concentrated solutions of linear and star branched polystyrenes. **Rheologica Acta**, v. 20, n. 2, p. 163–178, 1981.

YOU, F. et al. 3D Printing of Porous Cell-Laden Hydrogel Constructs for Potential Applications in Cartilage Tissue Engineering. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 2, n. 7, p. 1200–1210, 2016.

ZAÏDI, W. et al. Carboxymethylcellulose and carboxymethylcellulose-formate as binders in MgH2-carbon composites negative electrode for lithium-ion batteries. **Journal of Power Sources**, v. 196, n. 5, p. 2854–2857, 2011.

ZELTINGER, J. et al. Adhesion, Proliferation, and Matrix Deposition. **Tissue engineering**, v. 7, n. 5, p. 557–572, 2001.

ZHAI, X. et al. 3D-Printed High Strength Bioactive Supramolecular Polymer/Clay Nanocomposite Hydrogel Scaffold for Bone Regeneration. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 3, n. 6, p. 1109–1118, 2017.

ZHAI, X. et al. 3D-Bioprinted Osteoblast-Laden Nanocomposite Hydrogel Constructs with Induced Microenvironments Promote Cell Viability, Differentiation, and Osteogenesis both In Vitro and In Vivo. **Advanced Science**, v. 5, n. 3, 2018.

ZHAO, W. et al. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 88, n. 3, p. 327–339, 2013.

ZUMAYA QUIÑONES, R. et al. Liberación De Ibuprofeno Empleando Hidrogeles De Poli(Carboximetil Celulosa-Co-Acrilamida). **Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen Iberoam. Polim**, v. 10, n. 106, p. 288–296, 2009.