

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

RAFAEL ABBOUD AZOUBEL

REOLOGIA E MANUFATURA ADITIVA DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS COMBINANDO PECTINA E NANOCRISTAIS DE CELULOSE

CAMPINAS 2022

RAFAEL ABBOUD AZOUBEL

REOLOGIA E MANUFATURA ADITIVA DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS COMBINANDO PECTINA E NANOCRISTAIS DE CELULOSE

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Rafael Abboud Azoubel e orientado pelo Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila.

CAMPINAS

2022

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

 Azoubel, Rafael Abboud, 1990-Reologia e manufatura aditiva de hidrogéis nanocompósitos combinando pectina e nanocristais de celulose / Rafael Abboud Azoubel. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.
Orientador: Marcos Akira d'Ávila. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.
1. Hidrogéis. 2. Nanocompósitos. 3. Impressão tridimensional. 4. Reologia. 5. Nanocristais de celulose. 6. Pectina. I. D'Ávila, Marcos Akira, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Rheology and additive manufacturing of nanocomposite hydrogels combining pectin and cellulose nanocrystals Palavras-chave em inglês: Hydrogels Nanocomposite Additive manufacturing Rheology Cellulose nanocrystals Pectin Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica Banca examinadora: Marcos Akira d'Ávila [Orientador] Ângela Maria Moraes José Luis Dávila Sánchez Data de defesa: 04-10-2022 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0003-1337-7838 - Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/7392917993164923

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

REOLOGIA E MANUFATURA ADITIVA DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS BIOCOMPATÍVEIS COMBINANDO PECTINA E NANOCRISTAIS DE CELULOSE

Autor: Rafael Abboud Azoubel Orientador: Marcos Akira d'Ávila

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila Presidente da Comissão Examinadora DEMM/FEM/UNICAMP

Profa. Dra. Ângela Maria Moraes DEMBio/FEQ/UNICAMP

Dr. José Luis Dávila Sánchez LAprint/CTI

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno:

Campinas, 04 de outubro de 2022.

Dedicatória

Aos meus queridos avôs: Reinaldo (in memorian) e Daâs (in memorian), o primeiro por me ensinar e motivar a ser um pesquisador; o segundo, por me ensinar que sem amor e união a vida não tem sentido.

Aos meus pais Alexandre e Aparecida, que me moldaram para ser quem sou e me apoiaram durante todo esse processo. Nunca vou ter palavras para agradecê-los o suficiente.

À minha irmã Mariana, minha gêmea e outra metade, que esteve comigo desde o primeiro dia de vida e continua me acompanhando e me dando forças. Obrigado, metade.

A todos que me acompanharam durante essa jornada, de perto ou de longe. Vocês podem não saber, mas foram essenciais durante todo esse processo.

Com muito amor e carinho,

Rafael Azoubel

Agradecimentos

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

Eu gostaria de expressar meus mais profundos agradecimentos a todas as pessoas e instituições que contribuíram de alguma forma para a finalização dessa dissertação:

Ao Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila pela orientação e suporte necessários para essa pesquisa, desde a minha entrada no programa de mestrado da FEM, no meio de uma pandemia. Muito obrigado pela oportunidade, outrora negada por outra instituição, e pela confiança que teve em mim sem mesmo conhecer meu trabalho.

Às minhas parceiras de laboratório e amigas de vida: Jéssica e Ingri. Sem vocês eu jamais teria conseguido terminar essa dissertação. Obrigado por tornarem os dias de experimentos mais leves e por terem me ensinado muitas coisas novas, obrigado pelas risadas, pelas parcerias em tempos difíceis e pelas várias opiniões que só me acrescentaram. Vocês são pessoas simplesmente maravilhosas e incríveis. Desejo apenas tudo de melhor na vida de vocês.

Às minhas amigas queridas da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP (FEQ-UNICAMP) Mariana Nagahara, Ana Nozaki, Monize Decarli e Paula Rosa. Meu muito obrigado por todo o apoio durante os momentos mais difíceis e por nunca terem me deixado desistir do sonho de fazer o mestrado.

Aos meus primos queridos, Amira, Maria Tereza, Tâmara, Luca, Leonardo, Munir, Felipe, Laura, Rodrigo, Raul e Janaína. Obrigado por sempre botarem um sorriso no meu rosto, até nos momentos de adversidades, obrigado por sempre me lembrarem o quanto a família é essencial e nos deixa mais leves.

À duas das minhas mais antigas amizades, Luiza e Marina, que sempre me motivaram a seguir meus sonhos mesmo quando eu não acreditava mais neles. Obrigado pelas parcerias nos desabafos, eventos e risadas. Amo vocês.

À Profa. Dra. Ângela Maria Moraes, que sempre acreditou em mim e viu em mim um potencial que nem eu sabia que existia. Muito obrigado por ter lutado por mim quando todas as chances estavam contra nós e por sempre ter me incentivado a continuar no caminho acadêmico e sempre se mostrando solícita quando precisei. Você é, de longe, uma das melhores professoras e pesquisadoras com quem eu já cruzei durante a minha vida.

Aos meus pais, Alexandre e Aparecida, por todo o suporte financeiro, emocional e pessoal. Vocês me trouxeram para esse mundo e essa dissertação jamais teria sido possível sem tudo o que vocês fizeram por mim, durante toda a minha vida. Não tenho nem palavras para agradecer.

Ao meu pai de santo Mário e aos meus irmãos e irmãs do Ilê Axé Ifé Ogum Oraminan, que sempre me deram forças, energias e carinho. Obrigado por serem a minha família em Campinas e sempre terem cuidado de mim com muito amor.

Às minhas queridas amigas da graduação que se fazem presentes diariamente nos meus dias: Luísa e Luiza. Obrigado por serem essas pessoas tão amáveis e tão incríveis que me abrem a mente sempre para novas coisas da vida e novas reflexões sobre o mundo em que vivemos. Amo vocês.

Os sonhos e o amor são as armas para a revolução. Comecei a minha.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

Madre Teresa de Calcutá

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez." George Bernard Shaw

RESUMO

Hidrogéis são estruturas tridimensionais formadas por polímeros hidrofílicos e que são capazes de absorver uma grande quantidade de água em sua estrutura. A capacidade da celulose de formar hidrogel, sua alta disponibilidade na natureza e possibilidade de utilização em medicina regenerativa, fizeram com que esse polímero recebesse bastante atenção nos últimos anos. A pectina, que já era um polímero natural muito usado na indústria alimentícia, se mostrou uma ótima alternativa para uso em hidrogéis com foco em medicina regenerativa. No presente trabalho, hidrogéis nanocompósitos de cristais de nanocelulose (CNC) e pectina foram desenvolvidos com a finalidade de serem utilizados como tinta de biomaterial em processos de impressão tridimensional por extrusão. Primeiramente, os comportamentos reológicos das soluções separadas de pectina e CNC foram analisados para que se pudesse, posteriormente, ver as mudanças ocorridas pela combinação dos dois materiais como um hidrogel. Os hidrogéis de CNC com pectina foram preparados em água com diferentes concentrações, tanto de pectina quanto de CNC, caracterizados reologicamente e, após análise dos dados coletados, as possíveis tintas promissoras foram definidas. Elas foram submetidas a testes de impressão tridimensional para definir a capacidade de impressão do gel de cada uma. Os testes reológicos das tintas mostraram comportamento pseudoplástico na varredura de viscosidade e, também, apresentaram comportamento predominantemente elástico (G' > G''), comportamento desejável para impressão tridimensional. A capacidade da tinta de gerar filamentos foi avaliada e fotos tiradas com a ajuda de um microscópio acoplado à impressora 3D. As tintas mais promissoras foram testadas a partir da formação de construtos com 10, 20 e 50 camadas. Ao final a tinta 3:10 wt.% pectina/CNC foi definida como a tinta mais promissora, comprovando os valores numéricos obtidos experimentalmente no reômetro. Após a definição da tinta mais promissora, a reticulação do material foi testada quanto ao tempo de reticulação e propriedades reológicas usando uma tinta não reticulada como controle. O tempo de reticulação não mostrou influência significativa nos testes reológicos. A estrutura impressa da tinta mais promissora apresentou boa resolução, até com 50 camadas, o que confirma a capacidade de impressão da tinta de pectina/CNC.

Palavras-chave: Hidrogéis nanocompósitos, impressão tridimensional, reologia, nanocristais de celulose, pectina.

ABSTRACT

Hydrogels are tridimensional structures formed by hydrophilic polymers which are able to absorb a large amount of water in their structure. Cellulose's capacity to form hydrogels, its huge availability in nature, and the possibility to be used in regenerative medicine made this polymer the center of attention in biomaterials in recent years. Pectin, which is a natural polymer widely used in the food industry, has proved to be a great alternative to use in hydrogels for regenerative medicine. In the present work, nanocomposite hydrogels of cellulose nanocrystals (CNC) and pectin were developed aiming their utilization as a biomaterial ink in extrusion-based tridimensional printing. First, the rheological behavior of pectin and CNC solutions was independently analyzed. This allowed observing the behavior changes when the materials were combined. CNC/pectin hydrogels were prepared in water with different concentrations, of pectin and CNC, rheologically characterized and, after analysis from collected data, the most attractive inks were selected. Those inks were subjected to three-dimensional printing to define the printability of each one. The inks' rheological tests showed a shear-thinning behavior within the viscosity sweep and, also, predominant elastic behavior (G' > G''), desirable for tridimensional printing. The ink's ability to form filaments was studied and photos were taken using a microscope attached to the 3D printer. The potential inks were tested regarding the formation of scaffolds with 10, 20 and 50 layers. At the end of these tests, the ink 3:10 wt.% pectin/CNC was chosen as the promising ink, confirming the numerical values obtained experimentally at the rheometer. After the definition of the most promising formulation, the material crosslinking was tested regarding crosslinking time and rheological properties using a non-crosslinked ink as a control. The crosslinking time showed no significant influence on rheological tests. The printed structure presented a good resolution, even with 50 layers, confirming the printability of the pectin/CNC inks.

Keywords: Nanocomposite hydrogels, additive manufacturing, rheology, cellulose nanocrystals, pectin.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Classificação de polímeros, divididos entre naturais e sintéticos. Adaptado de:
(KIRCHMAJER; GORKIN; IN HET PANHUIS, 2015)
Figura 2.2: Representação de reticulações físicas e químicas. Adaptado de: (UNAGOLLA;
JAYASURIYA, 2020)
Figura 2.3: Extração e produção dos nanocristais de celulose para aplicações biomédicas.
Adaptado de: (MALI; SHERJE, 2022)
Figura 2.4: Estrutura molecular da pectina. Fonte: (L. FLUTTO, 2003)
Figura 2.5: Representação dos três diferentes tipos de impressão por extrusão. Adaptado de:
(BOM et al., 2022)
Figura 2.6: Representação do comportamento da viscosidade como é previsto pelo modelo das
potências do fluido Newtoniano generalizado. Adaptado de: (MORRISON, 2001) 32
Figura 2.7: Propriedades reológicas essenciais para impressão 3D por extrusão: (a) alta
viscosidade zero cisalhamento, (b) pseudoplasticidade e (c) recuperação pós-impressão 36
Figura 3.1: Procedimento experimental do preparo das soluções de pectina e CNC 38
Figura 3.2: Procedimento experimental do preparo do hidrogel
Figura 3.3: Fotos do reômetro e equipamentos usados para realização dos testes
Figura 3.4: Microscopia de luz polarizada de concentrações de 1% (a) e 5% (b) de pectina e de
5% (c) e 10% (d) de CNC 41
Figura 3.5: Microscopia de luz polarizada para as diferentes concentrações de tinta. P1C5 (a),
P1C10 (b), P3C5 (c), P3C10 (d), P4C5 (e), P4C10 (f), P5C5 (g) e P5C10 (h)43
Figura 3.6: Curvas de viscosidade em estado estacionário para as soluções de pectina (m/m%).
As geometrias vazadas representam aos dados experimentais e as linhas contínuas representam o
ajuste do modelo de Cross
Figura 3.7: Curvas de viscosidade em estado estacionário para soluções de CNC (m/m). As
geometrias vazadas representam os dados experimentais e a linha contínua representa o ajuste de
leis de potência
Figura 3.8: Curvas de viscosidade obtidas experimentalmente comparadas com o ajuste das leis
de potência
Figura 3.9: Gráficos dos módulos de armazenamento (G' – geometrias cheias), de perda (G" –
geometrias vazias) e o fator de amortecimento ($tan\delta$) para a pectina

Figura 3.10: Gráfico dos módulos de armazenamento (G' – geometrias cheias) e de perda (G" –
geometrias vazias) para o CNC 50
Figura 3.11: Gráficos dos módulos de armazenamento (G' – geometrias cheias) e de perda (G" –
geometrias vazias) para as diferentes amostras de tinta
Figura 3.12: Gráfico do ensaio 3ITT para as diferentes concentrações de pectina
Figura 3.13: Gráfico do ensaio 3ITT para as diferentes concentrações de CNC
Figura 3.14: Gráfico do ensaio de 3ITT para as diferentes amostras de tinta
Figura 3.15: Recuperação da tinta P3C10, definida como a tinta mais promissora
Figura 4.1: Impressora 3DCloner Lab com seringa acoplada
Figura 4.2: Esquema representando a estrutura formada no teste de difusão e as áreas medidas 58
Figura 4.3: Esquema representando o filamento formado para avaliação da uniformidade do
filamento
Figura 4.4: Esquema representando a estrutura formada no teste de impressão e as áreas medidas
Figura 4.5: Formação de filamentos nas formulações de tintas propostas. As formulações com
concentração crescende de pectina e 5% de CNC (a,b,c,d) e 10% (e,f,g,h). O traço branco ao lado
do filamento da figura h corresponde a 0,58mm
Figura 4.6: Testes de difusão nas tintas P3C10 (a,b,c), P4C10 (d,e,f) e P5C10 (g,h,i) nas
velocidades: 2,33 (a,d,g), 2,96 (b,e,h) e 3,56 (c,f,i)
Figura 4.7: Gráficos para cada tinta mostrando a difusão nos diferentes tamanhos de poro 62
Figura 4.8: Filamentos formados nas tintas P3C10 (a,b,c), P4C10 (d,e,f) e P5C10 (g,h,i) nas
velocidades: 2,33 (a,d,g), 2,96 (b,e,h) e 3,56 (c,f,i)
Figura 4.9: Gráfico com a variação do diâmetro do filamento, em porcentagem, em função da
velocidade de extrusão
Figura 4.10: Construtos formados nas tintas P3C10 (a,b,c), P4C10 (d,e,f) e P5C10 (g,h,i) nas
velocidades: 2,33 (a,d,g), 2,96 (b,e,h) e 3,56 (c,f,i)
Figura 4.11: Gráfico mostrando a uniformidade dos poros, sendo 1 o mais uniforme possível 65
Figura 4.12: O modelo da "caixa de ovo" com a presença do cálcio, para a pectina, baseado em
(GAWKOWSKA; CYBULSKA; ZDUNEK, 2018)
Figura 4.13: Amostra P3C10 no processo de reticulação. A figura da esquerda representa o
processo antecessor à reticulação e, da direita, o posterior

 Lista de Tabelas

Tabela 1: Modelos matemáticos para ajustes de curvas de viscosidade	. 33
Tabela 2: Valores obtidos a partir do modelo de Ostwald-de Waele para cálculo do ajuste	. 48

Sumário

1.	INT	RODUÇÃO	16
	1.1	Visão geral	16
	1.2	Objetivos	
	1.2.1	Objetivo geral	
	1.2.2	Objetivos específicos	
2.	REV	VISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
	2.1	Hidrogéis	22
	2.2	Hidrogéis nanocompósitos	
	2.3	Hidrogéis com nanocelulose	
	2.4	Pectina	
	2.5	Manufatura aditiva e bioimpressão	
	2.6	Reologia e caracterizações reológicas	30
	2.6.1	Pseudoplasticidade	32
	2.6.2	Propriedades viscoelásticas	33
	2.6.3	Comportamento tixotrópico	35
3.	CO	MPORTAMENTO REOLÓGICO DAS SOLUÇÕES DE PECTINA/CNC	37
	3.1	Metodologia experimental	37
	3.1.1	Materiais	
	3.1.2	Preparo das soluções de Pectina e de CNC	
	3.1.3	Preparo do hidrogel de Pectina e de CNC	
	3.1.4	Caracterização reológica	
	5.1.5	Caracterização reologica	
	3.2	Resultados e discussão	41
	3.2.1	Microscopia de luz polarizada (POM)	
	3.2.2	Caracterização do cisalhamento em estado estacionário (<i>steady-shear state</i>)	
	3.2.3	Cisalhamento oscilatorio de pequena amplitude (SAUS)	
	5.2.4	Ensaios de fixotropia em tres intervaios (3111)	
4. D	IMP F CFI	'KESSAU 3D POR EXTRUSAU DE HIDROGEIS NANOCOMPOSITOS A UL OSF	BASE 55
D			
	4.1	Metodologia Experimental	
	4.1.1	Impressão Tridimensional	
	4.1.2	Medidas e caracterização dos testes de impressão	
	4.2	Resultados e discussão	60
	4.2.1	Impressão 3D por extrusão	60
	4.2.2	Reticulação da tinta	66
5.	COI	NCLUSAO	69
6.	SUG	GESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	70
R	EFERÍ	ÈNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo, uma visão geral do trabalho será apresentada, bem como os objetivos propostos para o presente projeto.

1.1 Visão geral

Atualmente, a manufatura aditiva - popularmente conhecida como impressão 3D - vem obtendo grande destaque, tanto no meio acadêmico quanto no industrial, devido à sua extensa gama de aplicações, inclusive na área médica, onde aplicações são encontradas na engenharia de tecidos e medicina regenerativa embora, nesta, suas aplicações ainda sejam um pouco limitadas. Em aplicações nessa área, usualmente são utilizados para impressão sistemas poliméricos biocompatíveis hidrofílicos, chamados de tintas (*inks*), que são normalmente reticulados, resultando em estruturas de hidrogéis. A tecnologia da impressão 3D foi recentemente nomeada como uma das tecnologias mais promissoras para fabricação de construtos aplicáveis na engenharia de tecidos (MORONI et al., 2018).

O avanço das pesquisas nesta área resultou em uma nova aplicação da manufatura aditiva – a bioimpressão, que combina constituintes biológicos, como células, fatores de crescimento e biomateriais, com as técnicas de impressão 3D. No campo da bioimpressão, uma gama de técnicas pode ser aplicada para produzir arquiteturas biológicas ou *scaffolds* com propriedades específicas para vários tipos de aplicações na área da engenharia de tecidos. Ainda no contexto da bioimpressão, o termo biotinta (*bioink*) é comumente utilizado para designar formulações contendo células que podem ser utilizadas com uma tecnologia de bioimpressão. Sendo assim, biomateriais que compõem as formulações de biotintas devem ser capazes de servir como um meio de carreamento de células, bem como ter propriedades físicas e mecânicas adequadas para garantir a estrutura do *scaffold* (VAN KAMPEN et al., 2019). O tipo da técnica de bioimpressão a ser usada varia de acordo com a aplicação, onde as principais são: bioimpressão assistida por laser, jato de tinta, extrusão e por micro válvulas. Cada uma dessas técnicas é baseada em diferentes processos físicos que definem o critério de uma biotinta adequada (i.e. perfil reológico, fotoreatividade, estabilidade térmica e oxidativa) (DONDERWINKEL; VAN HEST; CAMERON, 2017). Dentre as técnicas de impressão 3D aplicadas em engenharia de tecidos e bioimpressão, destaca-se a

impressão por extrusão, devido a seu baixo custo e a possibilidade de usar impressoras 3D desktop de projeto aberto. Na bioimpressão por extrusão, biotintas são colocadas em seringas plásticas descartáveis e, então, extrudadas pneumática ou mecanicamente em substratos estéreis. Ao aplicar pressão, biotintas viscosas são depositadas no formato de filamentos cilíndricos. A impressão por extrusão é altamente versátil sendo, assim, a mais indicada para engenharia tecidual e é o tipo de impressão usado neste projeto (MATAI et al., 2020).

Os materiais usados em aplicações em bioimpressão devem ser biodegradáveis e atóxicos. Mesmo com uma gama extensa de polímeros biocompatíveis disponíveis, os requisitos necessários para o uso de um determinado material como tinta (ou biotinta) para impressão por extrusão inviabilizam o uso de muitos deles (LIU et al., 2019). Além do requisito de biocompatibilidade, as tintas para impressão por extrusão devem ser formuladas de modo a garantir uma impressão adequada, resultando em um *scaffold* com características geométricas e mecânicas adequadas a uma dada aplicação. A grande maioria dos materiais envolvidos foca em formulações aquosas de polímeros hidrofílicos e, dentre estes, a preferência se dá aos hidrogéis ou soluções precursoras de hidrogéis (VAN KAMPEN et al., 2019).

O início do uso de hidrogéis como biomaterial pode ser datado a meados de 1960, quando Wichterle e Lim reportaram, pela primeira vez, hidrogéis de metacrilato de hidroxietila (HEMA) para uso biológico (WICHTERLE; LIM, 1960). Hidrogéis, diferentemente de scaffolds sólidos, podem encapsular e reter células em um ambiente tridimensional formado por uma matriz gelificada (KUO et al., 2006). Hidrogéis são promissores como tintas e biotintas uma vez que podem ser biocompatíveis, apresentar baixa citotoxicidade e alta capacidade de absorção de água, o que confere uma similaridade estrutural à matriz extracelular (MARKSTEDT et al., 2015). Alguns polissacarídeos são mais comumente usados em bioimpressão como, por exemplo, ácido hialurônico (HA) (ANTICH et al., 2020), quitosana (ALMEIDA et al., 2014) e alginato (KHALIL; SUN, 2009). Porém, para que sejam aptos à impressão por extrusão, os hidrogéis devem ter propriedades reológicas específicas para garantir o processo de deposição do material e garantir a integridade do *scaffold* após a impressão. Especificamente, esses devem apresentar comportamento viscoso altamente pseudoplástico e características viscoelásticas semissólidas, para que possam manter a estrutura tridimensional durante e após a impressão (MARKSTEDT et al., 2015). Também, quando falamos em hidrogéis para scaffolds de tecidos, um dos requisitos necessários é prover um suporte mecânico adequado, uma vez que módulos elásticos para tecidos moles variam entre 10 kPa e 350 MPa (YANG et al., 2001). O módulo elástico de hidrogéis é, geralmente, diretamente proporcional à densidade da reticulação aplicada (CHUNG; BURDICK, 2008).

Hidrogéis nanocompósitos são estruturas poliméricas tridimensionais incorporadas com nanopartículas ou nanoestruturas que ajudam a reforçar a estrutura do hidrogel e fornecer funções bioativas desejáveis (YUAN et al., 2020). Nas últimas décadas, hidrogéis nanocompósitos têm se destacado de uma maneira exponencial em vários campos da engenharia biomédica, como, por exemplo, liberação de fármacos (JAVANBAKHT; NAMAZI, 2018; RAKHSHAEI et al., 2020), cicatrização de feridas (KONERU; DHARMALINGAM; ANANDALAKSHMI, 2020; LIU et al., 2020) e osteogênese (CHEN et al., 2020). Neste tipo de hidrogéis, as nanopartículas ou nanoestruturas são incorporadas na estrutura do hidrogel tanto por ligações covalentes (WIN et al., 2018a), quanto por ligações secundárias (PARKER et al., 2018). Na impressão por extrusão, a associação de polímeros com nanopartículas permite o desenvolvimento de formulações de tintas com propriedades reológicas adequadas para impressão. Dentre os sistemas de hidrogéis nanocompósitos utilizados em impressão por extrusão, destacam-se os hidrogéis à base de polissacarídeos com nanopartículas de celulose. Neste projeto serão desenvolvidas tintas de hidrogéis nanocompósitos de pectina com nanocristais de celulose.

A celulose é o polímero natural mais abundante no planeta, com uma produção anual estimada de 10¹² toneladas (EDGAR; COMPANY; SCHULTZ, 1999), é, também, um biopolímero reticulado por ligações de hidrogênio. A existência de muitos grupos hidroxila em uma única cadeia facilita as ligações de hidrogênio com o oxigênio adjacente, formando uma cadeia de moléculas estáveis e rígidas (THOMAS et al., 2020). Sendo assim, o encadeamento complexo de ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose faz com que ela seja insolúvel em solventes orgânicos mais comuns e, também, em água (MOHD et al., 2017). Em termos gerais, a nanocelulose é definida como material celulósico que possua pelo menos uma de suas dimensões (diâmetro, largura ou comprimento) na escala nanométrica. Além disso, a nanocelulose é dividida em três classificações: nanocelulose bacteriana (BNC), nanocristais de celulose são considerados materiais em potencial para solucionar múltiplos problemas de materiais já existentes (ZHOU et al., 2019). Se derivados de fontes de biomassa, possuem um comprimento de 100-200 nm e seções transversais de 5-10 nm (AZIZI SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005). Quando comparada com outros produtos derivados da celulose, a CNC se destaca devido à sua pureza química, estrutura rígida, propriedades

anfifílicas e habilidade de redispersão a partir de sua formulação em pó (HEUX; CHAUVE; BONINI, 2000).

A pectina é um polímero de carboidratos com alta massa molecular, constituída de uma cadeia de unidades de ácido galacturônico que são conectadas por ligações glicosídicas α-1,4, e que está presente em, basicamente, todas as plantas, contribuindo para a estrutura celular. O termo pectina engloba um número de polímeros que variam de acordo com as respectivas massas molares, configurações químicas e teor de açúcares neutros. Este composto, juntamente com a celulose, lignina e hemicelulose, são os principais polissacarídeos estruturais que compõem células de plantas, sendo que a pectina é o fator determinante na flexibilidade da parede celular, uma vez que pode ser altamente hidratada. A palavra "pectina" vem da palavra grega pektos que significa firme e dura, reafirmando a capacidade da pectina em formar géis (FLUTTO, 2003; SHTEIN et al., 2017). Além da biodegradabilidade e citocompatibilidade, ela possui uma capacidade de reticulação relativamente fácil, a depender do grau de esterificação. Hidrogéis de pectinas com baixo grau de esterificação (abaixo de 50%) possuem um mecanismo de reticulação similar ao do alginato, formando hidrogéis iônicos na presença de cátions bivalentes ou multivalentes (BANKS et al., 2017; RADHAKRISHNAN et al., 2017; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Formulações contendo pectina são candidatas promissoras para várias aplicações biomédicas, engenharia de tecidos ossos e pele (AMIRIAN al.. como para et 2021; RAJABNEJADKELESHTERI et al., 2021) e sistemas de liberação de fármacos (AURIEMMA et al., 2020; LI et al., 2021a) devido à sua não-toxicidade, baixo custo, propriedades anti-inflamatórias bactericidas. Considerando sua boa biocompatibilidade (ZHAO et al., 2020b), e biodegradabilidade (GONZÁLEZ MORENO et al., 2021) e trabalhos publicados que relatam a capacidade desse polímero em inibir atividades de macrófagos, bem como seu efeito antiinflamatório (LI et al., 2021b; XIONG et al., 2021), pode-se concluir que a pectina possui grande potencial para aplicações em engenharia de tecido.

Embora haja, na literatura, publicações sobre impressão por extrusão de hidrogéis nanocompósitos contendo nanocelulose, são poucos os estudos com pectina e CNC, apesar de ser um sistema promissor para aplicações em tintas para impressão por extrusão (CHAICHI et al., 2017). GONZÁLEZ MORENO et al., 2021 fizeram análises ópticas e térmicas de pectina, nanocristais de celulose e para as misturas, utilizadas no formato de filme. No caso da pectina, três bandas de absorbância significativas foram detectadas na faixa de UV utilizada. A banda mais intensa em 200-250 nm foi atribuída a uma transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$ dos grupos C-H e C-C, a segunda em

250-300 nm para uma transição n $\rightarrow \sigma^*$ das ligações -O-, e a terceira e menos intensa em 320–380 nm para n $\rightarrow \pi^*$ transições de ligações C=O de grupos éster e ácido carboxílico presentes no polissacarídeo. O espectro de absorbância CNC apresentou apenas transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e n $\rightarrow \sigma^*$ em concordância com a ausência de grupos C=O em sua estrutura química. Para as misturas, os espectros de absorbância e reflexão mostraram propriedades intermediárias, com intensidade da banda de absorbância aumentando com o teor de pectina. Este fenômeno pode estar associado às modificações morfológicas (aumento do diâmetro das fibras) e estruturais descritas acima (distorção da estrutura em camadas e perda de cristalinidade) induzidas pela incorporação de pectina.

Grande parte das publicações que caracterizam hidrogéis foca na performance do hidrogel em suas características finais, dando pouca atenção ao comportamento anterior à reticulação. No entanto, o comportamento da solução pré-reticulada é crucial para garantir uma impressão adequada, inclusive para que esses materiais possam ser aplicados efetivamente em cirurgias (TOWNSEND et al., 2019). A análise da fidelidade do formato pós impressão está se tornando uma prática padrão para bioimpressão, entretanto, essa análise costuma ser mais qualitativa do que quantitativa, isso quando ela existe. Um método comum e semiquantitativo de avaliar a fidelidade do formato de uma tinta ou biotinta é via análise de imagem, no qual a qualidade de impressão é feita por análise de fotografias ao imprimir diferentes geometrias (DIAMANTIDES et al., 2017; HE et al., 2016; OUYANG et al., 2016). Além deste, ensaios de reologia, a serem realizados em um reômetro, darão informações importantes com relação aos comportamentos reológicos dos materiais como: a tensão de cisalhamento, comportamento durante o cisalhamento, tempo de recuperação e a tensão de deformação. A padronização de caracterizações destes pontos permitirá melhores comparações entre estudos de novas biotintas, com o intuito de criar padrões de comportamento para que uma biotinta esteja de acordo a fim de ser usada para a bioimpressão (TOWNSEND et al., 2019). A capacidade de impressão do gel é definida pelas propriedades reológicas dos materiais e deve ser ajustada ao processo de fabricação para gerar arquiteturas com alta fidelidade de forma. Além disso, análises reológicas podem ajudar a acelerar o desenvolvimento de materiais que podem ser impressos e diversos grupos demonstraram técnicas de caracterizações úteis e, também, introduziram modelos matemáticos que ajudaram a dar um entendimento mais aprofundado sobre a capacidade de impressão de materiais baseada em análises reológicas. Por fim, também é de conhecimento geral que a causa majoritária de danos celulares e perda de viabilidade geral são as forças cisalhantes presentes na agulha durante a impressão (PAXTON et al., 2017; TIAN et al., 2009). Um grupo, inclusive estudou o dano mecânico em uma célula durante a bioimpressão (LI et al., 2015).

Sendo assim, o presente trabalho foi dividido em 6 capítulos. O primeiro, este, uma introdução com os objetivos do trabalho; o segundo sendo a revisão bibliográfica com informações pertinentes para o entendimento dos assuntos tratados nessa dissertação; o terceiro consta os estudos reológicos tanto das soluções de pectina e dispersões de CNC, quanto das formulações propostas da tinta; o quarto diz respeito aos ensaios na impressora tridimensional e detalha os diferentes ensaios feitos no processo de impressão; o quinto possui uma conclusão geral sobre todos os resultados obtidos durante o trabalho e, finalmente, o sexto possui sugestões para trabalhos futuros.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um hidrogel composto por pectina e nanocristais de celulose para ser usado como tinta de biomaterial em processos de impressão por extrusão.

1.2.2 Objetivos específicos

- a) Estudar a reologia das soluções de pectina e das suspensões de nanocristais de celulose;
- b) Caracterizar reologicamente as diferentes formulações contendo pectina e nanocristais de celulose;
- c) Avaliar a influência dos parâmetros de impressão na fidelidade de forma dos construtos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, serão apresentadas as características principais dos polímeros utilizados para a obtenção da tinta, introdução aos hidrogéis, classificação e obtenção do hidrogel estudado no presente trabalho, introdução aos hidrogéis nanocompósitos, bem como aspectos importantes sobre impressão tridimensional, bioimpressão e reologia.

2.1 Hidrogéis

Hidrogéis são estruturas tridimensionais formadas por homopolímeros, copolímeros ou macrômeros hidrofílicos, para formar matrizes poliméricas. Esses polímeros são geralmente usados acima da sua temperatura de transição vítrea (T_g) e são, em sua maioria, moles e elásticos devido à sua compatibilidade termodinâmica com a água (SLAUGHTER et al., 2009). É uma classe de materiais promissora para confecção de construtos, uma vez que sua estrutura e composição é relativamente parecida com a do tecido natural e, com isso, podem ser usados como uma matriz extracelular (ECM) (CHEN, 2019).

Hidrogéis podem ser classificados em dois tipos: naturais e sintéticos (Figura 2.1). Hidrogéis naturais são, como o próprio nome diz, encontrados e isolados de fontes biológicas como, por exemplo, seda (KUNDU; KUNDU, 2012), alginato e ácido hialurônico (ANTICH et al., 2020), quitosana (ALMEIDA et al., 2014), dentre outros. Esse tipo de hidrogel tende a ter um melhor ambiente para adesão e proliferação celular, mas geralmente possui menor resistência mecânica quando comparado aos sintéticos e, por esse motivo, modificações ou processamentos adicionais são necessários para fazer com que o biomaterial mimetize o tecido desejado. Além disso, uma pequena modificação na distribuição sequencial de géis naturais pode afetar drasticamente a função e a sobrevivência de células encapsuladas na matriz polimérica (BOSNAKOVSKI et al., 2006; KUNDU; PUTNAM, 2006).



Figura 2.1: Classificação de polímeros, divididos entre naturais e sintéticos. Adaptado de: (KIRCHMAJER; GORKIN; IN HET PANHUIS, 2015)

Hidrogéis sintéticos possuem muitas das características desejáveis dos hidrogéis naturais mas sem algumas de suas desvantagens como, por exemplo, degradação e dificuldade de armazenamento a longo prazo (CUNLIFFE; PENNADAM; ALEXANDER, 2004). Além disso, os polímeros sintéticos são produzidos com mais facilidade e podem ser modificados de acordo com as propriedades desejadas, além de não haver presença de patógenos, porém, deve-se ter cuidado para que não haja resquício de reagentes tóxicos não polimerizados no hidrogel (SUNG et al., 1999).

Hidrogéis são formados pela reticulação das cadeias poliméricas em um meio aquoso por meio de vários mecanismos, como emaranhamento físico, interação iônica, reticulação química (Figura 2.2). A reticulação física depende, em sua maioria, das propriedades nativas do polímero e, por isso, a capacidade de controle do microambiente é bastante limitada. Entretanto, a vantagem desse processo é que ele não necessita de uma modificação química complexa das cadeias e, também, é um processo geralmente reversível. Já a abordagem química sempre requer condições de processo controladas e, em razão disso, o microambiente resultante é mais complexo e preciso (UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2020).



Figura 2.2: Representação de reticulações físicas e químicas. Adaptado de: (UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2020)

Embora ainda muito utilizados, esses hidrogéis reticulados convencionais possuem a desvantagem de propriedades mecânicas inferiores, o que restringe a sua utilização. Para suprir essa necessidade, algumas alternativas foram criadas e, dentre elas, está a utilização de hidrogéis contendo nanopartículas, também conhecidos como hidrogéis nanocompósitos (WIN et al., 2018a).

2.2 Hidrogéis nanocompósitos

O termo *nano* é usado para designar o tamanho do objeto, tendo como referência o valor de 10^{-9} nas unidades do SI. Porém, o termo *nanoescala* é usado para designar não um valor, mas um intervalo de valores que varia de 1 nm a 100 nm (ISO/TS 80004-2:2005).

Hidrogéis nanocompósitos, também conhecidos como hidrogéis híbridos, podem ser definidos como redes poliméricas hidratadas, física ou quimicamente ligadas entre elas e/ou com nanopartículas ou nanoestruturas (GAHARWAR; PEPPAS; KHADEMHOSSEINI, 2014). A incorporação de nanomateriais a polímeros modifica as propriedades dos hidrogéis como, por exemplo, respostas ao estímulo de radiações, temperatura e campos elétricos/magnéticos; maior resistência mecânica e adesão à superfícies (especialmente pele ou tecidos moles) (RAFIEIAN et

al., 2019). A área de interesse de hidrogéis nanocompósitos começou a crescer por volta de 2004 e, no ano de 2019, chegou a praticamente 700 publicações no ano, sendo que, destas, aproximadamente 120 eram da área de hidrogéis nanocompósitos para engenharia de tecidos (ZHAO et al., 2020a).

Publicações podem ser encontradas em diversas áreas como em sistemas de *drug delivery* para regeneração óssea (CHEN et al., 2020), reforço de nanomateriais ao hidrogel original (WIN et al., 2018b), hidrogéis contendo nanopartículas para melhorar a cicatrização de ferimentos (KONERU; DHARMALINGAM; ANANDALAKSHMI, 2020), e hidrogéis injetáveis contendo nanocristais para engenharia tecidual (GHORBANI; ROSHANGAR; SOLEIMANI RAD, 2020) e, também, hidrogéis nanocompósitos para uso em manufatura aditiva (GATENHOLM et al., 2016). Dentre os nanomateriais utilizados atualmente, destaca-se a nanocelulose.

2.3 Hidrogéis com nanocelulose

A celulose é um dos polímeros naturais mais importantes, sendo uma matéria prima praticamente inesgotável e uma fonte de materiais sustentáveis imprescindíveis para a indústria. Há muito tempo, a celulose vem sendo usada em suas formas mais brutas: madeira e fibras vegetais como fonte de energia, materiais de construção e até roupas (KLEMM et al., 2011).

Normalmente, uma fibra individual de celulose (com diâmetro de $5 - 20 \ \mu m$) é formada a partir de um feixe de nanofibras (com diâmetro de $3 - 20 \ nm$). Essas nanofibras são formadas por domínios monocristalinos alongados e separados periodicamente por regiões mais desordenadas (NISHIYAMA et al., 2003). Esses domínios cristalinos podem, então, ser isolados por um processo de hidrólise ácida das regiões menos ordenadas para gerar partículas em nanoescala, conhecidas como CNC, ou nanocristais de celulose, que vêm sendo extraídos de uma grande variedade de fontes naturais como, por exemplo, plantas (Figura 2.3) e bactérias (RÅNBY, 1951).

Grupos hidroxila presentes nas unidades nativas da celulose e organossulfatos introduzidos durante a hidrólise com ácido sulfúrico contribuem para o caráter hidrofílico do CNC. Os nanocristais, quase neutros, obtidos por hidrólise em HCl apresentam dispersão limitada em água, enquanto aqueles obtidos pela hidrólise em ácido sulfúrico são mais estáveis em uma ampla faixa de valores de pH, uma vez que o valor do pKa dos grupos sulfato gira em torno de 1,9 (KLEMM et al., 2011).



Figura 2.3: Extração e produção dos nanocristais de celulose para aplicações biomédicas. Adaptado de: (MALI; SHERJE, 2022)

Devido à sua capacidade de modificar matrizes poliméricas e estimular a proliferação celular, os CNC desempenham um papel fundamental na área da engenharia tecidual (MALI; SHERJE, 2022). Seu uso já está mostrado em várias aplicações, como *scaffolds* injetáveis, enxertos vasculares, reconstrução de tecidos, fortalecimento da adesão de implantes ósseos, e *drug delivery* (GRISHKEWICH et al., 2017). As propriedades reológicas do CNC são importantes para várias aplicações, já que ele pode servir como modificador reológico e estabilizante em emulsões, fluidos para perfuração de petróleo (KÁDÁR; SPIRK; NYPELÖ, 2021).

2.4 Pectina

A pectina é um polímero de alta massa molar que está presente nas plantas, tendo como papel principal a contribuição na estrutura celular, agindo como um tipo de cola facilitando a adesão e separação celular mas, também, modula o crescimento e a forma celular (ASSIFAOUI; CHAMBIN, 2020; DAHER; BRAYBROOK, 2015). O termo "pectina" cobre um número de polímeros que variam de acordo com a sua massa molar, configuração química e teor de açúcares

naturais sendo que, diferentes plantas produzem diferentes tipos de pectina com diferentes tipos funcionais. A palavra "pectina" vem da palavra grega *pektos*, que significa firme e duro, refletindo na habilidade da pectina em formar géis. É um polímero que consiste em uma cadeia de unidades de ácido galacturônico que são ligadas por ligações glicosídicas $\alpha - 1,4$. A cadeia de ácido galacturônico é parcialmente esterificada como ésteres metílicos. As moléculas de pectina podem ter um peso molecular de mais de 200.000, correspondendo a um grau de polimerização de até 1.000 unidades (Figura 2.4) (L. FLUTTO, 2003).



Figura 2.4: Estrutura molecular da pectina. Fonte: (L. FLUTTO, 2003)

A pectina é um polissacarídeo estrutural com boa biodegradabilidade e citocompatibilidade e que pode ser muito hidratada (BANKS et al., 2017). O mecanismo de gelificação deste material varia com o seu grau de metil-esterificação (DE – *degree of methyl-esterification*). Pectina de alta esterificação (HMP, com DE > 50%) tem sua reticulação através de ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas em solução de baixo pH com um alto teor de açúcar. Já a pectina de baixa esterificação (LMP, com DM < 50%), tem sua reticulação feita por ligações de íons divalentes, como o Ca^{2+} , e os grupos carboxila livres, que é similar ao mecanismo de reticulação do alginato (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Nos últimos anos, a pectina tem atraído grande interesse na área de medicina regenerativa. Isso aconteceu devido ao fato de ser atóxica e, portanto, considerada segura em aplicações biomédicas (LIU et al., 2003; WATTS; SMITH, 2009), além de seu custo de produção ser relativamente baixo (SUNGTHONGJEEN et al., 2004), e apresentar alta disponibilidade na natureza (BENEKE; VILJOEN; HAMMAN, 2009). Além disso, como seus mecanismos de reticulação são geralmente simples, há um aumento no interesse no desenvolvimento de hidrogéis de pectina em aplicações em sistemas de liberação de fármacos e engenharia de tecidos (MUNARIN; TANZI; PETRINI, 2012; SMITH; MOXON; MORRIS, 2016). Além de todas as propriedades já mencionadas sobre a pectina, sua aceitável estabilidade em condições ácidas e maiores temperaturas promovem sistemas de liberação local de fármacos. Estudos recentes

mostram materiais com pectina usados para liberação de fármaco na região do cólon, uma vez que a pectina é quase totalmente degradada por bactérias do cólon, mas se mostra resistente a proteases e amilase, que são ativas no trato gastrointestinal superior (EIVAZZADEH-KEIHAN et al., 2022; KHOTIMCHENKO, 2020).

2.5 Manufatura aditiva e bioimpressão

Manufatura aditiva é o processo de converter um desenho técnico digital em um objeto tridimensional sólido (MISHRA, 2016). Todas as técnicas de manufatura aditiva são geralmente realizadas em duas etapas, sendo a primeira o desenho do objeto usando algum programa computacional e a segunda é a deposição/formação do objeto pela impressora (MOHAMMED et al., 2021). Existem diferentes tecnologias de manufatura aditiva, dentre elas destacam-se a estereolitografia (SLA), a modelagem por fusão e deposição (FDM), a sinterização seletiva a laser (SLS), a impressão por jato de tinta (*inkjet*) e a impressão por extrusão (ZHANG; WANG, 2019).

A manufatura aditiva pode produzir construtos para pesquisas e uso médico com melhor controle sobre os tamanhos de poros, além da possibilidade de obter estruturas com geometrias mais complexas quando comparada à outros métodos de fabricação (KUN et al., 2019). Além disso, essa tecnologia já foi utilizada para produzir diferentes *scaffolds* para uso em traqueia (GAO et al., 2017), osso (PATI et al., 2015), esôfago (PARK et al., 2016) e válvula aórtica (HOCKADAY et al., 2012). Avanços recentes na manufatura aditiva levaram a um outro método de impressão: a bioimpressão, que consiste na aplicação da manufatura aditiva com a adição de células vivas ao processo, com a preservação da viabilidade celular no interior das geometrias impressas (KUN et al., 2019).

GROLL et al. (2016) redefiniu o termo "biofabricação" como sendo "a geração automatizada de produtos biologicamente funcionais com organização estrutural a partir de células vivas, moléculas bioativas biomateriais, agregados de células como microtecidos, ou construtos híbridos de célula e materiais por meio de bioimpressão ou biomontagem e subsequente processo de maturação do tecido". Sendo assim, a bioimpressão envolve o uso da tecnologia da impressão 3D para padronizar espacialmente células vivas viáveis em conjunto com outros materiais biológicos não vivos (MURPHY; ATALA, 2014). Vários trabalhos em bioimpressão 3D foram realizados nos últimos anos, prometendo novas possibilidades no campo da engenharia de tecidos, que vão desde sua aplicação em investigações farmacológicas até a fabricação de órgãos (ZHANG et al., 2017).

Dentre os métodos de bioimpressão 3D o mais usado atualmente é o da extrusão, uma vez que é o método mais versátil e mais acessível. A bioimpressão por extrusão faz uso da deposição em camadas de filamentos contendo células suspensas em um gel (biotinta), resultando em estruturas tridimensionais. A deposição do filamento por extrusão pode se dar através de sistemas pneumáticos, de pistão e acionados por parafuso (Figura 2.5). Na extrusão por sistema pneumático, ar comprimido é utilizado e, por isso, o controle volumétrico não é tão bom quanto no acionado por pistão, que proporciona um maior controle volumétrico do fluxo do material, afetando na precisão da impressão e, por fim, o sistema de rosca sem fim possibilita a impressão de biotintas com maior viscosidade, mas é mais usada para pastas carregadas com partículas, devido ao alto cisalhamento que ocorre durante o processo (GU et al., 2020; SEOL et al., 2014).



Figura 2.5: Representação dos três diferentes tipos de impressão por extrusão. Adaptado de: (BOM et al., 2022)

Hidrogéis impressos pelo método de extrusão são empurrados para fora de uma agulha diretamente em uma superfície. O colapso da estrutura e problemas de fidelidade do formato são dois desafios da bioimpressão 3D que dependem das características da biotinta. Materiais apropriados para bioimpressão devem possuir propriedades reológicas adequadas para fluir através da agulha durante a impressão. Materiais viscoelásticos são capazes de ser extrudados normalmente

pelo bico de uma agulha, porém, manter as propriedades de auto sustentação após a impressão também é um desafio, pois demanda uma resposta viscoelástica do material que possui uma tensão de escoamento finita para resistir ao colapso pós-impressão (JIANG et al., 2019; KOKKINIS; SCHAFFNER; STUDART, 2015; PALAGANAS et al., 2017).

O entendimento do comportamento reológico dos materiais é, portanto, necessário para desenvolver tintas, biotintas e as condições de impressão para uma resolução e fidelidade de impressão adequadas (STUDART, 2016; WU et al., 2018).

2.6 Reologia e caracterizações reológicas

Reologia é o estudo da deformação e do escoamento da matéria. É uma área que estuda o comportamento de fluidos complexos, como polímeros e fluidos biológicos, uma vez que a relação entre tensão e deformação para essas classes de materiais não segue a lei da viscosidade de Newton, que descreve o comportamento de cisalhamento para líquidos normais. Também, fluidos complexos geralmente não se adequam à lei da elasticidade de Hooke, relação que é usada para metais e outros materiais elásticos. É necessário ter conhecimento sobre reologia quando nem a lei de Newton e nem a lei de Hooke são suficientes para descrever o comportamento de um fluido (MORRISON, 2001).

Um fluido Newtoniano é aquele no qual a viscosidade – embora varie em diferentes temperaturas e pressões – não varia com a taxa de deformação ou tempo; esse fluido também não apresenta qualquer propriedade elástica ou efeitos alongacionais. O modelo do fluido Newtoniano pode ser usado para estudar e representar uma grande quantidade de líquidos sobre as condições normais do dia-a-dia (BARNES, 2000).

Hidrogéis com comportamento pseudoplástico, ou seja, que possuem uma diminuição gradual em sua viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, significando que quando mais rápido o hidrogel está sendo cisalhado, mais líquido o sistema ficará, são os mais usados em bioimpressão por extrusão pois as cadeias poliméricas da biotinta dispostas de um modo aleatório podem ser alinhadas e se tornarem extrudáveis através da aplicação de uma força de cisalhamento (HOSPODIUK et al., 2017; JALALVANDI; SHAVANDI, 2019; PANWAR; TAN, 2016).

Pesquisas recentes mostram que propriedades reológicas, como o índice de relaxação do hidrogel contendo células, têm um grande impacto na propagação, proliferação e diferenciação celular por toda a extensão da matriz da biotinta (CHAUDHURI et al., 2016; NAM et al., 2019),

indicando que maiores atenções devem ser dirigidas para os aspectos físicos dos materiais usados na bioimpressão. Além disso, uma biotinta deve ser capaz de ser extrudada em níveis de tensão capazes de preservar a integridade celular, muito embora esses níveis de tensão tenham certa ligação com as células (VALOT et al., 2019). Portanto, uma rápida recuperação estrutural do material após a aplicação de altas taxas de cisalhamento é importante para manter a viabilidade celular, diminuindo o dano causado a elas durante o processo da bioimpressão e, ao mesmo tempo, não interferindo na estrutura de *layer-by-layer* da impressão (OZBOLAT; HOSPODIUK, 2016; VAN DEN BULCKE et al., 2000; WANG et al., 2016).

Um dos métodos mais utilizados para se caracterizar um líquido é pela medição de sua viscosidade, que pode ser descrita como a resistência do fluido a um movimento deslizante sendo que, a viscosidade é uma propriedade qualitativamente diferente para fluidos Newtonianos e não-Newtonianos (MORRISON, 2001). É definida, matematicamente, como:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \frac{-\tau_{21}}{\dot{\gamma}_0}$$
 2.1

sendo $-\tau_{21}$ uma tensão de cisalhamento constante e $\dot{\gamma}_0$ uma taxa cisalhamento (ou deformação) constante. O resultado da equação 2.1 não ser uma constante, para diferentes valores de cisalhamento é, geralmente, o primeiro indicador de que o fluido é não-Newtoniano. Como mencionado acima, a maioria dos hidrogéis possuem comportamento pseudoplástico, ou seja, não-Newtoniano, que significa que há uma tendência de ocorrer uma diminuição na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (comportamento pseudoplástico, do inglês *shear-thinning*). Há também o caso oposto, no qual alguns materiais aumentam sua viscosidade com o aumento do cisalhamento (comportamento dilatante, do inglês *shear-thickening*). A Figura 2.6 mostra esses comportamentos:



Figura 2.6: Representação do comportamento da viscosidade como é previsto pelo modelo das potências do fluido Newtoniano generalizado. Adaptado de: (MORRISON, 2001)

2.6.1 Pseudoplasticidade

Considerando um sistema polimérico, esse fenômeno pode ser explicado mais profundamente ao entrar em níveis moleculares. Durante o processo de cisalhamento, as moléculas podem estar mais ou menos orientadas na direção do cisalhamento e, assim, a resistência ao deslizamento diminui conforme a orientação é a favor do deslizamento. Como polímeros são macromoléculas, quando estão em repouso suas cadeias estão emaranhadas, o que dificulta o deslizamento entre elas, resultando em uma alta viscosidade polimérica (BRETAS; D'ÁVILA, 2005). Essa etapa consiste em um primeiro *plateau* Newtoniano na curva de viscosidade em função da taxa de cisalhamento. A aplicação de uma tensão de cisalhamento desemaranha essas cadeias e as direciona no sentido do escoamento, comportamento chamado de pseudoplástico. E, finalmente, após orientadas, as moléculas alcançam um alinhamento máximo, resultando em um segundo *plateau* Newtoniano.

Na Tabela 1, são mostrados os diferentes modelos matemáticos que descrevem o comportamento reológico pseudoplástico. O comportamento descrito por Ostwald-de-Waele, ou Lei de Potências, é o mais utilizado para materiais usados em impressão 3D por extrusão, uma vez que esse modelo descreve adequadamente o comportamento pseudoplástico desses sistemas. Uma alta pseudoplasticidade é desejável em biotintas, pois a redução da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento proporciona o escoamento adequado para a deposição do material.

Modelo	Equação	Referência	Parâmetros
Ostwald-de-Waele	$\eta(\dot{\gamma}) = m \dot{\gamma}^{n-1}$	(MORRISON, 2001)	<i>m</i> índice de consistência
			n índice da lei das potências
Corroou	$\frac{\eta(\dot{\gamma}) - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = \left[1 + (\lambda \dot{\gamma})^2\right]^{\frac{n-1}{2}}$	(CARREAU, 1972)	η_0 viscosidade zero-
Carleau			cisalhamento
			η_{∞} viscosidade infinita
	Yasuda $\frac{\eta(\dot{\gamma}) - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = [1 + (\lambda \dot{\gamma})^a]^{\frac{n-1}{a}}$	(YASUDA;	n = 0 models
Carreau-Yasuda		ARMSTRONG;	$\eta_{\infty} = 0$, modelo simplificado
		COHEN, 1981)	
			λ constante de tempo do
			fluido
Cross	$\frac{\eta(\dot{\gamma}) - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = 1 + (\lambda \dot{\gamma})^{-n}$	(CROSS, 1965)	a parâmetro de transição

Tabela 1: Modelos matemáticos para ajustes de curvas de viscosidade

2.6.2 Propriedades viscoelásticas

Quando um fluido tem comportamento Newtoniano, a sua viscosidade é suficiente para caracterizar suas propriedades de escoamento. No caso de hidrogéis e outros materiais com comportamento pseudoplástico, que apresentam tanto propriedades viscosas como elásticas e são conhecidos como materiais (ou fluidos) viscoelásticos e podem ser descritas pelas chamadas funções materiais. Essas funções materiais podem ser analisadas por testes de amplitude e frequência com a ajuda de um reômetro. Quando é feito um teste de amplitude, a frequência angular se mantém constante, enquanto a amplitude de tensão ou de deformação aumenta em função do tempo. É possível descrever, matematicamente, as varreduras de tensão e deformação como sendo:

$$\gamma(t) = \gamma_A \sin(\omega t) \qquad 2.2a$$

$$\tau(t) = \tau_A \sin(\omega t)$$
 2.2b

sendo γ e τ a tensão e a deformação, respectivamente, o subscrito "*A*" corresponde à amplitude, *t* é o tempo e ω é a frequência angular.

Com os resultados do teste de amplitude, é possível definir a faixa de viscosidade linear (LVE), que é a faixa na qual as propriedades viscoelásticas não são alteradas com tensão ou deformação, ou seja, são duas linhas constantes no gráfico plotado; também é possível definir o ponto de *yield stress* (τ_y) e a transição do comportamento de sólido para o líquido, que acontece no *flow point* (τ_f). Nesse último ponto, também conhecido como ponto de cruzamento, o módulo de perda fica superior ao módulo de armazenamento G'' > G'. A faixa de viscosidade linear serve para saber em qual região o material pode ser testado sem ter sua estrutura destruída.

Um dos ensaios reológicos utilizados para caracterizar o comportamento viscoelástico, como dito acima, é o ensaio oscilatório em pequena amplitude, ou SAOS (do inglês *small amplitude oscillatory shear*), que é realizado em pequenas deformações, onde o material está no regime de viscoelasticidade linear. Nesta condição, o comportamento elástico do material está relacionado com o módulo de armazenamento (G') e o comportamento viscoso, com o módulo de perda (G'').

No SAOS, o regime de viscoelasticidade linear ocorre em pequenas deformações e quando é realizado um ensaio oscilatório em função da deformação (ou tensão), os valores de G' e G' se mantêm constantes. O regime de viscoelasticidade não-linear inicia-se a partir de deformações onde G' e/ou G' em função da deformação deixam de ser constantes.

Tendo o resultado da LVE, é possível analisar o comportamento viscoelástico do material realizando o teste de varredura de frequência, o SAOS mencionado acima, mantendo a faixa do LVE. Como já dito, $G'(\omega)$ representa o módulo de armazenamento, ou seja, fornece informações sobre a elasticidade ou energia armazenada no material durante o processo de cisalhamento; quando essa energia é liberada, pode ser usada em totalidade para recuperação da deformação causada, tornando-a reversível. Por outro lado, $G''(\omega)$ representa o módulo de perda, ou seja, a energia dissipada do material.

A relação entre $G' \in G''$ é chamada de fator de amortecimento (do inglês *damping factor*) e é dada por:

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}$$
 2.3

Então, quando $tan(\delta) > 1$, há uma relação na qual G'' é superior à G', ou seja, o comportamento predominante é o de um líquido; mas quando $tan(\delta) < 1$, a situação é invertida e

o comportamento predominante é o de um sólido. Finalmente, quando $tan(\delta) = 1$, é o momento de transição sólido/líquido.

2.6.3 Comportamento tixotrópico

Tixotropia pode ser definida como a mudança da viscosidade em função do *tempo*. Um dos ensaios de reologia utilizados para avaliar a tixotropia de um material é o teste de tixotropia em 3 intervalos (3ITT). Nesse ensaio, o material é submetido a um escoamento a uma taxa de cisalhamento constante e baixa (~1s⁻¹). Após um determinado tempo, taxa de cisalhamento constante elevada é aplicada subitamente durante um intervalo de tempo e, finalmente, o cisalhamento é subitamente diminuído para a taxa de cisalhamento inicial, onde é avaliada a variação da viscosidade em função do tempo. O aumento súbito na taxa de cisalhamento induz a quebra de estrutura inicial da amostra para que, depois, possa ser avaliada se esta estrutura retorna à condição inicial, indicada pela recuperação da viscosidade. No caso da impressão 3D, quando o material escoa na agulha de impressão, este é submetido a altas taxas de cisalhamento (ÖZKAN et al., 2017).

Para a análise do resultado do ensaio de (3ITT), o método mais comum é o da taxa de recuperação após um certo período de tempo, no qual são escolhidos valores de viscosidade no segundo período de repouso para comparar com o primeiro período de repouso, uma vez que a recuperação não é, necessariamente, instantânea, então:

% de recuperação =
$$\frac{r_e}{r} \times 100$$
 2.4

sendo r_e a recuperação estrutural do material após o tempo definido e r a viscosidade em repouso inicial.

A união dos aspectos reológicos com a impressão tridimensional pode ser exemplificada na Figura 2.7:



Figura 2.7: Propriedades reológicas essenciais para impressão 3D por extrusão: (a) alta viscosidade zero cisalhamento, (b) pseudoplasticidade e (c) recuperação pós-impressão.

Todos esses comportamentos serão mais explorados e discutidos no capítulo de resultados e discussões, uma vez que seus estudos e entendimentos são cruciais para a impressão tridimensional de hidrogéis pseudoplásticos, dando informações sobre suas características estruturais.
3. COMPORTAMENTO REOLÓGICO DAS SOLUÇÕES DE PECTINA/CNC

Nesse capítulo, o comportamento reológico das soluções isoladas de pectina e CNC foram estudados, bem como o comportamento reológico de hidrogéis nanocompósitos de pectina e nanocristais de celulose (CNC). Nas soluções de pectina, o comportamento pseudoplástico foi observado para todas as amostras, porém as soluções de 1% até 2% (menos viscosas) apresentaram um comportamento quase Newtoniano. O comportamento pseudoplástico aumenta conforme o aumento da concentração de pectina. As soluções de CNC mostraram um comportamento pseudoplástico mais acentuado, já que as concentrações utilizadas inicialmente foram relativamente altas, a partir de 5% CNC. Os dados experimentais para as soluções de pectina foram analisados através do modelo de viscosidade de Cross. Diferentes formulações de hidrogéis de pectina/CNC em solução aquosa foram preparadas, somando nove formulações no total. Ensaios de viscosidade em estado estacionário, cisalhamento oscilatório em baixa amplitude (SAOS) e tixotropia em três intervalos (3ITT) foram realizados. Todas as nove amostras apresentaram comportamento elástico predominante em relação ao viscoso (G'' < G') nos testes de varredura de frequência realizados. Esse comportamento elástico se manteve durante toda a faixa de frequência analisada, mostrando uma independência em relação à frequência, comportamento típico de géis físicos e, por isso, é possível afirmar a obtenção de géis para todas as concentrações avaliadas.

3.1 Metodologia experimental

3.1.1 Materiais

O polímero utilizado foi a pectina de baixa esterificação (Sigma-Aldrich, Lote SLBS8828, GA 83%, DE 7.7%) e nanocristais de celulose (CNC) (CelluForce, Lote C1A20003). Além disso, foi usada uma solução de CaCl₂ 2% wt. % para reticulação pós impressão e uma solução de NaOH 1M para ajuste do pH da solução de pectina. Toda água utilizada no preparo foi a deionizada.

3.1.2 Preparo das soluções de Pectina e de CNC

Pectina em diferentes concentrações, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 e 6% (m/m) e nanocristais de celulose 5 e 10% (m/m) foram colocados, separadamente, para agitar usando agitadores magnéticos até completa dissolução em água deionizada. No caso da nanocelulose, um vórtex foi utilizado para realizar a completa dissolução do pó (Figura 3.1). NaOH 1M é usado para regular o pH da solução de pectina até chegar em aproximadamente 7. As amostras foram guardadas em geladeira até seu uso nos experimentos reológicos.



Figura 3.1: Procedimento experimental do preparo das soluções de pectina e CNC

3.1.3 Preparo do hidrogel de Pectina e de CNC

Após ambos estarem completamente homogêneos, a solução de pectina é adicionada à de nanocelulose e a mistura é feita por meio do vórtex e, também, manualmente, até completa homogeneização. A solução final é mantida em geladeira (aprox. 4°C) até o uso (Figura *3.2*).



Figura 3.2: Procedimento experimental do preparo do hidrogel

3.1.4 Microscopia de luz polarizada (POM)

A microestrutura do sistema Pectina/CNC foi observada com o auxílio de um microscópio de luz polarizada. A microscopia foi feita pingando uma gota da amostra entre placas e colocandoa em um microscópio com sistema de documentação fotográfica e luz polarizada equipado com lentes de 5 a 20x de aumento e uma câmera de vídeo Optical View (Mannheim, Alemanha). Esse ensaio foi feito para analisar a isotropia ou anisotropia das soluções, dispersões e tintas, bem como avaliar se há formação de partes líquido cristalinas ou não em qualquer uma das amostras.

3.1.5 Caracterização reológica

As caracterizações reológicas das soluções feitas na etapa anterior foram realizadas utilizando um Reômetro Compacto Modular Anton-Paar MCR-102 (Figura 3.3), com temperatura controlada de 20°C, usando a geometria cone-placa (CP50-1) com 50mm de diâmetro, ângulo de 0.9815 e truncamento de 97 μ m. Os ensaios de viscosidade foram realizados com taxas de cisalhamento variando de 0.1 a 10000 s⁻¹. Os testes de amplitude foram realizados a uma frequência angular de 10 rad. s⁻¹ com uma tensão de cisalhamento de 0.01 a 100% para obtenção da faixa de viscosidade linear (LVE), tendo um resultado de $\gamma_0 = 1\%$ para todas as amostras. A

varredura de frequência foi realizada com uma faixa de frequência angular de 0.1 a 1000 $rad. s^{-1}$ para amostras sem a reticulação, e de 0.1 a 100 $rad. s^{-1}$ para as amostras reticuladas. Como último teste, a tixotropia de três intervalos (3ITT) foi realizada a fim de analisar a recuperação da viscosidade da tinta, durante o intervalo de descanso inicial, uma baixa taxa de cisalhamento de 1 s^{-1} foi aplicada por um período de 25 s, seguido por um súbito aumento da taxa para 100 s^{-1} por 50 s e, por fim, de volta a 1 s^{-1} por 200 s. Todos os ensaios foram feitos em triplicata para assegurar que os dados obtidos eram confiáveis.



Figura 3.3: Fotos do reômetro e equipamentos usados para realização dos testes

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Microscopia de luz polarizada (POM)

As suspensões de CNC podem apresentar diferentes propriedades de acordo com a organização de sua estrutura cristalina já que, em baixas concentrações, pode apresentar domínios cristalinos líquidos e isotrópicos, enquanto estados tipo gel aparecem em altas concentrações (UREÑA-BENAVIDES et al., 2011). Foram feitas microscopias de luz polarizadas tanto para soluções de pectina, suspensões de CNC e no gel formado pela mistura de ambas. Na Figura *3.4*, é possível ver as imagens da microscopia para as diferentes concentrações das soluções de pectina, bem como para as suspenções de CNC.



Figura 3.4: Microscopia de luz polarizada de concentrações de 1% (a) e 5% (b) de pectina e de 5% (c) e 10% (d) de CNC

É possível observar fases isotrópicas para as menores e maiores concentrações de pectina estudadas, sem a adição do CNC. Já as suspensões de CNC apresentam a fase líquida cristalina (área azulada nas imagens) misturada a uma fase isotrópica, sendo mais predominantes na concentração de 10% de CNC, mostrando que o aumento do domínio líquido cristalino está associado com uma maior orientação das partículas de CNC devido a sua floculação.

Como observado na Figura 3.5, apenas a primeira imagem (a) apresenta um comportamento de fase líquida cristalina misturada com a fase isotrópica. Nas outras concentrações de tinta, é observável, pelo microscópio, as regiões isotrópicas em uma matriz de fase líquida cristalina, permanecendo com esse comportamento em praticamente todas as outras amostras. Assim sendo, a floculação do CNC pode estar relacionada à interações eletrostáticas entre os bastões de CNC e as cadeias da pectina. Esse resultado mostra potencial nas tintas que não possuem a fase líquida cristalina acentuada, uma vez que quanto maior essa fase, mais quebradiço fica o material, característica que não é desejada para o processo de impressão tridimensional.



Figura 3.5: Microscopia de luz polarizada para as diferentes concentrações de tinta. P1C5 (a), P1C10 (b), P3C5 (c), P3C10 (d), P4C5 (e), P4C10 (f), P5C5 (g) e P5C10 (h)

A superfície do CNC é carregada negativamente devido aos grupos semi-éster de sulfato introduzidos durante a hidrólise. Essas superfícies carregadas podem causar a absorção de polieletrólitos; no entanto, a pectina é um polieletrólito negativamente carregado e, portanto, há uma forte repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas e as partículas. A presença de polímeros não absorvidos na dispersão induz forças atrativas entre as partículas, resultando em uma região rica em solventes entre as superfícies das partículas. A pressão osmótica no fluido excede essas forças de atração levando as partículas a ficarem próximas entre elas. Esse mecanismo é conhecido como interação de depleção (BIGGS; PRIEVE; DAGASTINE, 2005; OGUZLU; DANUMAH; BOLUK, 2017).

3.2.2 Caracterização do cisalhamento em estado estacionário (steady-shear state)

A Figura 3.6 mostra um gráfico da viscosidade em estado estacionário versus a taxa de cisalhamento das soluções de pectina. Soluções com concentração de até 2% apresentaram um comportamento praticamente Newtoniano. Acima de 2% até 4%, as soluções exibem um comportamento pseudoplástico com um plateau Newtoniano em baixas taxas de cisalhamento. Acima de 4%, o comportamento pseudoplástico torna-se mais nítido.

O modelo de Cross foi utilizado para descrever matematicamente os dados experimentais em função da taxa de cisalhamento e é dado por:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^n}$$
(3.1)

sendo η_{∞} a viscosidade de cisalhamento infinito, η_0 a viscosidade no cisalhamento zero, $\dot{\gamma}$ a taxa de cisalhamento, $\dot{\gamma}_c$ a taxa de cisalhamento crítica e *n* é um parâmetro adimensional que indica o grau de dependência da viscosidade com a taxa de cisalhamento na região de transição entre o *plateau* Newtoniano e a região da lei de potência.

Como pode ser observado na Figura *3.6*, há um aumento significativo na viscosidade de cisalhamento zero com o aumento da concentração de pectina. A dependência da viscosidade nas concentrações poliméricas está associada aos diferentes estados da solução.



Figura 3.6: Curvas de viscosidade em estado estacionário para as soluções de pectina (m/m%). As geometrias vazadas representam aos dados experimentais e as linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Cross.

Conforme a concentração de pectina aumenta, há o aumento de interações e entrelaçamento de cadeias individuais, que é denominado de regime semidiluído emaranhado. A concentração polimérica que marca essa transição é chamada de concentração micelar crítica (c^*). Sendo assim, a concentração de 1.5% de pectina foi a concentração de transição, como é possível ver em ambos os gráficos. As curvas de viscosidade vs. taxa de cisalhamento da nanocelulose com concentrações variando entre 5 e 10% estão mostradas na Figura 3.7.



Figura 3.7: Curvas de viscosidade em estado estacionário para soluções de CNC (m/m). As geometrias vazadas representam os dados experimentais e a linha contínua representa o ajuste de leis de potência.

É possível observar no gráfico que CNC nas concentrações utilizadas não apresenta comportamento Newtoniano em momento algum, predominando completamente o comportamento pseudoplástico. Esse comportamento é associado à proporção de CNC e à capacidade do material de se auto-organizar na dispersão e, assim, gerar estados de dispersão e interação de fases diferentes com o aumento da concentração de CNC no solvente. Além disso, para impressões 3D por extrusão, fluidos que se comportam de acordo com a lei das potências (modelo de Ostwald-de Waele) são desejáveis, uma vez que o modelo está associado ao comportamento pseudoplástico que permite que haja uma fácil deposição do material durante o processo de impressão. Esse modelo descreve a viscosidade com uma função que é proporcional a uma potência da taxa de cisalhamento; nele há dois parâmetros importantes: m, que está relacionado com a magnitude da viscosidade e n, que descreve o tipo de fluido que está sendo estudado, ou seja, para n = 1, o fluido é Newtoniano, para n > 1, o fluido é dilatante e, para n < 1, o fluido é pseudoplástico.

A Figura 3.8 mostra a viscosidade em cisalhamento constante em função da taxa de cisalhamento. Os gráficos foram feitos separadamente para melhor visualização, fixando-se a concentração de pectina (1, 3, 4 e 5%) e variando a concentração de CNC presente no hidrogel. Aqui, diferentemente dos gráficos de viscosidade apresentados no capítulo anterior, não há o *plateau* Newtoniano, significando apenas a existência do efeito pseudoplástico durante todo o ensaio.

As curvas de viscosidade foram modeladas usando o modelo de viscosidade de Ostwald-de Waele, também conhecida como relação da lei de potência, que é dado por:

$$\eta(\dot{\gamma}) = m\dot{\gamma}^{n-1} \tag{3.2}$$

sendo m o índice de consistência e n o índice de *power-law*; m está associado com a magnitude da viscosidade e n descreve o índice de pseudoplasticidade do material. Aqui, quanto maior o m, maior viscosidade o material possui e, inversamente, quanto menor o n, mais pseudoplástico é esse material.



Figura 3.8: Curvas de viscosidade obtidas experimentalmente comparadas com o ajuste das leis de potência

Em comparação com as Figura 3.6 e Figura 3.7, fica claro na Figura 3.8 que a viscosidade, nesses casos, é mais influenciada pela nanocelulose do que pela pectina e, além disso, os valores não são muito superiores aos da viscosidade da solução de nanocelulose.

É possível observar na Figura 3.8 que as curvas se ajustam ao modelo de Ostwald-de Waele. Além disso, os resultados numéricos são apresentados na Tabela 2:

Amostra	m (Pa. s^{-n})	n (-)	R^2
P1C5	12,18	0,255	0,994
P1C10	67,25	0,163	0,998
P3C5	58,57	0,241	0,997
P3C10	283,49	0,137	0,996
P4C5	59,47	0, 316	0,989
P4C10	222,89	0,218	0,995
P5C5	63,85	0,387	0,989
P5C10	280,62	0,251	0,991

Tabela 2: Valores obtidos a partir do modelo de Ostwald-de Waele para cálculo do ajuste

É notável que os valores de *m* aumentam com o aumento das concentrações tanto de pectina quanto CNC, enquanto *n* diminuí nas mesmas condições. O decréscimo de *n* apenas ressalta o aumento do comportamento pseudoplástico durante o processo em todas as amostras. É importante ressaltar que esse comportamento é de fundamental importância durante a impressão tridimensional por extrusão uma vez que, com o aumento da tensão de cisalhamento, a viscosidade do material diminuí bruscamente, permitindo sua vazão pela agulha. Porém, uma viscosidade baixa também interfere na capacidade de impressão, já que aquela possuí influência direta na fidelidade e resolução da impressão. Quando a tinta possuí uma viscosidade baixa, mesmo sendo extrudada com mais facilidade pela agulha há, muitas vezes, formação de gotículas que podem se acumular durante o percurso da impressão, interferindo na geometria final; além disso, um material menos viscoso tem menos chances de sustentar uma estrutura com várias camadas.

Assim, com os dados obtidos no ajuste das leis de potência, as três formulações de tinta mais promissoras que terão maior visibilidade nos próximos testes reológicos e nos de impressão foram as P3C10, P4C10 e P5C10, com base em ambos os valores de n e m.

3.2.3 Cisalhamento oscilatório de pequena amplitude (SAOS)

O comportamento viscoelástico linear dos materiais está relacionado diretamente ao módulo de armazenamento (*G'*) e ao módulo de perda (*G''*). Além disso, o fator de amortecimento $\left(\tan(\delta) = \frac{G''}{G'}\right)$ também pode ser usado como um parâmetro extra para analisar se o comportamento

em questão é predominantemente viscoso ou elástico uma vez que, quando $tan(\delta) > 1$ o comportamento tipo líquido é predominante e, quando $tan(\delta) < 1$, o que predomina é o tipo sólido.

A Figura 3.9 mostra a dependência dos módulos de armazenamento e perda em relação à frequência angular (ω) para soluções aquosas de pectina nas concentrações de 1,3,4,5 e 6% (m/m). Para todas as soluções estudadas, a pectina apresentou um comportamento do tipo líquido, ou seja, G'' > G' em todo o intervalo de frequência analisado com exceção da formulação de 1%, que era uma solução extremamente aquosa e, por isso, não foi adicionada ao gráfico para melhor visualização dos módulos.



Figura 3.9: Gráficos dos módulos de armazenamento (G' – geometrias cheias), de perda (G'' – geometrias vazias) e o fator de amortecimento $(tan(\delta))$ para a pectina

Em contrapartida, a Figura *3.10* mostra os módulos de armazenamento e perda em relação à frequência angular para as soluções de CNC.

Aqui, é possível notar que, para os três casos, G'' < G', ou seja, todas as três amostras apresentam um comportamento do tipo sólido em qualquer frequência estudada. Quanto maior a concentração de CNC na solução, maior fica a diferença entre G''e G'.



Figura 3.10: Gráfico dos módulos de armazenamento (G' – geometrias cheias) e de perda (G" – geometrias vazias) para o CNC

Todas as tintas estudadas mostraram um comportamento do tipo sólido (G'' < G') para todas as faixas de frequência analisadas, não havendo cruzamento dos valores de G'' e G' (conhecido como *crossover*), indicando que todas elas se comportam, reologicamente, como géis. Além disso, é possível notar que a diferença entre os módulos de armazenamento e perda aumentam com o aumento da concentração de CNC, em 5% ainda é possível notar dependência da frequência e, com 10% de CNC, essa relação fica praticamente independente da frequência. É possível visualizar na Figura 3.11, que o módulo de perda e o módulo de armazenamento são independentes da frequência angular, característica de géis com ligações físicas.



Figura 3.11: Gráficos dos módulos de armazenamento (G' – geometrias cheias) e de perda (G'' – geometrias vazias) para as diferentes amostras de tinta

Diferentemente do observado nos ensaios de viscosidade, aqui o aumento proporcionado pela união da pectina com CNC é notável principalmente para baixos valores de CNC. Essa conclusão mostra que a interação entre os dois polímeros ressalta as propriedades viscoelásticas, causando um aumento tanto em G' quanto em G".

3.2.4 Ensaios de tixotropia em três intervalos (3ITT)

Para estudar as propriedades reológicas dependentes do tempo, tanto de pectina quanto de CNC, as amostras foram submetidas ao teste de tixotropia em três intervalos (3ITT), como mostra a Figura *3.12*, para a pectina e Figura *3.13*, para o CNC. Esse teste foi realizado para determinar a regeneração estrutural das amostras após um cisalhamento e, também, quanto tempo demora para que essa regeneração aconteça.



Figura 3.12: Gráfico do ensaio 3ITT para as diferentes concentrações de pectina



Figura 3.13: Gráfico do ensaio 3ITT para as diferentes concentrações de CNC

É possível notar que, com exceção da solução de 0,5% de pectina, uma solução extremamente aquosa que, possivelmente, causa falha de leitura no reômetro, todas as outras se mantiveram estáveis no intervalo inicial, primeiro *plateau*, que tem a taxa de cisalhamento $\dot{\gamma} = 1s^{-1}$. Logo após esse período, cai para um valor menor durante a etapa de alto cisalhamento, na qual a amostra é submetida a uma taxa de cisalhamento de $\dot{\gamma} = 100s^{-1}$ por um período de 50*s*, voltando, depois, à taxa de cisalhamento inicial para que a regeneração do material possa ser avaliada.

Na Figura *3.12*, representando as soluções de pectina, nota-se uma recuperação quase completa da estrutura após a aplicação de alto cisalhamento, o que não se pode dizer das soluções de CNC, que não possuem uma regeneração completa. A regeneração do CNC aumenta com a concentração do material. Como as soluções de pectina em baixas concentrações (até 2%) são aquosas, há falha na leitura após o período de alto cisalhamento. Os ensaios de 3ITT para os géis, Figura *3.14*, foram realizados em todas as oito formulações de tinta, para avaliar a recuperação de cada uma delas após um período em alto cisalhamento e seu tempo de recuperação.



Figura 3.14: Gráfico do ensaio de 3ITT para as diferentes amostras de tinta

Esse teste é importante para o processo como um todo, uma vez que é ele quem vai dar uma ideia de como a tinta vai se comportar após o cisalhamento sofrido quando passa pela agulha e é depositado. Assim, é possível saber quais formulações vão conseguir manter a estrutura das camadas após a impressão.

As três formulações mais promissoras segundo a Tabela 2, Figura 3.8 e Figura 3.11, ou seja, P3C10; P4C10 e P5C10, mostraram índices de recuperação satisfatórios, todos acima dos 83% e, por estudos anteriores, sabe-se que uma recuperação inicial de viscosidade acima de 80% é interessante para manufatura aditiva (PEAK et al., 2018) sendo que, para as três formulações, a

recuperação inicial chega a 85% ou mais, caindo para 83% nos primeiros 40 segundos, como mostrado na Figura *3.15*. A recuperação foi calculada usando a Equação 2.4.



Figura 3.15: Recuperação da tinta P3C10, definida como a tinta mais promissora

Sendo assim, com base nos ensaios reológicos, já é possível imaginar quais formulações serão as que terão melhor desempenho durante a impressão, próxima etapa de testes que serão feitos.

4. IMPRESSÃO 3D POR EXTRUSÃO DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS A BASE DE CELULOSE

Nesse capítulo, a capacidade de impressão dos géis foi analisada com ensaios de extrusão na impressora 3D. Os géis com concentrações médias de pectina e CNC se mostraram com melhor formação de filamentos e camadas e, finalmente, a concentração 3%:10% (m/m) Pect/CNC foi definida como a tinta ótima com base nos ensaios reológicos e nos resultados da impressão 3D. Após a definição da tinta ótima, foram definidos os parâmetros de impressão que melhor se adequavam ao modelo e scaffolds com diferentes camadas foram impressos.

4.1 Metodologia Experimental

4.1.1 Impressão Tridimensional

Os testes de impressão da tinta foram realizados usando a impressora 3DCloner Lab com um cabeçote de seringa conforme detalhado por DÁVILA et al. (2022) (Figura 4.1).



Figura 4.1: Impressora 3DCloner Lab com seringa acoplada

Para os parâmetros de impressão, foi usado o *software* Repetier-Host V2.1.3. Foram feitos filamentos em diferentes velocidades de impressão e diferentes fatores de extrusão, bem como altura de camadas e tamanho dos construtos, para que assim se pudesse chegar nos melhores parâmetros para a tinta. A formação de filamentos foi analisada usando um microscópio óptico acoplado à impressora. Os filamentos foram produzidos através de uma agulha de precisão cônica 20G com tamanho da ponta da agulha de 0,58mm, adquiridas pela Nordson EFD, acoplada a uma seringa descartável de 10 mL.

Ao final dos testes, os melhores parâmetros para a impressão da tinta foram uma velocidade de impressão de 5 $mm. s^{-1}$, altura de camada de 0.2mm, distância de 3mm entre os centros dos filamentos e fatores de extrusão de 100, 125 e 150. O fator de extrusão representa um ajuste fino da vazão de extrusão, ou seja, um fator de extrusão de 125 significa que a impressora irá extrudar

com uma taxa 25% maior do que a configuração padrão do *software* instalado nela. A velocidade de extrusão foi calculada com base na vazão mássica e na vazão volumétrica do gel durante o processo de impressão. A massa foi coletada durante um intervalo de tempo determinado e, em seguida, pesada para que a equação 4.1, da vazão mássica, pudesse ser utilizada:

$$\dot{m} = \frac{m}{t} \tag{4.1}$$

Em seguida, conhecendo a densidade do gel $(0,9611 \ g \cdot mL^{-1})$ e o fluxo de massa (Equação 4.1), foi possível calcular a vazão como mostrado na equação 4.2:

$$Q = \frac{\dot{m}}{\rho} \tag{4.2}$$

Com o valor da vazão calculado, é possível, então, calcular a velocidade de extrusão do gel, seguindo a equação 4.3:

$$v_e = \frac{4Q}{\pi D^2} \tag{4.3}$$

Assim, foram obtidos três valores de velocidade de extrusão para os fatores de extrusão de 100, 125 e 150, sendo eles $v_{e100} = 2,33 \text{ }mm \cdot s^{-1}$, $v_{e125} = 2,96 \text{ }mm \cdot s^{-1}$ e $v_{e150} = 3,56 \text{ }mm \cdot s^{-1}$.

O *software* BioScaffolds PG V 2.0 (DÁVILA et al., 2022) foi, então, utilizado para gerar a estrutura 3D dos *scaffolds* e o caminho a ser percorrido pelo cabeçote durante todo o processo de impressão através de um G-code. Antes de realizar a impressão, a seringa é centrifugada a 2000 rpm por um período de 2 minutos em uma centrífuga Kasvi K14-4000 para eliminar bolhas que possam atrapalhar durante o percurso da agulha. Após o acoplamento da seringa ao cabeçote, é feita uma extrusão prévia para garantir a presença de material na ponta da agulha.

4.1.2 Medidas e caracterização dos testes de impressão

Foram feitos quatro testes diferentes para avaliação das tintas: formação de filamento; difusão, uniformidade do filamento e uniformidade dos poros nos construtos impressos. No teste

de formação de filamento (Figura 4.5), todas as formulações de tinta são submetidas às mesmas condições de impressão para analisar se formarão um filamento constante ou se formarão gotículas ou filamentos quebradiços conforme o gel é extrudado. Em seguida, levando em conta apenas as formulações que formaram filamentos, foram feitos os testes de difusão (Figura 4.2), para avaliar a difusão do filamento após a impressão e o teste de uniformidade do filamento (Figura 4.3), para avaliar a alteração no diâmetro do mesmo durante o processo de impressão. Por fim, os construtos foram impressos e as medições dos poros feitas para avaliar a uniformidade dos poros formados (Figura 4.4). As medições nos testes de difusão, uniformidade de filamento e uniformidade dos poros formados poros foram feitas com base nas análises propostas por (NAGHIEH; CHEN, 2021) e o *software* ImageJ (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004) foi usado para auxiliar nas medições.

No teste de difusão da tinta (Figura 4.2), foram usadas as três diferentes velocidades de extrusão, mostradas no tópico 4.1.1, para cada formulação de tinta. Dessa forma, é possível calcular a área formada experimentalmente (A_e) para comparação com a área teórica (A_t) e, assim, verificar qual delas mantém a geometria proposta no desenho do software de acordo com a Equação 4.4:

$$Df = \frac{A_t - A_e}{A_t} \times 100 \tag{4.4}$$



Figura 4.2: Esquema representando a estrutura formada no teste de difusão e as áreas medidas

Em seguida, a uniformidade U_f do filamento durante sua trajetória em linha reta (l_e) foi analisada e, assim, comparada com a teórica (l_t) , de acordo com a Equação 4.5:

$$U_f = \frac{l_t - l_e}{l_t} \times 100 \tag{4.5}$$

Para isso, foram tomadas medições de vários pontos ao longo da reta formada durante a impressão (Figura *4.3*) e, com a média deles, foi feito o cálculo da variação do diâmetro do filamento, em porcentagem, para cada uma das velocidades propostas.



Figura 4.3: Esquema representando o filamento formado para avaliação da uniformidade do filamento

Após a impressão, a uniformidade dos poros (U_p) formados foi analisada e as áreas e perímetros dos poros calculados, também com a ajuda do *software* ImageJ, seguindo a Equação 4.6.

$$U_p = \frac{(perímetro \ do \ poro)^2}{16 \times (área \ do \ poro)}$$
(4.6)

Assim, é possível obter um valor entre 0 e 1, sendo 1 o poro mais uniforme e 0 a ausência de formação de poros, ou seja, a tinta difunde após a impressão a ponto de fechar os poros. As medições dos poros foram feitas nos três poros marcados em cinza e indicados pelo quadrado vermelho pontilhado na Figura *4.4*.



Figura 4.4: Esquema representando a estrutura formada no teste de impressão e as áreas medidas

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Impressão 3D por extrusão

As propriedades reológicas do material são de extrema importância para o estudo e para entender quais formulações são mais propensas à impressão, porém, os parâmetros de impressão também são diferenciais para que a impressão seja a mais precisa possível. É crucial que parâmetros como velocidade de extrusão (v_e) , velocidade de impressão (v_p) , altura da camada, quantidade de camadas estejam com valores bem definidos após os testes iniciais.

As velocidades de impressão e extrusão influenciam diretamente o diâmetro do filamento impresso. Uma combinação de alta velocidade de extrusão e baixa velocidade de impressão resulta em um filamento mais grosso, já que há uma maior deposição de material. O contrário também é verdadeiro: uma baixa velocidade de extrusão e alta velocidade de impressão resultam em filamentos extremamente finos e, em alguns casos, não há nem tempo hábil para que o filamento se deposite, causando uma falha durante o processo de impressão e possível acúmulo de material que será depositado de uma só vez. Portanto, esses dois parâmetros devem ser definidos em conjunto, já que um depende diretamente do outro para que, dessa forma, o material seja depositado sem interrupção, conferindo a maior fidelidade de impressão ao filamento. O programa utilizado para codificar a impressão no formato desejado já atribuí certos valores com cálculos pré-definidos, mas a velocidade de extrusão e de impressão são variáveis. Todas as formulações de tinta passaram

por testes de formação de filamento, para poder confirmar os resultados preliminares obtidos nos ensaios reológicos, resultando na Figura 4.5.



Figura 4.5: Formação de filamentos nas formulações de tintas propostas. As formulações com concentração crescende de pectina e 5% de CNC (a,b,c,d) e 10% (e,f,g,h). O traço branco ao lado do filamento da figura h corresponde a 0,58mm

É possível observar na Figura 4.5 que todas as formulações contendo apenas 5% de CNC (Figura 4.5a, b, c, d) não conseguem formar um filamento contínuo e, na formulação de 1% de pectina com 10% de CNC (Figura 4.5e), o filamento começa a se formar, mas se rompe após um curto espaço de tempo, também não se mostrando capaz de formar um filamento contínuo. Nas três tintas que formaram filamentos (f,g,h), foi impressa uma estrutura de duas camadas variando suas dimensões internas gradualmente com o intuito de avaliar a difusão do filamento formado (Figura 4.6).



Figura 4.6: Testes de difusão nas tintas P3C10 (a,b,c), P4C10 (d,e,f) e P5C10 (g,h,i) nas velocidades: 2,33 (a,d,g), 2,96 (b,e,h) e 3,56 (c,f,i)

Assim, é possível saber quais formulações e quais velocidades causam maior difusão do filamento impresso e, também, qual possuí maior constância na formação dos diferentes tamanhos de poro, como visto na Figura 4.7. Nela, quanto mais próximo o ponto estiver do zero, menor difusão há e mais o tamanho do poro está de acordo com o tamanho teórico. Pelos resultados obtidos, é possível observar que as tintas P3C10 com velocidades 2,37 e 2,96 são as que menos difundem e as que mantém maior constância a partir dos poros de 2x2.



Figura 4.7: Gráficos para cada tinta mostrando a difusão nos diferentes tamanhos de poro

Após o teste de fusão, foi feito um teste para avaliar a uniformidade de um filamento impresso em linha reta (Figura 4.8), para todas as formulações de tinta e as três velocidades de extrusão propostas.



Figura 4.8: Filamentos formados nas tintas P3C10 (a,b,c), P4C10 (d,e,f) e P5C10 (g,h,i) nas velocidades: 2,33 (a,d,g), 2,96 (b,e,h) e 3,56 (c,f,i)

Pelas fotos obtidas e, após os cálculos mostrados no tópico 4.1.2, é possível notar que a tendência da tinta é formar um filamento maior com o aumento da velocidade de extrusão devido ao efeito dilatante da própria tinta. Isso é visível nas formulações contendo 3 e 5% de pectina, como mostra o gráfico da Figura *4.9*.



Figura 4.9: Gráfico com a variação do diâmetro do filamento, em porcentagem, em função da velocidade de extrusão

Porém, indo contra a tendencia, a tinta com 4% de pectina apresenta um comportamento completamente oposto, mostrando uma maior consistência no diâmetro do filamento ao longo da linha impressa. Após os testes de definição de parâmetros de impressão, as tintas foram impressas com 10 camadas (Figura *4.10*).



Figura 4.10: Construtos formados nas tintas P3C10 (a,b,c), P4C10 (d,e,f) e P5C10 (g,h,i) nas velocidades: 2,33 (a,d,g), 2,96 (b,e,h) e 3,56 (c,f,i)

Pela Figura 4.10, é possível ver a tendência mostrada nos testes de uniformidade de filamento e, além do mais, comprovar a inversão que acontece na tinta com 4% de pectina, uma vez que o constructo dela na maior velocidade foi o que teve uma maior uniformidade dos poros na estrutura impressa, também visto na Figura 4.11, que mostra um gráfico com a uniformidade dos poros para cada formulação de tinta, nas três velocidades utilizadas para impressão. É notável a tendência das tinhas de 3 e 5% de pectina de diminuir a uniformidade dos poros com o aumento da velocidade de extrusão e a de 4% de pectina, na qual a uniformidade aumenta com o aumento da velocidade.



Figura 4.11: Gráfico mostrando a uniformidade dos poros, sendo 1 o mais uniforme possível

Após todos os testes e análises dos parâmetros utilizados, o melhor resultado para as tintas P3C10 e P5C10 foi $v_p = 5 \ mm \cdot s^{-1}$ e $v_e = 2,37 \ mm \cdot s^{-1}$, e para P4C10 foi $v_p = 5 \ mm \cdot s^{-1}$ e $v_e = 3,55 \ mm \cdot s^{-1}$ que garantiram um constructo com menor difusão e que manteve mais o formato pós impressão.

Com base nos ensaios reológicos e nos testes de impressão tridimensional, a tinta P3C10 foi definida como a mais promissora e, por isso, foi a que passou pelos testes de reticulação para analisar o comportamento da mesma em diferentes concentrações do agente reticulante ao longo do tempo.

4.2.2 Reticulação da tinta

Após os testes de impressão, e a final escolha da tinta P3C10 como mais promissora, foram realizados alguns testes de reticulação, uma vez que a pectina, assim como o alginato, reticula de acordo com o modelo da caixa de ovo (do inglês *egg-box model*) na presença de íons bivalentes, como é o caso do cálcio, como mostra a Figura *4.12*.



Figura 4.12: O modelo da "caixa de ovo" com a presença do cálcio, para a pectina, baseado em (GAWKOWSKA; CYBULSKA; ZDUNEK, 2018)

Os testes foram feitos com $CaCl_2$ nas concentrações de 0,5%, 1%, 1,5% e 2% (m/m) por um período fixo de tempo de 1200s. Para os ensaios, as amostras foram colocadas no reômetro e imersas nas respectivas soluções de $CaCl_2$ em excesso para impedir que sequem ou que falte agente reticulante no período do teste. Testes de frequência foram realizados com uma frequência fixa de 10 $rad \cdot s^{-1}$.

Para os testes, as estruturas foram fabricadas na impressora, porém, com um formato menor para que a geometria PP10 do reômetro pudesse ser usada. A Figura *4.13* mostra a estrutura da amostra antes do processo de reticulação (esquerda) e como ficou a estrutura da amostra após o processo de reticulação (direita).



Figura 4.13: Amostra P3C10 no processo de reticulação. A figura da esquerda representa o processo antecessor à reticulação e, da direita, o posterior.

Como é possível observar na Figura 4.14, houve um aumento tanto em G' quanto em G'', indicando que a reticulação auxilia nas propriedades mecânicas do material. Também é possível notar que, a partir da concentração de 1% os valores de G' parecem se sobrepor um ao outro, mas, como o gráfico se encontra em escala *log*, foi feito outro em escala normal para que a comparação fosse mais precisa, resultando na Figura 4.15.



Figura 4.14: Gráfico dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') para os diferentes tempos de reticulação da tinta P3C10, em comparação com o controle não reticulado

Como dito anteriormente, na Figura 4.15 foi colocado o mesmo gráfico da Figura 4.14, porém sem a escala logarítmica, para uma melhor análise sobre a influência do tempo de reticulação nas amostras. Como visto no gráfico, após a reticulação de 0,5%, não há diferença significativa nos módulos de armazenamento e perda. Além disso, levando-se em conta o desvio padrão das amostras, pode-se dizer que a diferença está dentro da incerteza da medição.



Figura 4.15: Gráfico (sem escala log) dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') para os diferentes tempos de reticulação da tinta P3C10, em comparação com o controle não reticulado

Essa informação se mostra útil quando células e biotinta entram em cena, já que quanto menor o período do material com células imerso em solução de $CaCl_2$, melhor. O mesmo se aplica para a concentração, quanto menor, melhor para as células. Sendo assim, com base nos testes preliminares de reticulação, é possível conhecer a tendência da reticulação e do tempo que a amostra ficou imersa na solução reticulante, mostrando a partir de 1%, os módulos de armazenamento e perda já não mais possuem uma alteração que seja experimentalmente significativa, o que já não pode se dizer das amostras imersas na solução de 0,5%, essas possuem uma diferença visível em comparação com as amostras imersas em soluções com maiores concentrações de $CaCl_2$.

5. CONCLUSÃO

Com base nas análises reológicas foi possível observar o comportamento dos materiais em solução (pectina) e suspensão (CNC), bem como da mistura (Pect/CNC) e, na manufatura aditiva, foi possível observar a influência das diferentes concentrações de pectina no CNC. A pectina sozinha se comporta de um modo diferente de quando está junto com o CNC e, na mesma linha, o CNC junto com a pectina mostra comportamentos um pouco distintos do que quando está em solução. A pectina em solução, quando falamos em viscosidade, possui, claramente, um *plateau* Newtoniano considerável, o que não é visto nas análises reológicas das tintas. Além disso, nas varreduras de frequência, a tinta se mostra totalmente no aspecto de comportamento tipo sólido (G' > G''), resultado desejado para a impressão tridimensional. Quanto à reticulação da tinta, foi identificado que acima de 0,5% de $CaCl_2$, não há uma diferença significativa no módulo de armazenamento das amostras, um ponto positivo para o caso de uso de células na tinta.

No quesito da capacidade de impressão, os testes mostraram que há a formação de filamento nas tintas testadas, porém, nem todas conseguem ter uma fidelidade de impressão durante todo o procedimento, sendo assim, a tinta P3C10 foi definida como a tinta mais promissora, comprovando os valores obtidos experimentalmente. Conforme os testes de impressão foram sendo realizados, as velocidades de impressão de extrusão mostraram ter grande influência em todo o processo e na fidelidade de impressão. A velocidade de impressão de 5 $mm \cdot s^{-1}$ e velocidade de extrusão 2,33 $mm \cdot s^{-1}$ foram definidas como as que garantem uma melhor impressão da tinta mais promissora. Os construtos impressas mantiveram sua estrutura, quando imersas em PBS, por mais de 7 dias, mesmo com grandes números de camadas.

Por fim, é possível afirmar que foi obtida uma tinta de biomaterial de CNC e pectina promissora para o uso na impressão tridimensional por extrusão.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudos complementares sobre a interação da pectina com o CNC;
- Maiores estudos referentes à reticulação das tintas;
- Inoculação de células direta e indiretamente;
- Estudos do comportamento reológico e de impressão das tintas quando houver inoculação de células;
- Avaliar a possibilidade de uso em aplicações para engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS

ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with imageJ.

Biophotonics International, v. 11, n. 7, p. 36–41, 2004.

ALMEIDA, C. R. et al. Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: Unraveling the effect of 3-D structures on inflammation. Acta Biomaterialia, v. 10, n. 2, p. 613–622, 2014.

AMIRIAN, J. et al. In-situ crosslinked hydrogel based on amidated pectin/oxidized chitosan as potential wound dressing for skin repairing. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, n. September 2020, p. 117005, 2021.

ANTICH, C. et al. Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs. Acta Biomaterialia, v. 106, p. 114–123, 2020.

ASSIFAOUI, A.; CHAMBIN, O. Pectin as Drug-Release Vehicle. **Pectin: Technological and Physiological Properties**, p. 189-207, 2020.

AURIEMMA, G. et al. Pectin and zinc alginate: The right inner/outer polymer combination for core-shell drug delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, 2020.

AZIZI SAMIR, M. A. S.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field.

Biomacromolecules, v. 6, n. 2, p. 612–626, 2005.

BANKS, A. et al. Novel bioprinting method using a pectin based bioink. **Technology and Health Care**, v. 25, n. 4, p. 651–655, 2017.

BARNES, H. A. A Handbook of Elementary Rheology. [s.l.] The University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 2000.

BENEKE, C. E.; VILJOEN, A. M.; HAMMAN, J. H. Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2602–2620, 2009.

BIGGS, S.; PRIEVE, D. C.; DAGASTINE, R. R. Direct comparison of atomic force microscopic and total internal reflection microscopic measurements in the presence of nonadsorbing polyelectrolytes. **Langmuir**, v. 21, n. 12, p. 5421–5428, 2005.

BOM, S. et al. On the progress of hydrogel-based 3D printing: Correlating rheological properties with printing behaviour. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 615, n. October 2021, p. 121506, 2022.

BOSNAKOVSKI, D. et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in different hydrogels: Influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 6, p. 1152–1163, 2006. BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de Polímeros Fundidos**São CarlosEdUFSCAR, , 2005.

CARREAU, P. J. Rheological Equations From Molecular Network Theories. **Trans Soc Rheol**, v. 16, n. 1, p. 99–127, 1972.

CARREÑO, N. L. V. et al. Advances in nanostructured cellulose-based biomaterials. [s.l: s.n.].

CHAICHI, M. et al. Preparation and characterization of a novel bionanocomposite edible film based on pectin and crystalline nanocellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 167–175, 2017.

CHAUDHURI, O. et al. Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. **Nature Materials**, v. 15, n. 3, p. 326–334, 2016.

CHEN, J. et al. Nanocomposites drug delivery systems for the healing of bone fractures.

International Journal of Pharmaceutics, v. 585, n. April, p. 119477, 2020.

CHEN, Y. Properties and development of hydrogels. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

CHUNG, C.; BURDICK, J. A. Engineering cartilage tissue. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 60, n. 2, p. 243–262, 2008.

CROSS, M. M. Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems. **Journal of Colloid Science**, v. 20, n. 5, p. 417–437, 1965.

CUNLIFFE, D.; PENNADAM, S.; ALEXANDER, C. Synthetic and biological polymers -

Merging the interface. European Polymer Journal, v. 40, n. 1, p. 5–25, 2004.

DAHER, F. B.; BRAYBROOK, S. A. How to let go: Pectin and plant cell adhesion. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. JULY, p. 1–8, 2015.

DÁVILA, J. L. et al. A parameterized g-code compiler for scaffolds 3D bioprinting. **Bioprinting**, v. 27, p. e00222, 2022.

DÁVILA, J. L. et al. Open-source syringe extrusion head for shear-thinning materials 3D printing. **Rapid Prototyping Journal**, v. 28, n. 8, p. 1452–1461, 2 ago. 2022.

DIAMANTIDES, N. et al. Correlating rheological properties and printability of collagen bioinks: The effects of riboflavin photocrosslinking and pH. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, 2017. 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. EDGAR, K. J.; COMPANY, E. C.; SCHULTZ, T. P. Comprehensive Cellulose Chemistry. Volume 1. Fundamentals and Analytical Methods By D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, and W. Wagenknecht. Wiley: Weinheim, Germany. 1998. 260 pp. \$236.25. ISBN 3-527-29413-9. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 37, p. 8677–8677, 1999. EIVAZZADEH-KEIHAN, R. et al. Recent advances on biomedical applications of pectincontaining biomaterials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 217, n. April, p. 1–18, 2022.

FLUTTO, L. PECTIN | Properties and Determination. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. [s.l: s.n.]. p. 4440–4449.

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, M. et al. Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole-segment tracheal repair. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

GATENHOLM, P. et al. Development of Nanocellulose-Based Bioinks for 3D Bioprinting of Soft Tissue. **3D Printing and Biofabrication**, p. 1–23, 2016.

GAWKOWSKA, D.; CYBULSKA, J.; ZDUNEK, A. Structure-related gelling of pectins and linking with other natural compounds: A review. **Polymers**, v. 10, n. 7, 2018.

GHORBANI, M.; ROSHANGAR, L.; SOLEIMANI RAD, J. Development of reinforced chitosan/pectin scaffold by using the cellulose nanocrystals as nanofillers: An injectable hydrogel for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 130, n. February, p. 109697, 2020.

GONZÁLEZ MORENO, A. et al. Pectin-cellulose nanocrystal biocomposites: Tuning of physical properties and biodegradability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 180, p. 709–717, 2021.

GRISHKEWICH, N. et al. Recent advances in the application of cellulose nanocrystals. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 29, p. 32–45, 2017.

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

GU, Z. et al. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications.

Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 15, n. 5, p. 529–557, 2020.

HE, Y. et al. Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016.

HEUX, L.; CHAUVE, G.; BONINI, C. Nonflocculating and chiral-nematic self-ordering of cellulose microcrystals suspensions in nonpolar solvents. **Langmuir**, v. 16, n. 21, p. 8210–8212, 2000.

HOCKADAY, L. A. et al. Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds. Biofabrication, v. 4, n. 3, 2012.HOSPODIUK, M. et al. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials.

Biotechnology Advances, v. 35, n. 2, p. 217–239, 2017.

JALALVANDI, E.; SHAVANDI, A. Shear thinning/self-healing hydrogel based on natural polymers with secondary photocrosslinking for biomedical applications. **Journal of the**

Mechanical Behavior of Biomedical Materials, v. 90, n. October 2018, p. 191–201, 2019.

JAVANBAKHT, S.; NAMAZI, H. Doxorubicin loaded carboxymethyl cellulose/graphene

quantum dot nanocomposite hydrogel films as a potential anticancer drug delivery system.

Materials Science and Engineering C, v. 87, n. December 2017, p. 50–59, 2018.

JIANG, H. et al. 3D food printing: main components selection by considering rheological properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 14, p. 2335–2347, 2019. KÁDÁR, R.; SPIRK, S.; NYPELÖ, T. Cellulose Nanocrystal Liquid Crystal Phases: Progress and Challenges in Characterization Using Rheology Coupled to Optics, Scattering, and Spectroscopy. **ACS Nano**, v. 15, n. 5, p. 7931–7945, 2021.

KHALIL, S.; SUN, W. Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 131, n. 11, p. 1–8, 2009.

KHOTIMCHENKO, M. Pectin polymers for colon-targeted antitumor drug delivery.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 158, p. 1110–1124, 2020.

KIRCHMAJER, D. M.; GORKIN, R.; IN HET PANHUIS, M. An overview of the suitability of hydrogel-forming polymers for extrusion-based 3D-printing. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 20, p. 4105–4117, 2015.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

KOKKINIS, D.; SCHAFFNER, M.; STUDART, A. R. Multimaterial magnetically assisted 3D printing of composite materials. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

KONERU, A.; DHARMALINGAM, K.; ANANDALAKSHMI, R. Cellulose based nanocomposite hydrogel films consisting of sodium carboxymethylcellulose–grapefruit seed extract nanoparticles for potential wound healing applications. **International Journal of** Biological Macromolecules, v. 148, p. 833–842, 2020.

KUN, M. et al. **Textile-based scaffolds for tissue engineering**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2019.

KUNDU, A. K.; PUTNAM, A. J. Vitronectin and collagen I differentially regulate osteogenesis in mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, n. 1, p. 347–357, 2006.

KUNDU, B.; KUNDU, S. C. Silk sericin/polyacrylamide in situ forming hydrogels for dermal reconstruction. **Biomaterials**, v. 33, n. 30, p. 7456–7467, 2012.

KUO, C. K. et al. Cartilage tissue engineering: Its potential and uses. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 1, p. 64–73, 2006.

L. FLUTTO. PECTIN | Properties and Determination. In: BENJAMIN CABALLERO (Ed.). .

Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Second Edition ed. [s.l: s.n.]. p. 4440–4449.

LI, D. QIANG et al. Fabrication of self-healing pectin/chitosan hybrid hydrogel via Diels-Alder reactions for drug delivery with high swelling property, pH-responsiveness, and

cytocompatibility. Carbohydrate Polymers, v. 268, n. March, p. 118244, 2021a.

LI, M. et al. MODELING MECHANICAL CELL DAMAGE in the BIOPRINTING PROCESS EMPLOYING A CONICAL NEEDLE. Journal of Mechanics in Medicine and Biology, v. 15, n. 5, p. 1–15, 2015.

LI, X. et al. Premna microphylla Turcz leaf pectin exhibited antioxidant and anti-inflammatory activities in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food Chemistry**, v. 349, n. June 2020, p. 129164, 2021b.

LIU, J. et al. Current advances and future perspectives of 3D printing natural-derived biopolymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, n. November 2018, p. 297–316, 2019.

LIU, L. S. et al. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route.

Biomaterials, v. 24, n. 19, p. 3333–3343, 2003.

LIU, X. et al. Fabrication of cellulose nanocrystal reinforced nanocomposite hydrogel with selfhealing properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 240, n. April, p. 116289, 2020.

MALI, P.; SHERJE, A. P. Cellulose nanocrystals: Fundamentals and biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 275, p. 118668, jan. 2022.

MARKSTEDT, K. et al. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 5, p. 1489–1496, 2015.

MATAI, I. et al. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. **Biomaterials**, v. 226, n. June 2019, p. 119536, 2020.

MISHRA, S. Application of 3D printing in medicine. **Indian Heart Journal**, v. 68, n. 1, p. 108–109, 2016.

MOHAMMED, A. A. et al. 3D Printing in medicine: Technology overview and drug delivery applications. **Annals of 3D Printed Medicine**, v. 4, p. 100037, 2021.

MOHD, N. et al. Dissolution of cellulose in ionic liquid: A review. AIP Conference

Proceedings, v. 1809, n. February, 2017.

MORONI, L. et al. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine.

Nature Reviews Materials, v. 3, n. 5, p. 21–37, 2018.

MORRISON, F. A. **Understanding Rheology**. 1. ed. New York: Oxford University Press, Inc., 2001. v. 11

MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681–689, 2012.

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

NAGHIEH, S.; CHEN, X. Printability–A key issue in extrusion-based bioprinting. Journal of Pharmaceutical Analysis, v. 11, n. 5, p. 564–579, 2021.

NAM, S. et al. Varying PEG density to control stress relaxation in alginate-PEG hydrogels for

3D cell culture studies. Biomaterials, v. 200, n. September 2018, p. 15–24, 2019.

NISHIYAMA, Y. et al. Periodic disorder along ramie cellulose microfibrils.

Biomacromolecules, v. 4, n. 4, p. 1013–1017, 2003.

OGUZLU, H.; DANUMAH, C.; BOLUK, Y. Colloidal behavior of aqueous cellulose nanocrystal suspensions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 29, p. 46–56, 2017.

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.

OZBOLAT, I. T.; HOSPODIUK, M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. **Biomaterials**, v. 76, p. 321–343, 2016.

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

PALAGANAS, N. B. et al. 3D printing of photocurable cellulose nanocrystal composite for

fabrication of complex architectures via stereolithography. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 39, p. 34314–34324, 2017.

PANWAR, A.; TAN, L. P. Current status of bioinks for micro-extrusion-based 3D bioprinting. **Molecules**, v. 21, n. 6, 2016.

PARK, S. Y. et al. Tissue-engineered artificial oesophagus patch using three-dimensionally printed polycaprolactone with mesenchymal stem cells: A preliminary report. **Interactive**

Cardiovascular and Thoracic Surgery, v. 22, n. 6, p. 712–717, 2016.

PARKER, R. M. et al. The Self-Assembly of Cellulose Nanocrystals: Hierarchical Design of Visual Appearance. **Advanced Materials**, v. 30, n. 19, 2018.

PATI, F. et al. Ornamenting 3D printed scaffolds with cell-laid extracellular matrix for bone tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 37, p. 230–241, 2015.

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, 2017. PEAK, C. W. et al. Nanoengineered Colloidal Inks for 3D Bioprinting. **Langmuir**, v. 34, n. 3, p. 917–925, 2018.

RADHAKRISHNAN, J. et al. Injectable and 3D Bioprinted Polysaccharide Hydrogels: From Cartilage to Osteochondral Tissue Engineering. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 1, p. 1–26, 2017. RAFIEIAN, S. et al. A review on nanocomposite hydrogels and their biomedical applications.

IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, v. 26, n. 1, p. 154–174, 2019. RAJABNEJADKELESHTERI, A. et al. Preparation of microfluidic-based pectin microparticles loaded carbon dots conjugated with BMP-2 embedded in gelatin-elastin-hyaluronic acid hydrogel scaffold for bone tissue engineering application. **International Journal of Biological**

Macromolecules, v. 184, n. May, p. 29–41, 2021.

RAKHSHAEI, R. et al. Graphene quantum dot cross-linked carboxymethyl cellulose nanocomposite hydrogel for pH-sensitive oral anticancer drug delivery with potential bioimaging properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1121–1129, 2020. RÅNBY, B. G. III. Fibrous macromolecular systems. Cellulose and muscle. The colloidal properties of cellulose micelles. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. 111, p. 158–164, 1951.

SEOL, Y. J. et al. Bioprinting technology and its applications. **European Journal of Cardiothoracic Surgery**, v. 46, n. 3, p. 342–348, 2014.

SHTEIN, I. et al. Stomatal cell wall composition: Distinctive structural patterns associated with

different phylogenetic groups. Annals of Botany, v. 119, n. 6, p. 1021–1033, 2017.

SLAUGHTER, B. V. et al. Hydrogels in regenerative medicine. Advanced Materials, v. 21, n. 32–33, p. 3307–3329, 2009.

SMITH, A. M.; MOXON, S.; MORRIS, G. A. **Biopolymers as wound healing materials**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 2

STUDART, A. R. Additive manufacturing of biologically-inspired materials. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 2, p. 359–376, 2016.

SUNG, H. W. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 10, n. 1, p. 63–78, 1999.

SUNGTHONGJEEN, S. et al. Effect of degree of esterification of Sungthongjeen, S.,

Sriamornsak, P., Pitaksuteepong, T., Somsiri, A., & Puttipipatkhachorn, S. (2004). Effect of degree of esterification of pectin and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets. A. **AAPS PharmSciTech**, v. 5, n. 1, p. E9, 2004.

THOMAS, P. et al. Comprehensive review on nanocellulose: Recent developments, challenges and future prospects. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 110, n. November 2019, p. 103884, 2020.

TIAN, X. Y. et al. Characterization of the flow behavior of alginate/hydroxyapatite mixtures for tissue scaffold fabrication. **Biofabrication**, v. 1, n. 4, 2009.

TOWNSEND, J. M. et al. Flow behavior prior to crosslinking: The need for precursor rheology for placement of hydrogels in medical applications and for 3D bioprinting. **Progress in Polymer Science**, v. 91, p. 126–140, 2019.

UNAGOLLA, J. M.; JAYASURIYA, A. C. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. **Applied Materials Today**, v. 18, p. 100479, 2020.

UREÑA-BENAVIDES, E. E. et al. Rheology and phase behavior of lyotropic cellulose nanocrystal suspensions. **Macromolecules**, v. 44, n. 22, p. 8990–8998, 2011.

VALOT, L. et al. Chemical insights into bioinks for 3D printing. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 15, p. 4049–4086, 2019.

VAN DEN BULCKE, A. I. et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 1, p. 31–38, 2000.

VAN KAMPEN, K. A. et al. Biofabrication: From additive manufacturing to bioprinting.

Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 1–3, p. 41–55, 2019. WANG, X. et al. 3D bioprinting technologies for hard tissue and organ engineering. **Materials**, v. 9, n. 10, p. 1–23, 2016.

WATTS, P.; SMITH, A. PecSys: In situ gelling system for optimised nasal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, n. 5, p. 543–552, 2009.

WICHTERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. **Nature Reviews Materials**, v. 185, p. 117–118, 1960.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 97–104, 2006.

WIN, P. et al. Covalently cross-linked layered double hydroxide nanocomposite hydrogels with ultrahigh water content and excellent mechanical properties. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, n. October 2017, p. 409–415, 2018a.

WIN, P. et al. Covalently cross-linked layered double hydroxide nanocomposite hydrogels with ultrahigh water content and excellent mechanical properties. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, n. August 2017, p. 409–415, 2018b.

WU, Y. et al. 3D bioprinting of liver-mimetic construct with alginate/cellulose nanocrystal hybrid bioink. **Bioprinting**, v. 9, n. August 2017, p. 1–6, 2018.

XIONG, B. et al. Preparation, characterization, antioxidant and anti-inflammatory activities of acid-soluble pectin from okra (Abelmoschus esculentus L.). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 824–834, 2021.

YANG, S. et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 6, p. 679–689, 2001.

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.

YUAN, W. et al. Bisphosphonate-based nanocomposite hydrogels for biomedical applications. **Bioactive Materials**, v. 5, n. 4, p. 819–831, 2020.

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

ZHANG, S.; WANG, H. Current Progress in 3D Bioprinting of Tissue Analogs. SLAS

Technology, v. 24, n. 1, p. 70–78, 2019.

ZHAO, H. et al. Nanocomposite hydrogels for tissue engineering applications. **Nanoscale**, v. 12, n. 28, p. 14976–14995, 2020a.

ZHAO, X. et al. Facile synthesis of nano-nanocarriers from chitosan and pectin with improved stability and biocompatibility for anthocyanins delivery: An in vitro and in vivo study. **Food Hydrocolloids**, v. 109, n. June, p. 106114, 2020b.

ZHOU, S. et al. Decahedral nanocrystals of noble metals: Synthesis, characterization, and applications. **Materials Today**, v. 22, n. February, p. 108–131, 2019.