



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Mecânica

ERONILDO ALVES PINTO JUNIOR

**Manufatura Aditiva Baseada em Extrusão
de Hidrogéis do Sistema Alginato /
Nanocelulose Para Aplicações Biomédicas**

CAMPINAS
2023

ERONILDO ALVES PINTO JUNIOR

Manufatura Aditiva Baseada em Extrusão de Hidrogéis do Sistema Alginato / Nanocelulose Para Aplicações Biomédicas

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila
Coorientadora: Profa. Dra. Aline Mara dos Santos

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
ERONILDO ALVES PINTO JUNIOR, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. MARCOS AKIRA d'ÁVILA.

**CAMPINAS
2023**

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

P658m Pinto Junior, Eronildo Alves, 1990-
Manufatura aditiva baseada em extrusão de hidrogéis do sistema alginato/nanocelulose para aplicações biomédicas / Eronildo Alves Pinto Junior. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Marcos Akira D'Ávila.

Coorientador: Alina Mara dos Santos.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Impressão tridimensional. 2. Hidrogéis. 3. Engenharia tecidual. 4. Ferimentos e lesões - Tratamentos. 5. Nanocompósitos (materiais). I. D'Ávila, Marcos Akira, 1972-. II. Santos, Alina Mara dos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Additive manufacturing based on extrusion of alginate/nanocellulose for biomedical applications

Palavras-chave em inglês:

Three-dimensional printing

Hydrogels

Tissue engineering

Wounds and injuries - Treatments

Nanocomposites (materials)

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Doutor em Engenharia Mecânica

Banca examinadora:

Marcos Akira D'Ávila [Orientador]

Lais Pellizer Gabriel

Eliana Aparecida de Rezende Duek

Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano

José Luís Dávila Sánchez

Data de defesa: 11-08-2023

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5157-4379>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/0762516343952041>

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA**

TESE DE DOUTORADO ACADÊMICO

Manufatura Aditiva Baseada em Extrusão de Hidrogéis do Sistema Alginato / Nanocelulose Para Aplicações Biomédicas

Autor: Eronildo Alves Pinto Junior

Orientador: Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila

Coorientadora: Profa. Dra. Aline Mara dos Santos

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Tese:

**Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila, Presidente
DEM/FEM/Universidade Estadual de Campinas**

**Profa. Dra. Laís Pellizzer Gabriel
FCA/ Universidade Estadual de Campinas**

**Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek
FCMS/Pontifícia Universidade Católica de São Paulo**

**Profa. Dra. Juliana Kelmy Macário Barboza Daguano
CEM-SBC/Universidade Federal do ABC
DITPS/ Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer**

**Dr. José Luís Dávila Sánchez
593iCAN Ltda**

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

Campinas, 11 de agosto de 2023.

Dedicatória

*Aos meus queridos pais, por todo apoio e dedicação durante minha trajetória
educacional e profissional.*

À minha filha, pois ela é o motivo por quem sempre busco o melhor.

Aos meus amigos, por sempre estarem comigo em todos os momentos.

Eronildo

Agradecimentos

Gostaria de agradecer e expressar minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram para a conclusão dessa tese:

Aos meus pais, irmãos e minha filha, que são a base de tudo na minha vida, por todo apoio, carinho e dedicação.

À minha noiva Letícia Bazilio Rosa por todo apoio e por estar no meu lado em momentos tão difíceis.

Ao Prof. Dr. Marcos Akira d'Ávila por depositar sua confiança em meu trabalho, por suas orientações e contribuições para esta pesquisa.

À Profa. Dra. Aline Mara dos Santos pela coorientação e contribuições para essa pesquisa.

Aos meus amigos do República Bar do Bira por todo carinho e apoio nos momentos difíceis.

Aos meus colegas de laboratório, Jéssica, Ingri e Rafael.

Ao Professor PhD. Dimitrios Lamprou e a Escola de Farmácia da Queens University of Belfast por terem me recebido no meu doutorado sanduíche.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº #421745/2016-9 e 140376/2019-4.

Agradecemos o acesso aos equipamentos e auxílios do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas; O INFABIC é cofinanciado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2014/50938-8) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (465699/2014-6).

Agradecemos também ao Prof. Dr. Danilo Miguel, a MSc. Letícia Bazílio pelos acessos aos equipamentos e estrutura do Laboratório de estudos de biologia da infecção por leishmania.

Resumo

A crescente necessidade por soluções biomédicas inovadoras tem motivado o desenvolvimento de técnicas avançadas de manufatura. A impressão 3D baseada em extrusão, uma técnica da manufatura aditiva, tem emergido como uma tecnologia versátil, de baixo custo e com um vasto potencial na área biomédica, onde o interesse na impressão 3D utilizando hidrogéis têm crescido nos últimos anos. Hidrogéis são estruturas tridimensionais de polímeros hidrofílicos com alta capacidade de absorção de água. Sua biocompatibilidade e biodegradabilidade os tornam atrativos para desenvolvimento de tintas e biotintas para aplicações na engenharia tecidual e cicatrização de feridas. O sistema alginato/nanocelulose (CNC) se destaca por suas propriedades mecânicas e interação celular, sendo promissor para várias aplicações biomédicas. Essa pesquisa concentrou-se na exploração da manufatura aditiva por extrusão de hidrogéis, com ênfase no sistema alginato/CNC, incluindo variantes com colágeno e quitosana, para aplicações em engenharia tecidual e tratamento tópico da leishmaniose cutânea. A viabilidade celular dos *scaffolds* de alginato/CNC foi avaliada, com resultados não tóxicos para fibroblastos (NIH3T3), destacando-se a mistura com melhor viabilidade após 3 dias de cultura. A biotinta do sistema não teve suas propriedades reológicas afetadas pela densidade celular de 10^6 células/mL, preservando sua capacidade de impressão. A bioimpressão de *scaffolds* alginato/CNC com células NIH3T3 foi realizada, analisando-se adesão e morfologia após 3 dias de cultivo. Seguidamente, em um segundo estudo de caso, foi avaliado as propriedades reológicas e capacidade de impressão de *scaffolds* multicamada do sistema alginato/CNC/quitosana e alginato/CNC/colágeno. As concentrações de CNC e quitosana influenciaram significativamente nas propriedades reológicas e capacidade de impressão devido às suas interações eletrostáticas. As caracterizações química (FTIR) e térmica (DSC) demonstraram a incorporação do óleo essencial de melaleuca (TTO) nos *scaffolds* do sistema alginato/CNC/colágeno e testes *in vitro* demonstraram boa atividade leishmanicida do TTO para parasitas da espécie *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

Palavras Chave: Impressão 3D baseada e extrusão; Hidrogéis nanocompósitos; Engenharia tecidual; Tratamento de feridas; Leishmaniose cutânea;

Abstract

The growing need for innovative biomedical solutions has motivated the development of advanced manufacturing techniques. Extrusion based 3D printing, an additive manufacturing technique, has emerged as a versatile, low-cost technology with vast potential in the biomedical field, where extrusion printing of hydrogels has grown in recent years. Hydrogels are three-dimensional structures of hydrophilic polymers with high water absorption capacity. Their biocompatibility and biodegradability make them attractive for the development of inks and bioinks in tissue engineering and wound healing applications. The alginate/nanocellulose (CNC) system stands out for its mechanical properties and cellular interaction, making it promising for various biomedical applications. This research has focused on exploring extrusion-based 3D printing of hydrogels, with emphasis on the alginate/nanocellulose system, including variants with collagen and chitosan, aiming tissue engineering and topical treatment of cutaneous leishmaniasis. The cell viability of the alginate/CNC scaffolds was evaluated, with non-toxic results for fibroblasts (NIH3T3), highlighting the mixture with the best viability after 3 days of culture. The bioink's rheological properties were not affected by a cell density of 10^6 cells/mL, preserving its printing capacity. Bioprinting of alginate/CNC scaffolds with NIH3T3 cells was carried out, and adhesion and morphology were analyzed after 3 days of cultivation. Subsequently, in a second case study, the rheological properties and printing capacity of multilayer scaffolds from the alginate/CNC/chitosan and alginate/CNC/collagen systems were evaluated. CNC and chitosan concentrations significantly influenced rheological properties and printing capacity due to their electrostatic interactions. Chemical (FTIR) and thermal (DSC) characterizations demonstrated the incorporation of tea tree oil (TTO) in the alginate/CNC/collagen system scaffolds, and *in vitro* tests demonstrated good leishmanicidal activity of TTO for parasites of the species *L. amazonensis* and *L. braziliensis*.

Keywords: Extrusion based 3D printing; Nanocomposite hydrogels; Tissue engineering; Wound treatment; Cutaneous leishmaniasis.

Lista de Ilustrações

- Figura 2.1 Diagrama esquemático para ilustrar os princípios de funcionamento da técnica de impressão 3D baseada em extrusão. Adaptado de (Malda et al., 2013). 30
- Figura 2.2: Diferenciação entre Biotinta e Tinta de Biomaterial. Na figura, podemos observar a distinção entre a biotinta (à esquerda), que requer a presença de células individuais, células revestidas ou agregados celulares (compostos por um ou mais tipos de células) em sua formulação de impressão, podendo também ser combinada com materiais diversos (como microtransportadores, microgéis ou precursores de hidrogel) para uso. Por outro lado, à direita, temos a tinta de biomaterial, que utiliza um biomaterial específico para a impressão, sendo o contato celular estabelecido após o processo de fabricação. É importante notar que as imagens presentes neste esquema não estão representadas em escala (Groll et al, 2018). 37
- Figura 2.3: Estrutura química da cadeia de alginato. (a) Blocos G, (b) Blocos M e (c) Blocos M-G-M. Adaptado de (Rastogi & Kandasubramanian, 2019). 38
- Figura 2.4: Reticulação do alginato. (a) Uma representação de uma cadeia de alginato reticulada após a adição de CaCl_2 . Nesta figura, apenas três cadeias são mostradas, mas o polímero natural é composto por cadeias longas e, portanto, uma rede mais emaranhada, (b) Estrutura de reticulação iônica dos blocos G de alginato com íons de cálcio formando a “caixa de ovos”. Adaptado de (Hu & Lo, 2021; Rastogi & Kandasubramanian, 2019) 39
- Figura 2.5: Celulose nanocristalina. Diferentes tipos de celulose têm diferentes propriedades estruturais (como celulose nanofibrilada e celulose nanocristalina de origem vegetal tem diâmetro variando de 5-60 nm a 5-70 nm, respectivamente, enquanto a nanocelulose bacteriana tem um diâmetro de 20-100 nm) devido à ligação de hidrogênio em grupos -OH (A). Celulose bacteriana (B). Celulose vegetal (CNC). Adaptado de (Julkapli e Bagheri, 2017). 40

Figura 2.6: Representação esquemática da estrutura (a) quitina e quitosana (b) unidades de β -D-glucosamina (GlcN) e N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). Adaptado de (Naveed et al., 2019)..... 44

Figura 2.7: Estrutura do colágeno (a) Tripla hélice (b) X e Y representam principalmente resíduos de prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp) (c) Pontes de hidrogênio e interações $n-\pi^*$ do colágeno, sendo representadas por linhas tracejadas azuis e vermelhas, respectivamente. Adaptado de (Rezvani Ghomi et al., 2021). 46

Figura 2.8: Visão geral das técnicas de reforço mecânico. Tintas/biotintas convencionais são tipicamente redes únicas com ligações cruzadas aleatoriamente. As técnicas estabelecidas para o reforço mecânico de tintas/biotintas incluem funcionalização de polímero, redes interpenetradas (IPNs) e biotinta baseada em nanocompósitos. Adaptado de (Chimene et al., 2020)..... 48

Figura 2.9: Biotinta baseada em reforço de nanocompósitos. Nanopartículas com uma variedade de tamanhos, formas e químicas de superfície podem reforçar mecanicamente as biotintas por meio de interações físicas e covalentes. Nanopartículas bioativas são capazes de direcionar a função celular em estruturas bioimpressas 3D. Adaptado de (Chimene et al., 2020) 50

Figura 2.10: Parâmetros reológicos são importantes na impressão 3D por extrusão. Durante o processo, é necessário aplicar uma força maior que a tensão de escoamento do material para movê-lo. A velocidade da tinta aumenta no centro do bocal e diminui perto das paredes. A tensão de cisalhamento é maior perto das paredes e menor no centro. Para uma impressão 3D precisa, é crucial que os materiais se recuperem após a deformação pela tensão de cisalhamento. Adaptado de (Bom et al., 2022)..... 53

Figura 2.11: O comportamento de fluxo dos materiais é determinado pela relação entre a tensão de cisalhamento (τ) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). Essa relação é visualizada graficamente, onde a inclinação da curva resultante é conhecida como viscosidade. A partir do perfil da curva, os materiais podem ser classificados de acordo com seu comportamento de fluxo. Essa classificação desempenha um papel crucial na compreensão do comportamento dos materiais durante o processo de impressão 3D e

fornece informações valiosas sobre a extrusão, manipulação e deposição dos materiais. Adaptado de (Morrison, 2001). 56

Figura 2.12: Testes de cisalhamento oscilatório de pequena amplitude (SAOS), a) Teste de amplitude, os módulos G' e G'' são medidos em função da deformação para determinar a região de viscoelasticidade linear (LVER), também é possível determinar os pontos de escoamento e de fluxo do hidrogel, b) Teste de varredura de frequência, através do ensaio de varredura de frequência é possível determinar a estrutura do material e os emaranhamentos moleculares que ocorrem desde baixas até frequências mais altas. Adaptado de (Mu et al., 2021). 59

Figura 2.13: Teste de tixotropia de três intervalos de tempo. Esse teste pode ser realizado para investigar o comportamento de recuperação da viscosidade da estrutura impressa em 3D e o tempo necessário para que isso ocorra; este teste mede a viscosidade em 3 intervalos de cisalhamento. Adaptado de (Mu et al., 2021). 60

Figura 2.14: Infecção por *Leishmania braziliensis* com disseminação cutânea. (Mokni, 2019). 67

Figura 2.15: O ciclo de vida da *Leishmania* envolve a interação entre um hospedeiro mamífero e um inseto vetor, com diferentes formas biológicas. 68

Figura 3.1: Porcentagem média da viabilidade de fibroblastos de camundongo (NIH3T3): (a) comparação entre o Alginato puro e Alginato/CNC (mix) para o tempo de 12 horas, (b) comparação entre o CNC puro e Alginato/CNC (mix) para o tempo de 12 horas e (c) Alginato/CNC nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. 79

Figura 3.2: (a) Curvas de viscosidade como função da taxa de cisalhamento da tinta e biotinta e (b) Comportamento viscoelástico, módulo elástico (G') (símbolos fechados) e módulo de perda (G'') (símbolos abertos) da tinta e biotinta. 80

Figura 3.3: (a) *Scaffold* impresso, (b) Imagem do microscópio ótico, *scaffold* de Alginato/CNC em cultura com NHIT3T por 3 dias. 81

Figura 3.4: Microscopia confocal de fluorescência para as células NIH3T3 semeadas sobre o *scaffold* e coradas com calceína - AM e homodímero de etídio - I após 3 dias de cultura. (a) controle; (b) as células vivas em verde, (c) as células mortas em vermelho. Barras de escala a 100 μm para (a) e 10 μm para (b, c e d). Magnificação 40x..... 82

Figura 3.5: Marcação com DAPI/faloidina após 3 dias de cultura dos *scaffolds* em células do tipo NIH3T3. (a) grupo de controle NIH3T3, (b) marcação nuclear DAPI (azul), (c) F-actina marcada com faloidina (magenta) e (d) imagem fluorescente sobreposta de componentes celulares imunocorados (mesclados). Barras de escala: 100 μm para (a) e 10 μm para (b, c e d). Ampliação 40x. 84

Figura 4.1: Viscosidade (η) como função da taxa de cisalhamento (γ): (a) géis de alginato puro, CNC puro, Alginato/CNC e Alginato/CNC/Quitosana (b) géis de Alginato/CNC/Quitosana com variação da concentração de quitosana. 95

Figura 4.2: Esquema das reações e interações envolvidas na síntese dos géis de Alginato/CNC/Quitosana: Interação do complexo polieletrólito entre alginato e quitosana (a), o mecanismo de formação de hidrogéis compostos Alginato/CNC/Quitosana (b) e pontes de hidrogênio entre CNC (c). Adaptada de (Deng et al., 2021)..... 95

Figura 4.3: Módulo de armazenamento (G') (símbolos sólidos) e módulo de perda (G'') (símbolos abertos) em função de: (a) tensão (γ) e (b) frequência angular (ω). Géis de alginato, CNC, alginato/CNC e alginato/CNC/quitosana. 97

Figura 4.4: Viscosidade (η) em função do tempo (t) para o teste de recuperação para os géis de Alginato/CNC/Quitosana. 99

Figura 4.5: Viscosidade (η) como função da taxa de cisalhamento (γ) para os géis de Alginato/Colágeno e Alginato/CNC/Colágeno, variando-se a concentração de CNC. 100

Figura 4.6: Módulo de armazenamento (G') (símbolos sólidos) e módulo de perda (G'') (símbolos abertos) em função de: (a) tensão (γ) e (b) frequência angular (ω). Géis de alginato/CNC/colágeno. 101

Figura 4.7: Viscosidade (η) em função do tempo (t) para o teste de recuperação para os géis de Alginato/CNC/Colágeno.	102
Figura 4.8: Avaliação da capacidade de impressão dos géis de Alginato/CNC/Quitosana em diferentes pressões de extrusão.....	104
Figura 4.9: Avaliação da capacidade de impressão dos géis de Alginato/CNC/Colágeno em diferentes pressões de extrusão.....	105
Figura 4.10: Espectro de infravermelho de (a) quitosana, (b) gel e hidrogel do sistema Alginato/CNC/Quitosana, (c) alginato, CNC, quitosana, Alginato/CNC/Quitosana reticulados e não reticulados.....	108
Figura 4.11: Espectro de infravermelho de (a) colágeno, (b) TTO, (c) alginato, TTO, Alginato/CNC/Colágeno com e sem TTO incorporados.....	110
Figura 4.12: Curvas de DSC para (a) Alginato de sódio (b) CNC (c) Quitosana e (d) Géis e hidrogéis do sistema Alginato/CNC/Quitosana.....	111
Figura 4.13: Curvas de DSC para (a) Colágeno tipo I (b) Óleo essencial de melaleuca (TTO) (c) Alginato/CNC/Colágeno e (d) Alginato/CNC/Colágeno com TTO incorporado.....	113
Figura 4.14: Micrografias MEV dos <i>scaffolds</i> do sistema Alginato/CNC/Quitosana (a) magnificação de 50x; (b) magnificação de 1200x; (c) magnificação de 600x e (d) magnificação de 1800x.....	114
Figura 4.15: Micrografias MEV dos <i>scaffolds</i> do sistema Alginato/CNC/Colágeno (a) sem TTO incorporado e magnificação de 800x; (b) com TTO incorporado e magnificação de 250x e (c) com TTO incorporado e magnificação de 800x.....	115
Figura 4.16: Viabilidade celular de promastigotas de (a) <i>L. amazonensis</i> e (b) <i>L. braziliensis</i> incubados com TTO por 24 e 48h. Cada concentração está expressa como	

média \pm desvio padrão da % de células viáveis das triplicatas de um único ensaio e os valores de EC50 expressos em $\mu\text{g/mL}$ 116

Figura 4.17: Micrografias obtidas de esfregaços de cultura de promastigotas incubadas com TTO. (a) e (b) Controle não tratados com parasitas exibindo morfologia fusiforme (setas pretas) e em divisão (setas vermelhas). (c) e (d) Promastigotas tratadas com 78 $\mu\text{g/mL}$ de TTO. (e) e (f) Promastigotas tratadas com 625 $\mu\text{g/mL}$ de TTO (próximo ao EC50), apresentam arredondamento do corpo celular (setas amarelas). (g) e (h) Promastigotas tratadas com 1250 $\mu\text{g/mL}$ de TTO, apresentam baixa densidade e viabilidade celular..... 119

Figura 4.18: Viabilidade celular para os *scaffolds* incorporados com diferentes concentrações de TTO após 24h de incubação para *L. amazonensis*. (a) Porcentagem de células viáveis nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL de TTO incorporados nos *scaffolds*. (b) *Scaffolds* após 24h de cultura e adição de MTT. 120

Figura 4.19: Viabilidade celular de macrófagos de linhagem RAW 264.7 incubados com TTO por 24h. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão da % de células viáveis das triplicatas experimentais e os resultados de CC50 como $\mu\text{g/mL}$ 122

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Comparação entre as técnicas de impressão 3D de hidrogéis. Adaptado de (Antunes, 2022; Zhang et al., 2018).	29
Tabela 2.2: Análise comparativa de diferentes técnicas de bioimpressão 3D para hidrogéis. Adaptado de (Ng et al., 2019).’	32
Tabela 2.3: Método de preparação para hidrogéis baseados em CNCs e suas aplicações. Adaptado de (De France et al., 2017).	41
Tabela 4.1: Concentrações dos géis de Alginato/CNC/Quitossana.	88
Tabela 4.2: Parâmetros de impressão dos scaffolds	90
Tabela 4.3: Concentração inibitória de TTO em promastigotas (EC50).	117
Tabela 4.4: Viabilidade celular para o TTO puro e <i>scaffolds</i> incorporados em cultura com <i>L. amazonensis</i> após 24h. A linha em vermelho indica o EC50 para o óleo puro. A média e o desvio padrão é baseado na triplicata de 1 experimento.	121
Tabela 4.5: Viabilidade celular do TTO em macrófagos e índice de seletividade	122

Lista de abreviaturas

MA – Manufatura aditiva
3D - Tridimensional
MEC - Matriz extracelular
LC – Leishmaniose cutânea
OMS – Organização Mundial da Saude
OE – Óleos essenciais
TTO – Tea Tree Oil
CNC – Celulose nanocristalina
CAD - Computer-aided design
CAM - Computer-aided manufacturing
GlcNAc – N-acetil-D-glucosamina
GlcN – β -D-glucosamina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
Pro – Prolina
Hyp – Hidroxiprolina
IPNs – Interpenetrating polymer network
CNTs – Carbon nanotubes
PEG – Polietilenoglicol
CMC – Carboximetil celulose
 η – Viscosidade
 τ – Tensão de cisalhamento
 $\dot{\gamma}$ – Taxa de cisalhamento
K – Índice de consistência
G' – Módulo de armazenamento elástico
G'' – Módulo de perda viscosa
LVE – Região viscoelástica linear
Tan δ – Fator de amortecimento
3ITT – Teste de tixotropia de 3 etapas
GelMA – Gelatina Metacrilada
ZnO – Óxido de zinco
PVA – Poliálcool vinílico

AmB – Anfoteracina B

Alg – Alginato

Sb III – Antimônias trivalentes

SB V - Antimônias pentavalentes

T4O – terpine-4-ol

IC50 – concentração necessária para eliminar 50% da carga parasitária

DMSO – Dimetilsufóxido

UV – Ultravioleta

FBS – Soro fetal bovino

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Objetivos	24
1.2 Motivação e estrutura da tese	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Impressão 3D.....	27
2.1.1 Impressão 3D baseada em extrusão.....	30
2.2 Bioimpressão 3D	31
2.3 Biomateriais para impressão 3D.....	33
2.3.1 Hidrogéis	34
2.3.2 Tinta e Biotinta	35
2.3.3 Alginato	37
2.3.4 Celulose nanocristalina (CNC).....	40
2.3.5 Compósitos de alginato – celulose nanocristalina (CNC).....	42
2.3.6 Quitosana.....	43
2.3.7 Colágeno.....	45
2.4 Técnicas de reforço de hidrogéis para impressão/bioimpressão 3D.....	48
2.4.1 Reforço por nanocompósitos.....	49
2.5 Parâmetros reológicos de tintas e biotintas no processo de impressão 3D baseado em extrusão	52
2.5.1 Viscosidade.....	54
2.5.2 Comportamento viscoelástico	57
2.5.3 Recuperação da viscosidade	60
2.6 Aplicações biomédicas	61
2.6.1 Engenharia tecidual	62
2.6.2 Tratamento de feridas	64

3 IMPRESSÃO E BIOIMPRESSÃO 3D DE <i>SCAFFOLDS</i> DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE, ADESÃO E MORFOLOGIA CELULAR.....	72
3.1 Material e Métodos	73
3.1.1 Material.....	73
3.1.2 Preparação da tinta e biotinta.....	73
3.1.3 Cultura celular	74
3.1.4 Avaliação da citotoxicidade	74
3.1.5 Caracterização Reológica da Biotinta.....	75
3.1.6 Impressão e bioimpressão dos <i>scaffolds</i>	75
3.1.7 Avaliação da viabilidade celular	76
3.1.8 Morfologia e adesão celular	77
3.2 Resultados e Discussão.....	77
3.2.1 Avaliação da citotoxicidade	77
3.2.3 Preparo e caracterização reológica da biotinta	79
3.2.4 Avaliação da viabilidade celular	80
3.2.5 Morfologia e adesão celular	83
3.3 Conclusões.....	85
4 IMPRESSÃO 3D DE <i>SCAFFOLDS</i> MULTICAMADAS DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA INCORPORADO COMO POTENCIAL TRATAMENTO TÓPICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA	86
4.1 Material e Métodos	87
4.1.1 Material.....	87
4.1.2 Preparação dos géis da primeira região: Alginato/CNC/Colágeno com óleo essencial de Melaleuca (<i>Tea Tree Oil</i>) incorporado.....	87
4.1.3 Preparação dos géis da segunda região: Alginato/CNC/Quitossana.....	88
4.1.4 Caracterização Reológica	89

4.1.5 Impressão 3D e Capacidade de impressão	89
4.1.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)...	91
4.1.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	91
4.1.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	91
4.1.9 Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de melaleuca (TTO).....	92
4.2 Resultados e Discussão.....	93
4.2.1 Caracterização reológica dos géis de Alginato/CNC/Quitosana	93
4.2.2 Caracterização reológica dos géis de Alginato/CNC/Colágeno	99
4.2.3 Impressão 3D e Capacidade de impressão	102
4.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	106
4.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	110
4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	113
4.2.7 Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de melaleuca (TTO).....	116
4.3 Conclusões.....	123
5 CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS	124
Referências.....	126

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a área da biofabricação tem recebido considerável atenção, sendo um campo de pesquisa em rápido crescimento. Nesta área, são exploradas tecnologias de manufatura aditiva (MA), sendo a impressão 3D a mais utilizada delas, visando a produção de estruturas tridimensionais híbridas (*scaffolds*) compostas por biomateriais, células, fatores de crescimento e compostos bioativos, para aplicações na área biomédica como engenharia tecidual, *drug delivery* e tratamento de feridas (Varma et al., 2020; J. Zhang et al., 2021). Na engenharia tecidual, essa abordagem tem como objetivo tratar, reparar ou substituir tecidos danificados ou órgãos inteiros usando construções funcionais (Advincula et al., 2021). Entretanto, projetar biomateriais que simulam o complexo ambiente e funções do tecido, bem como possuir a maioria das propriedades mecânicas e biológicas necessárias dos tecidos nativos ainda é um grande desafio da biofabricação (Wagner et al., 2020). Nesse contexto, o desenvolvimento de novos materiais com propriedades mecânicas e biológicas que mimetizem o tecido nativo vem sendo muito explorado por pesquisadores de diferentes áreas com o objetivo de superar essas limitações (Jain et al., 2022).

Uma classe de materiais que pode apresentar propriedades comparáveis à matriz extracelular (MEC) nativa, é a dos hidrogéis, que são formados a partir de uma estrutura reticulada de polímeros hidrofílicos altamente hidratados (X. N. Zhang et al., 2022). Quando utilizados na impressão 3D, esses hidrogéis são chamados de tintas ou biotintas, esse último quando incorporado com células, fatores de crescimento ou compostos bioativos (Krishna & Sankar, 2023). No entanto, para obter estruturas tridimensionais adequadas para aplicações biomédicas, frequentemente é necessário modificar as propriedades físicas, químicas e biológicas dos hidrogéis (Munoz-Perez et al., 2023). A composição, concentração de polímeros, tipo e densidade de reticulação dos hidrogéis podem ser ajustadas de forma a adequar suas propriedades mecânicas, distribuição de tamanho de poro e perfil de degradação, como mencionado por Li et al. (2020). Além disso, diversas tecnologias têm sido utilizadas no desenvolvimento de sistemas de hidrogéis que proporcionam um ambiente propício para a interação das células com a matriz e fatores biológicos, visando direcionar suas funções celulares, conforme relatado por Neves et al. (2020). Essas estratégias englobam a funcionalização dos hidrogéis com

peptídeos e proteínas, a criação de redes interpenetrantes e a incorporação de nanopartículas, conforme destacado em trabalhos como os de Huang et al. (2022) e Schipani et al. (2020).

Dentre as abordagens da MA utilizadas para hidrogéis, destacam-se a impressão a jato de tinta, a transferência direta induzida por laser e a impressão baseada em extrusão (Thakar et al., 2022). Esta última se destaca como um método versátil e de baixo custo, com potencial de se obter estruturas impressas com fidelidade de formato e propriedades mecânicas adequadas para diversas aplicações (Jiang et al., 2019). No entanto, para se obter uma boa capacidade de impressão e fidelidade do *scaffold* impresso, é essencial que as propriedades reológicas dos hidrogéis sejam ajustadas quanto ao seu comportamento não-Newtoniano e viscoelástico. Assim, a análise reológica desempenha um papel importante no desenvolvimento de materiais adequados para o processo de impressão baseada em extrusão. Estudos recentes na literatura descreveram técnicas de análise reológica visando maior entendimento das correlações entre a capacidade de impressão e o comportamento reológico desses materiais (Amorim et al., 2021; O'Connell et al., 2020; Townsend et al., 2019).

Um dos sistemas de grande potencial para impressão por extrusão é representado pelos hidrogéis nanocompósitos de polímeros naturais (Cai et al., 2022; Catoira et al., 2019). Embora os polímeros naturais não apresentem boas propriedades mecânicas, a combinação de partículas em escala nanométrica com polímeros biocompatíveis em uma suspensão, pode resultar em materiais que apresentam propriedades reológicas, mecânicas e biológicas adequadas para o processo de impressão baseado em extrusão e aplicações na área biomédica (Zhao et al., 2020). Dentre os sistemas de hidrogéis nanocompósitos utilizados na impressão baseada em extrusão, destaca-se o sistema alginato/nanocelulose (CNC), que tem demonstrado grande potencial para aplicações na área biomédica (Deng et al., 2021; Siqueira et al., 2019).

Outros polímeros naturais como colágeno e quitosana têm sido amplamente explorados na área de impressão 3D para aplicações biomédicas. A utilização desses polímeros oferece uma plataforma versátil para a fabricação de objetos 3D impressos com propriedades biocompatíveis e bioativas (Osidak et al., 2020; Rajabi et al., 2021). O colágeno é uma proteína muito utilizada em aplicações na engenharia tecidual, pois está presente na MEC dos tecidos biológicos, apresentando propriedades bioativas que estimulam a proliferação e diferenciação celular (Rezvani Ghomi et al., 2021). Já a quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, encontrado em crustáceos e fungos.

Possui propriedades antimicrobianas, bioativas e biodegradáveis, tornando-a atraente para aplicações biomédicas (Aranaz et al., 2021). Os hidrogéis de quitosana podem ser formulados com diferentes graus de desacetilação, permitindo o controle da liberação de moléculas bioativas e fatores de crescimento. Na impressão 3D, pode oferecer suporte mecânico e topográfico às células, promovendo adesão e proliferação celular (Sahranavard et al., 2020).

Uma aplicação promissora da impressão 3D de hidrogéis nanocompósitos, é o desenvolvimento de curativos para tratamento de feridas (Smandri et al., 2020). Os progressos recentes na tecnologia de MA têm impulsionado o desenvolvimento de abordagens inovadoras em várias áreas da saúde. A abordagem e o tratamento de feridas crônicas continuam a ser um desafio clínico significativo devido a questões como cicatrização inadequada, tratamentos com baixa eficácia, aumento da incidência de pacientes afetados e o impacto financeiro nos sistemas de saúde (Tabriz & Douroumis, 2022). Feridas crônicas como as úlceras causadas pela leishmaniose cutânea (LC) são tratadas como um problema sério pelos órgãos de saúde de países como Brasil, Colômbia e Peru, onde a doença é considerada endêmica (OMS, 2023). As alternativas terapêuticas atualmente disponíveis para o tratamento da leishmaniose são associadas a questões como alta toxicidade, baixa eficácia, alto custo, desafios na administração e o desenvolvimento de resistência por parte do parasita aos medicamentos utilizados (Severino et al., 2022). Com isso, existe a necessidade de desenvolver novos tratamentos, como a incorporação de compostos com atividade leishmanicida com baixa toxicidade a formulações inovadoras como filmes, membranas e *scaffolds*.

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de metabólitos secundários extraídos de plantas. Dentro dessas misturas, podem ser encontrados de 10 a 60 constituintes diferentes, mas, em geral, apenas 2 a 3 componentes principais desempenham um papel decisivo nas propriedades biológicas do OE (da Silva et al., 2020). Esses compostos e seus constituintes exibem uma ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo propriedades analgésicas, sedativas, anti-inflamatórias, antiespasmódicas, além de propriedades antimicrobianas, antiprotozoárias e anti-helmínticas (Ghadimi et al., 2020; Valdivieso-Ugarte et al., 2019). Estudos têm demonstrado que vários OEs, ou seus componentes, possuem atividade inibitória contra protozoários, com ênfase particular em *Leishmania* (de Moraes et al., 2018; Le et al., 2018).

Hami e colaboradores (2022), revelaram que o óleo essencial de melaleuca (Tea Tree Oil – TTO), extraído da planta nativa australiana chamada *Melaleuca alternifolia*, é um agente leishmanicida que oferece vantagens em termos de segurança, duração do tratamento, custo e facilidade de administração (Hami, 2022). Ele é composto de hidrocarbonetos terpenos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados (Lam et al., 2020). Suas atividades fungicida, anti-infeccioso, balsâmico, anti-inflamatório, antisséptico, antiviral, inseticida e imune-estimulante são atribuídas principalmente ao terpinen-4-ol, que é o principal componente do óleo, sendo o principal mediador de sua atividade “*in vitro*” e “*in vivo*” (Assmann et al., 2018; Bezabh et al., 2022; Ghosh et al., 2022). Por suas diversas propriedades, o óleo essencial de melaleuca tem sido cada vez mais usado como uma alternativa natural e eficaz para tratar diversas doenças.

Diante deste cenário, os processos de manufatura aditiva junto com o desenvolvimento de novos materiais apresentam um grande potencial para desenvolver estruturas tridimensionais com propriedades mecânicas e biológicas aprimoradas. Com isso, esta tese apresenta investigações de impressão 3D baseada em extrusão de hidrogéis nanocompósitos do sistema Alginato/CNC, visando aplicações biomédicas. Especificamente, a partir do estudo do comportamento reológico e da capacidade de impressão dos hidrogéis, foram obtidas formulações de tintas e biotintas com potencial para aplicação na engenharia tecidual e no desenvolvimento de um curativo para o tratamento tópico para leishmaniose cutânea. Neste último caso, foram também incorporados no sistema quitosana e colágeno, visando obter uma estrutura híbrida com atividade leishmanicida.

1.1 Objetivos

O objetivo desse trabalho é a impressão 3D baseada em extrusão de *scaffolds* com 2 regiões de hidrogéis nanocompósitos do sistema Alginato/CNC para aplicações na engenharia tecidual e no desenvolvimento de um tratamento tópico para leishmaniose cutânea.

Para a aplicação na engenharia tecidual, as seguintes etapas foram realizadas para alcançar o objetivo desse trabalho:

- Avaliar a citotoxicidade e viabilidade celular dos hidrogéis de alginato e CNC com fibroblastos de camundongo do tipo NIH3T3, em diferentes concentrações dos polímeros;
- Desenvolver uma biotinta com boa capacidade de impressão, baseada em alginato e CNC com células do tipo NIH3T3 incorporadas para o processo de bioimpressão 3D baseada em extrusão;
- Conduzir a bioimpressão 3D baseada em extrusão de *scaffolds* do sistema alginato/CNC com células do tipo NIH3T3 incorporadas e avaliar a viabilidade, adesão e morfologia, após o processo de bioimpressão;

Para o desenvolvimento de um tratamento tópico para leishmaniose cutânea, as seguintes etapas foram realizadas para alcançar o objetivo desse trabalho:

- Avaliar o comportamento reológico e capacidade de impressão dos hidrogéis de alginato/CNC/quitosana e alginato/CNC/colágeno para a impressão de um *scaffold* multicamada visando o desenvolvimento de um curativo para tratamento tópico da leishmaniose cutânea;
- Incorporar o óleo essencial de melaleuca (Tea Tree Oil) ao hidrogel de alginato/CNC/colágeno como agente leishmanicida;
- Caracterizar química, térmica e morfologicamente os *scaffolds* de alginato/CNC/colágeno com e sem TTO incorporado e os *scaffolds* de alginato/CNC/quitosana;
- Avaliar a atividade leishmanicida do TTO puro e incorporado nos *scaffolds* de alginato/CNC/colágeno em cultura de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;

1.2 Estrutura da tese

Esta tese está estruturada em 5 capítulos. Inicialmente, o **capítulo 1** apresenta uma visão geral sobre a manufatura aditiva de hidrogéis nanocompósitos, suas limitações e aplicações na área biomédica. Dentro desse contexto, foi apresentada a motivação da pesquisa, bem como os objetivos. O **capítulo 2** expõe uma revisão da literatura aprofundando os conceitos de impressão e bioimpressão 3D, hidrogéis nanocompósitos

do sistema alginato/CNC e aplicações na engenharia tecidual e no tratamento de feridas com foco nas lesões causadas pela Leishmaniose cutânea. Além disso, esse capítulo também apresenta fundamentos de reologia e parâmetros de processo que afetam a impressão 3D baseada em extrusão. O **capítulo 3** apresenta o estudo da viabilidade celular em *scaffolds* do sistema alginato/CNC visando aplicação na engenharia tecidual, além da morfologia e adesão celular em *scaffolds* bioimpressos. O **capítulo 4** apresenta o estudo do sistema alginato/CNC/quitosana e alginato/CNC/colágeno para impressão de *scaffolds* multicamadas para o desenvolvimento de um tratamento tópico para leishmaniose cutânea, onde foram realizados estudos de reologia e capacidade de impressão desses sistemas. Ainda, são apresentados os estudos de incorporação do óleo essencial de melaleuca (TTO) nos géis e *scaffolds*, onde esses foram caracterizados química, térmica e morfologicamente. Por fim, testes *in vitro* foram realizados para avaliar a atividade leishmanicida do TTO em diferentes concentrações. Finalmente, a conclusão desta pesquisa é apresentada no **capítulo 5**. A Figura 1 apresenta um resumo gráfico da tese.

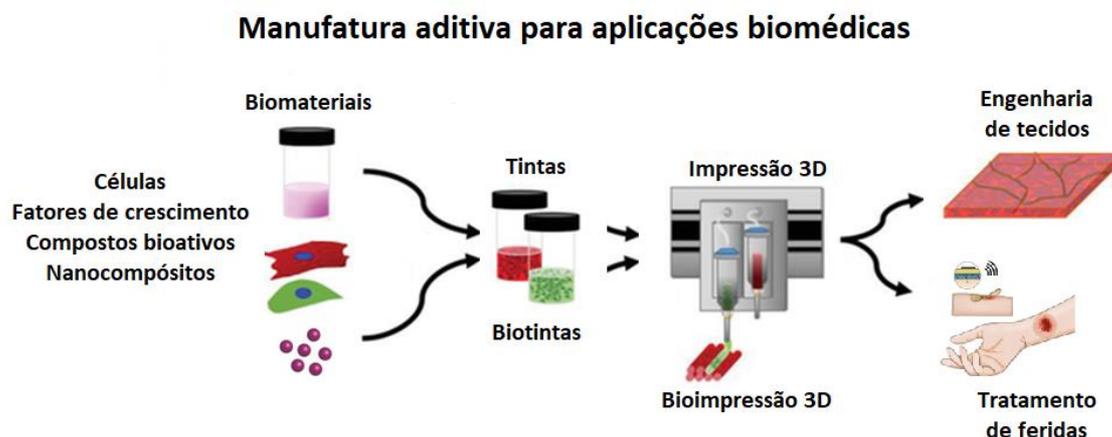


Figura 1: Resumo gráfico da tese

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Impressão 3D

A tecnologia de manufatura aditiva, também conhecida como impressão 3D ou prototipagem rápida, foi introduzida em 1986 com a técnica de estereolitografia. Nesse processo, lâminas de um material fluido são expostas à luz ultravioleta e impressas em camadas sucessivas para criar objetos sólidos em 3D (Hull, 1986). A impressão 3D permite fabricar objetos camada por camada (*layer-by-layer*), adicionando progressivamente materiais diretamente com base em modelos digitais predefinidos (Panayi, 2023). Desde sua introdução, essa tecnologia tem causado um impacto significativo na sociedade e está transformando a ciência e a engenharia de materiais avançados (Ryan et al., 2021). Um exemplo notável é a bioimpressão 3D, um campo em crescente desenvolvimento nos últimos anos, impulsionado pelos avanços nas técnicas de impressão 3D, ciência dos materiais e biologia celular (Jain et al., 2022; Yadid et al., 2022). Com a impressão 3D, é possível produzir diretamente componentes complexos personalizados feitos de diversos materiais como, metais (Nurhudan et al., 2021), cerâmicas (Chen et al., 2019), vidros (H. Zhang et al., 2022), polímeros (Park et al., 2022) e multimateriais (Nazir et al., 2023), usando tecnologias de design e fabricação assistidos por computador (CAD/CAM). Em comparação com as tecnologias convencionais de fabricação, que envolvem moldes, ferramentas e usinagem, a impressão 3D é mais flexível, produz menos desperdício de materiais e processos, além de ser economicamente favorável em termos de tempo e custo financeiro (Alammar et al., 2022; Hegab et al., 2023).

Devido a esses motivos, a impressão 3D está sendo considerada como parte da próxima revolução industrial na área de manufatura (Pérez et al., 2020; Rymarczyk, 2020), encontrando amplas aplicações em diversos setores industriais, como automotivo (Tuazon et al., 2022), robótica (Sachyani Keneth et al., 2021), aeroespacial (Martinez et al., 2022), química (Zhu et al., 2022), energia (Browne et al., 2020), alimentação (Kumar & Kumar, 2020), farmacêutica (Chen et al., 2020), biomédica (Bozkurt & Karayel, 2021), entre outros. Atualmente, os polímeros são a classe de materiais mais comumente

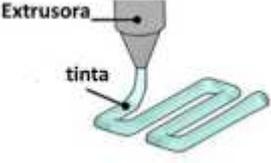
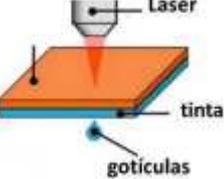
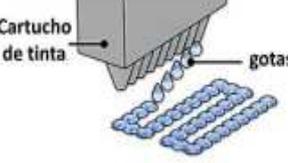
utilizados na impressão 3D para fabricar componentes personalizados (Park et al., 2022). No entanto, para que o potencial dessa tecnologia seja aumentado, é necessário o desenvolvimento de novos materiais imprimíveis feitos a partir de diversos materiais, exigindo um design e desenvolvimento sob demanda da composição, estrutura e função (Nazir et al., 2023; Ryan et al., 2021).

Com o aumento da população idosa e da expectativa de vida, há uma crescente necessidade de enxertos de tecidos, órgãos e biomateriais que possam substituir, reparar ou regenerar tecidos e órgãos danificados ou perdidos (Guvendiren & Serpooshan, 2020; L. G. Zhang et al., 2022). Esses biomateriais devem ter propriedades de bioabsorção, bioatividade e robustez mecânica para essas aplicações biomédicas (Bozkurt & Karayel, 2021; Jain et al., 2022). As estratégias baseadas em *scaffolds* porosos 3D são altamente promissoras para a engenharia tecidual e medicina regenerativa, pois proporcionam uma estrutura para o crescimento celular, transporte de substâncias e formação de novos tecidos (Varma et al., 2020). A impressão 3D tem revolucionado esse campo, permitindo a fabricação de *scaffolds*/objetos complexos e personalizados para cada paciente, com propriedades controladas, flexíveis, rápidas e precisas. No entanto, a seleção de materiais apropriados para serem usados como biomateriais é um aspecto crítico para o design e aplicação da impressão 3D (Chimene et al., 2020; Hegab et al., 2023). Os hidrogéis de polímeros, que são redes de polímeros altamente hidratados, são uma classe promissora de materiais para criar *scaffolds* 3D porosos, pois podem imitar a matriz extracelular e modular a diferenciação celular (Chimene et al., 2020).

Diversas técnicas de impressão 3D são utilizadas em aplicações biomédicas e podem ser classificadas em sistemas baseados em laser, bicos por extrusão de (pré) polímeros e impressoras por jateamento de material. Há diversas revisões disponíveis que apresentam uma classificação mais detalhada sobre essas técnicas (Maines et al., 2021; Quan et al., 2020; Tümer & Erbil, 2021; Wang et al., 2019). Em relação à impressão 3D de hidrogéis, as principais técnicas são a impressão baseada em extrusão, impressão a laser e impressão a jato de tinta. A Tabela 2.1 apresenta um quadro comparativo entre essas técnicas, onde a mais utilizada e acessível é a impressão baseada em extrusão e consiste na técnica utilizada nesta tese. Por meio desta técnica, são fabricados filamentos contínuos de material, em oposição às gotículas produzidas por uma impressora a jato de tinta. O filamento é criado seguindo um padrão gerado por um software, que orienta o caminho para formar uma estrutura tridimensional. Os materiais mais adequados para a impressão por extrusão são aqueles com comportamento pseudoplástico e viscoelástico,

como os hidrogéis poliméricos, que são liberados através de forças mecânicas ou pneumáticas por uma seringa (X. N. Zhang et al., 2022).

Tabela 2.1: Comparação entre as técnicas de impressão 3D de hidrogéis. Adaptado de (Antunes, 2022; Zhang et al., 2018).

Técnica de Impressão	Extrusão	Laser	Jato de tinta
Descrição	 <p>O material é dispensado em filamento de forma contínua através de um bico de extrusão sob força mecânica ou pneumática</p>	 <p>O material é suspenso na parte inferior de uma fita e, quando vaporizadas por um pulso a laser, são dispensados em formas de gotículas para um substrato receptor</p>	 <p>O material é dispensado gota a gota por meio de força térmica, piezoelétrica ou magnética</p>
Vantagens	Capacidade de utilizar soluções com alta viscosidade e imprimir com alta densidade celular	Alto grau de precisão e resolução, capacidade de utilizar soluções com alta viscosidade e imprimir com alta densidade celular	Alta velocidade, disponibilidade e baixo custo
Desvantagens	Técnica depende de características específicas do material e propriedades mecânicas adequadas e tem baixa resolução quando comparada com as outras técnicas	Consome tempo e alto custo	Baixa precisão no posicionamento e tamanho de gota, mais indicado utilizar soluções com baixa viscosidade

2.1.1 Impressão 3D baseada em extrusão

A impressão baseada em extrusão é conduzida por um sistema pneumático ou mecânico (pistão ou parafuso) para extrudar géis e hidrogéis através do bico de maneira contínua; o processo de impressão consiste na deposição camada por camada para a fabricação de objetos tridimensionais complexos. O sistema pneumático está sujeito a atrasos associados ao volume do gás comprimido, resultando em uma perda de pressão durante o processo de impressão impactando na qualidade do objeto impresso, enquanto o sistema acionado por pistão pode fornecer controle mais direto sobre o escoamento da tinta. A deposição baseada em parafuso fornece maior controle espacial e é capaz de dispensar tintas com viscosidades mais altas (Malda et al., 2013). No entanto, o sistema acionado por parafuso não é indicado para a bioimpressão, devido à alta taxa de cisalhamento no parafuso pode ocorrer o rompimento de membrana das células causando morte celular (Krishna & Sankar, 2023).

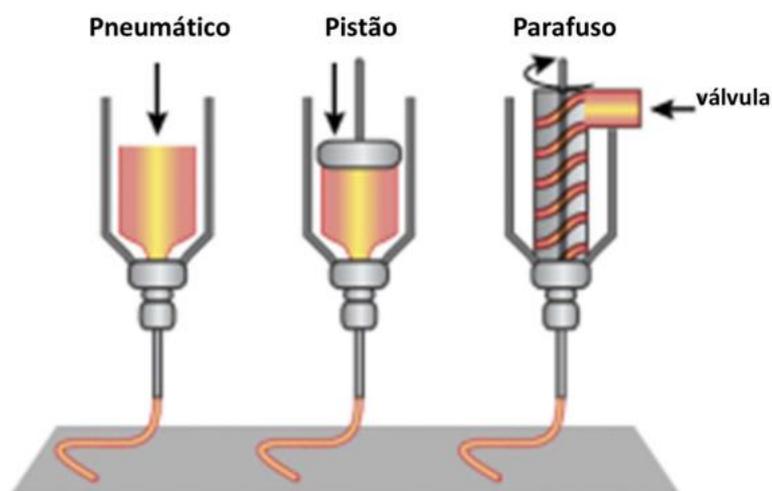


Figura 2.1 Diagrama esquemático para ilustrar os princípios de funcionamento da técnica de impressão 3D baseada em extrusão. Adaptado de (Malda et al., 2013).

A capacidade de impressão de cada tinta individual é definida por seu próprio conjunto de fatores, sendo eles reológicos e de processo dentro da chamada “janela de impressão” onde são avaliados, viscosidade, comportamentos pseudoplástico e

viscoelástico, recuperação da viscosidade além dos parâmetros do processo de impressão como velocidade de impressão, tipo e tamanho do bico de extrusão, número de camadas dos *scaffolds* entre outros. Além disso, um estudo destacou as vantagens dos processos reológicos no processo de impressão 3D, reduzindo o tempo e o custo no desenvolvimento e avaliação de tintas em sistema de impressão baseado em extrusão (Göhl et al., 2018). Esses parâmetros reológicos e de processo serão abordados mais à frente.

2.2 Bioimpressão 3D

A bioimpressão 3D é uma técnica avançada da manufatura aditiva que permite a criação de estruturas tridimensionais complexas, utilizando materiais biológicos, como células, proteínas, fatores de crescimento e outros componentes biológicos, em conjunto com materiais não-biológicos, como hidrogéis. A associação dos diferentes componentes em proporções adequadas resulta em um biomaterial que pode ser impresso por uma dada tecnologia de bioimpressão, chamado de biotinta (*bioink*) (Kačarević et al., 2018). O termo bioimpressão 3D pode ser definido como “o uso de processos de transferência auxiliados por computador para padronizar e construir materiais vivos e não vivos com uma organização tridimensional prescrita, a fim de produzir estruturas de bioengenharia que se aplicam na medicina regenerativa, engenharia tecidual, farmacocinética e estudos de biologia celular” (Jang et al., 2018; Liu et al., 2017).

O sucesso da engenharia tecidual depende principalmente da capacidade de desenvolver estruturas tridimensionais complexas, contendo células e que apresentem semelhança com os tecidos vivos originais. Portanto, os parâmetros dos processos como operação, tamanho do bico, capacidade de impressão, viscosidade da biotinta, densidade celular, entre outros, são de importância fundamental para a obtenção de *scaffolds* funcionais com essa complexidade e serão abordados mais à frente (Naghieh & Chen, 2021). Uma análise comparativa entre as diferentes técnicas de bioimpressão é apresentada abaixo na tabela 2.2, onde estão descritas as diferentes características de cada processo.

Tabela 2.2: Análise comparativa de diferentes técnicas de bioimpressão 3D para hidrogéis. Adaptado de (Ng et al., 2019).

	Extrusão	Assistida por laser	Jato de tinta
Princípio de trabalho	Extrusão pneumática ou mecânica	Vaporização localizada da camada de absorção de energia	Uso de atuadores para superar a tensão superficial
Operação	Fácil Carregamento de biotintas em cartuchos	Média Revestimento de camada homogênea	Difícil Carregamento de biotintas em cartuchos Otimização da faixa específica do alcance de pulso para cada amplitude de pulso
Tamanho do bico	$\geq 100 \mu\text{m}$	N/A	15 – 200 μm
Capacidade de impressão	Propriedades da biotinta (G' e G'')	Pressão de vapor	Propriedades da biotinta (valores Z)
Resolução de impressão	$\geq 200 \mu\text{m}$	20 – 80 μm	$\geq 20 \mu\text{m}$ (1,2 - 2x tamanho de bico)
Viscosidade	30 mPa.s – 10^7 mPa.s	120 – 300 mPa.s	3 – 30 mPa.s
Densidade celular	Até 10^6 células/mL	$> 10^8$ células/mL	Até 10^6 células/mL
Viabilidade celular	Tensão de cisalhamento	Espessura da camada e viscosidade da superfície do substrato	Tensão de cisalhamento da superfície do substrato

A bioimpressão baseada em extrusão é a abordagem mais difundida para a fabricação de objetos 3D carregados com células; as biotintas são geralmente carregadas em cartuchos de impressão descartáveis e distribuídas pneumaticamente ou mecanicamente em um substrato receptor. O tamanho mínimo do bico em um sistema de bioimpressão baseado em extrusão normalmente é superior a 100 μm . Isso ocorre porque diâmetros menores resultariam em um aumento significativo na tensão de cisalhamento,

o que poderia levar ao dano celular, morte celular e aumentaria a probabilidade de entupimento do bico. (Ozbolat & Hospodiuk, 2016).

Outro fator determinante no processo de bioimpressão 3D é a escolha do biomaterial, que é crucial na bioimpressão 3D, pois influencia as propriedades do constructo impresso e sua aplicação final (Kačarević et al., 2018). Ao selecionar o biomaterial, é necessário considerar fatores como biocompatibilidade, biodegradabilidade, suporte celular, migração e diferenciação celular, propriedades mecânicas, porosidade, estabilidade estrutural e integração com tecidos circundantes (Matai et al., 2020). A escolha também depende do tipo de tecido ou órgão, características desejadas e técnicas disponíveis. Não há uma única opção de biomaterial, pois ela varia de acordo com as necessidades específicas (Jain et al., 2022).

2.3 Biomateriais para impressão 3D

Em 1986, o termo "biomaterial" foi definido como um material não viável utilizado em dispositivos médicos para interagir com sistemas biológicos, sem causar reações adversas (Williams, 1999). No entanto, essa definição tornou-se obsoleta devido ao uso cada vez mais amplo de biomateriais em diferentes aplicações além de dispositivos implantados. Em uma conferência realizada em 2018, chegou-se a um consenso sobre uma nova definição de biomaterial: "Um material projetado para assumir uma forma capaz de direcionar procedimentos terapêuticos ou diagnósticos por meio de interações com sistemas vivos". Ficou acordado que esse termo é sinônimo de "material biomédico" (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2019).

Os biomateriais podem ser categorizados em diferentes grupos, incluindo metais, cerâmicas, polímeros sintéticos, polímeros naturais e suas combinações (Hudecki et al., 2019). Ao escolher um biomaterial adequado, é essencial considerar as propriedades específicas do material, as exigências do local onde o implante será realizado e as tecnologias de fabricação envolvidas. Dentre os diversos biomateriais, os hidrogéis são amplamente utilizados na impressão 3D devido à sua versatilidade e adaptabilidade para essa aplicação específica. Hidrogéis são materiais gelatinosos, de origem natural ou sintética, compostos principalmente de líquidos; eles podem ser desenvolvidos em estruturas reticuladas por meio de ligações covalentes, iônicas ou pela combinação de

ambas (X. N. Zhang et al., 2022). Nos últimos anos, os hidrogéis têm ganhado crescente popularidade nos campos da engenharia tecidual e em sistemas de liberação de fármacos, principalmente devido às suas características de alta porosidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. (Wagner et al., 2020).

2.3.1 Hidrogéis

Um hidrogel é constituído por redes tridimensionais de polímeros que têm a capacidade de absorver e reter uma grande quantidade de água, podendo ser derivado de polímeros sintéticos, naturais ou de uma combinação de ambos (Bom et al., 2022). Na Engenharia Tecidual, é possível utilizar diferentes materiais em combinação para imprimir estruturas com propriedades desejáveis, como resistência mecânica adequada, taxa de degradação apropriada, viscoelasticidade, adesão celular e capacidade de proliferação. Os hidrogéis apresentam diversas vantagens para essas aplicações, tais como semelhança com a matriz extracelular, biocompatibilidade, biodegradabilidade e facilidade de processamento. (Li et al., 2021; Townsend et al., 2019).

Nesse contexto, diversos materiais, polímeros naturais como colágeno (Nocera et al., 2018), gelatina (Lewis et al., 2018), ácido hialurônico (Petta et al., 2020), quitosana (Rajabi et al., 2021), celulose (Deng et al., 2021) e alginato (Sánchez-Fernández et al., 2021), têm sido utilizados no desenvolvimento de tintas para impressão 3D, pois facilitam a adesão celular e a manutenção da diferenciação.

No contexto da impressão 3D, é viável combinar diferentes materiais para aproveitar propriedades específicas de cada um, visando obter uma sinergia e produzir um novo material com aplicações desejadas. Os hidrogéis, por exemplo, apresentam propriedades viscoelásticas e biodegradáveis que facilitam a implantação, retenção no local de administração e recuperação da elasticidade após a implantação. Nesse caso, os biomateriais em forma de hidrogel permitem diversas combinações por meio de mecanismos de reticulação química ou física (Townsend et al., 2019):

Reticulação física

Também conhecidos como géis "reversíveis" ou "físicos", os hidrogéis físicos são formados quando suas redes são estabelecidas através de emaranhados moleculares ou forças secundárias, como forças iônicas, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Devido a essas interações, esses hidrogéis apresentam uma estrutura não homogênea, com presença de grupos de emaranhados moleculares, domínios hidrofóbicos ou interações iônicas. Todas essas interações são reversíveis e podem ser desfeitas por meio de alterações nas condições físicas, como força iônica, pH, temperatura, aplicação de tensões ou adição de solutos específicos que competem com o polímero ligante pelo local de afinidade na cadeia polimérica.(GhavamiNejad et al., 2020).

Reticulação química

Também conhecidos como géis "permanentes" ou "químicos", os hidrogéis são formados por redes reticuladas por meio de ligações covalentes. Esse processo envolve a combinação do material desejado com um agente reticulante. Os hidrogéis químicos podem ser obtidos pela reticulação de polímeros solúveis em água ou pela conversão de polímeros hidrofóbicos em hidrofílicos, seguida de reticulação para formar uma rede. Similar aos hidrogéis físicos, os hidrogéis químicos não apresentam homogeneidade. Em geral, eles apresentam regiões de baixo intumescimento em água e alta densidade de reticulação, conhecidas como "clusters", que estão dispersos em regiões de alto intumescimento e baixa densidade de reticulação (Hu et al., 2019).

2.3.2 Tinta e Biotinta

O termo "biotinta" foi introduzido em 2003 para descrever o uso de células vivas em impressões de órgãos, juntamente com o termo "biopapel" (Mironov, 2003; Mironov et al., 2003). Inicialmente, envolvia a impressão de um hidrogel e a inserção de células como a "biotinta". Com o tempo, foram desenvolvidas várias técnicas de impressão 3D,

cada uma com requisitos específicos para a tinta utilizada. Atualmente, o termo "biotinta" é amplamente utilizado em artigos de revisão (Badhe et al., 2023; Groll et al., 2018; Hudecki et al., 2019). Alguns desses artigos propõem uma expansão da definição, incluindo materiais fabricados por manufatura aditiva e uma definição mais sofisticada em termos de estrutura e função. De acordo com Williams et al., (2018) existem quatro categorias principais de biotintas: suporte, fugitiva, estrutural e funcional. As biotintas de suporte fornecem suporte durante a bioimpressão, como a agarose e a quitosana. As biotintas fugitivas são removidas para criar canais internos na estrutura impressa, como o poliálcool vinílico e o Pluronic. As biotintas estruturais conferem integridade à estrutura 3D e podem atuar como biotintas de sacrifício prolongado, como a policaprolactona e a hidroxiapatita. As biotintas funcionais fornecem estímulos para modular o comportamento das células, como biomateriais nanofuncionalizados carregados com fatores de crescimento.

Diante disso, de acordo com Groll et al., (2018) é possível simplificar a classificação das biotintas e tintas de biomateriais com base na definição de biofabricação. Nesse sentido, as biotintas podem ser descritas como meios formulados com hidrogel de biomateriais adequados para a criação de formas celulares por meio da bioimpressão 3D, como GelMA carregado de células, colágeno, compostos de proteína-polímero e biopolímeros. Por outro lado, as tintas de biomateriais são formulações de hidrogel de biomateriais utilizadas para imprimir arquiteturas 3D biodegradáveis nas quais as células são adicionadas posteriormente. Exemplos dessas tintas incluem alginato, hidroxiapatita, quitosana e seus compostos impressos sem células.

Os termos biotintas e tintas de biomateriais (Figura 2.2) são frequentemente usados como sinônimos. No entanto, o componente celular é definido como uma biotinta se esta resultarem uma estrutura tridimensional em arranjos no interior de estruturas de hidrogéis. Por outro lado, o termo tinta de biomaterial é usado para os precursores de hidrogel ou formulação de polímero aquoso que pode conter fatores biológicos e ser usado para semear células subsequente ou estudos *in vivo* (Groll et al, 2018).

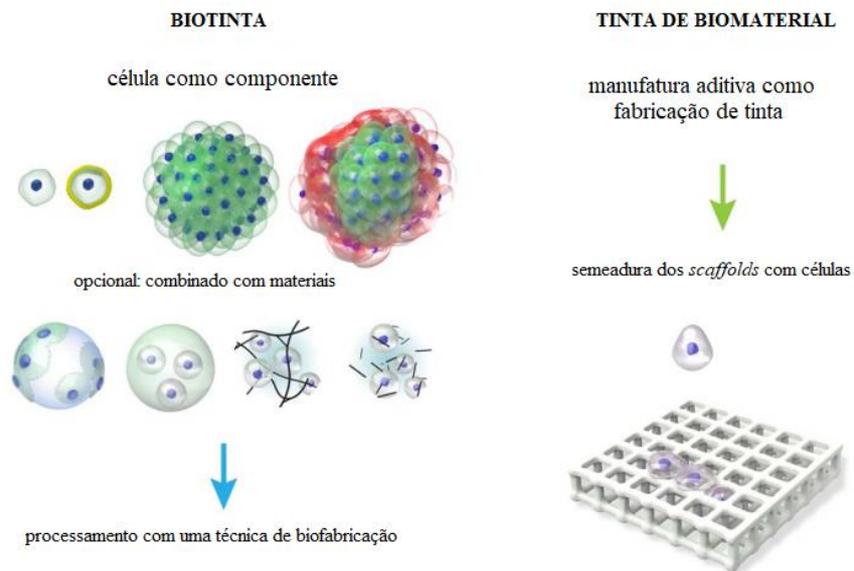


Figura 2.2: Diferenciação entre Biotinta e Tinta de Biomaterial.

Na figura 2.2, podemos observar a distinção entre a biotinta (à esquerda), que requer a presença de células individuais, células revestidas ou agregados celulares (compostos por um ou mais tipos de células) em sua formulação de impressão, podendo também ser combinada com materiais diversos (como microtransportadores, microgéis ou precursores de hidrogel) para uso. Por outro lado, à direita, temos a tinta de biomaterial, que utiliza um biomaterial específico para a impressão, sendo o contato celular estabelecido após o processo de fabricação. É importante notar que as imagens presentes neste esquema não estão representadas em escala (Groll et al, 2018).

2.3.3 Alginato

O alginato é um polissacarídeo natural hidrofílico com carga negativa e grupos funcionais hidroxila e carboxila ($-OH$ e $-COO^-$) em sua cadeia (Fig. 2.3). É extraído de algas marinhas marrons encontradas naturalmente nas áreas costeiras (Mallakpour et al., 2021). O alginato é composto por copolímeros não ramificados lineares que consistem em diferentes quantidades de ácido β -D-manurônico, chamados de blocos M (Fig. 2.3a) e ácido α -L-gulurônico, chamados de blocos G (Fig.2.3b) ligados por ligações covalentes. Esses blocos estão arranjados em várias formas de sequência, incluindo blocos G

consecutivos (G-G-G), blocos M consecutivos (M-M-M) e sequências de blocos MG alternados (M-G-M) (Fig.2.3c). As propriedades físicas do alginato são determinadas pela composição do copolímero, a fórmula da sequência dos blocos e o comprimento linear (Farokhi et al., 2020; Rastogi & Kandasubramanian, 2019). A característica mecânica do alginato pode ser controlada pela modificação do comprimento do bloco G e da massa molar que pode variar entre 32000 e 400000 g/mol. Isso ocorre porque os blocos G têm uma estrutura rígida, enquanto os blocos M-G-M são flexíveis. Essa diferença estrutural afeta diretamente a taxa de degradação, a interação celular e outras alterações nas propriedades físicas e químicas do alginato (Neves et al., 2020).

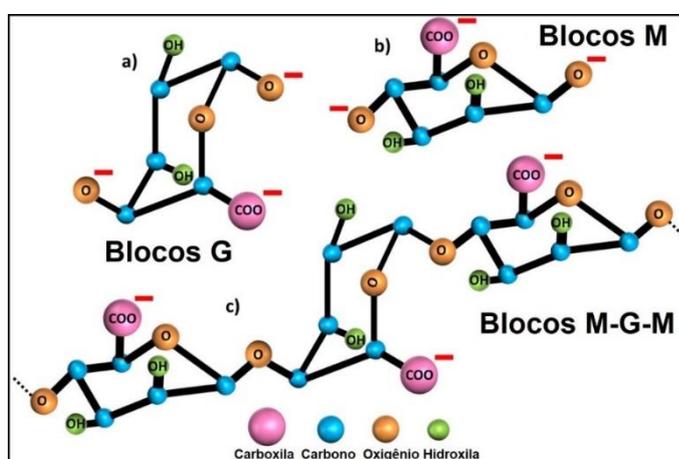


Figura 2.3: Estrutura química da cadeia de alginato. (a) Blocos G, (b) Blocos M e (c) Blocos M-G-M. Adaptado de (Rastogi & Kandasubramanian, 2019).

Existem duas categorias principais de métodos de reticulação para o alginato: físicos e químicos. Esses métodos afetam as propriedades mecânicas do alginato, sendo influenciados pelo tipo de reticulação e pela densidade de reticulação. A reticulação física ocorre quando as cadeias de polímeros aniônicos podem ser interconectadas por cátions divalentes, como Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} , formando uma estrutura semelhante a uma caixa de ovo (Fig. 2.4). No entanto, a reticulação física resulta em propriedades mecânicas relativamente inferiores em comparação com o método de reticulação química (Naghieh et al., 2018). Para superar a fraqueza mecânica dos alginatos aniônicos, foram desenvolvidos diversos métodos de reticulação química. Esses métodos incluem polimerização radical, irradiação de energia, reações químicas entre grupos complementares e reticulação enzimática. Essas abordagens químicas permitem a

formação de ligações covalentes entre as cadeias de alginato, o que resulta em uma estrutura mais estável e propriedades mecânicas aprimoradas. Ao introduzir a reticulação química, busca-se melhorar a resistência e a durabilidade do alginato, tornando-o mais adequado para diversas aplicações (Rastogi & Kandasubramanian, 2019).

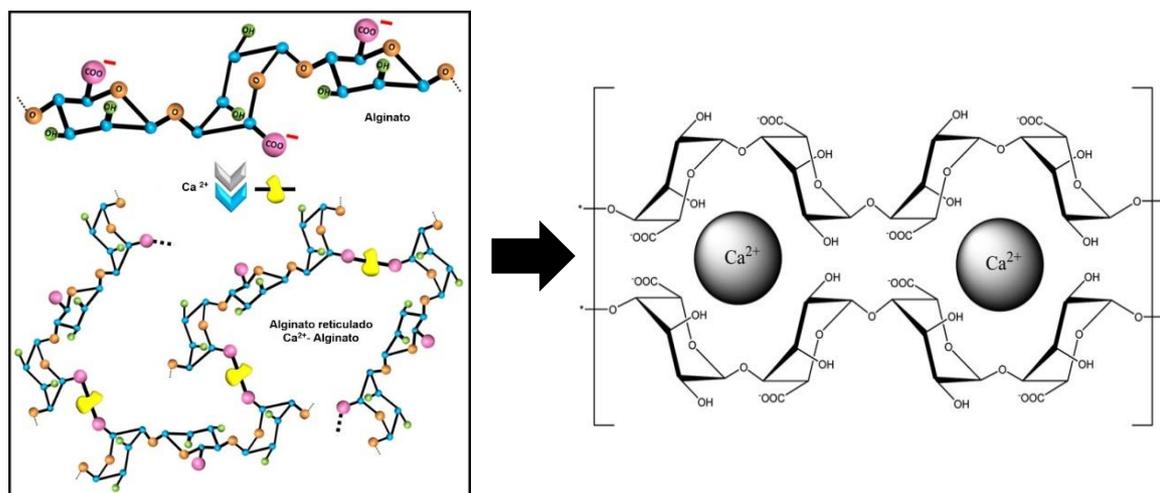


Figura 2.4: Reticulação do alginato. (a) Uma representação de uma cadeia de alginato reticulada após a adição de CaCl_2 . Nesta figura, apenas três cadeias são mostradas, mas o polímero natural é composto por cadeias longas e, portanto, uma rede mais emaranhada, (b) Estrutura de reticulação iônica dos blocos G de alginato com íons de cálcio formando a “caixa de ovos”. Adaptado de (Hu & Lo, 2021; Rastogi & Kandasubramanian, 2019)

Os hidrogéis a base de alginato são amplamente utilizados na tecnologia de impressão 3D devido às suas excelentes propriedades de impressão e biocompatibilidade. Além disso, eles apresentam um custo relativamente baixo, baixa toxicidade e reticulação rápida na presença de íons de cálcio (Ca^{2+}). Esses materiais têm mostrado um enorme potencial para aplicações na área biomédica, como engenharia tecidual (Krishna & Sankar, 2023), *drug delivery* (Bergonzi et al., 2023), cicatrização de feridas (Wang et al., 2023), tratamento de câncer (Sood et al., 2023) entre outras aplicações, devido às suas propriedades versáteis e às vantagens oferecidas pela tecnologia de impressão 3D.

2.3.4 Celulose nanocristalina (CNC)

A celulose nanocristalina (CNC) é um polissacarídeo linear, obtida através de um processo de tratamento químico e mecânico da celulose (Fig. 2.5), resultando em partículas alongadas e altamente cristalinas, com dimensões nanométricas, são cristais em forma de haste com um diâmetro de 5-20 nm e um comprimento de 100-300 nm (Ee & Li, 2021). O CNC apresenta uma estrutura altamente organizada, com uma rede de cristais de celulose empilhados. Suas propriedades incluem alta rigidez e resistência mecânica, baixa densidade e biodegradabilidade. Além disso, a CNC possui uma grande área superficial, o que a torna altamente interativa com outros materiais e solventes podendo ser usado, por exemplo, como modificador reológico (Athukoralalage et al., 2019; Junior et al., 2019).

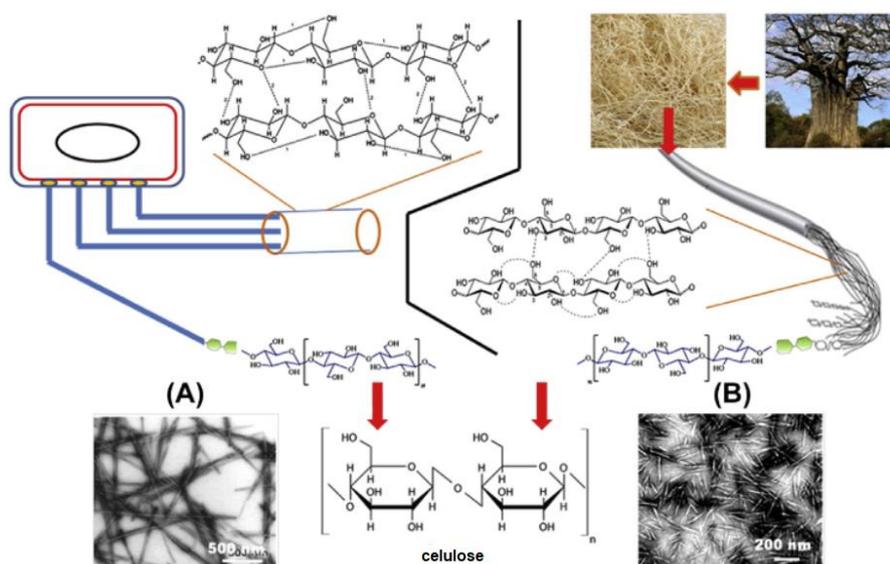


Figura 2.5: Celulose nanocristalina. Diferentes tipos de celulose têm diferentes propriedades estruturais (como celulose nanofibrilada e celulose nanocristalina de origem vegetal tem diâmetro variando de 5-60 nm a 5-70 nm, respectivamente, enquanto a nanocelulose bacteriana tem um diâmetro de 20-100 nm) devido à ligação de hidrogênio em grupos -OH (A). Celulose bacteriana (B). Celulose vegetal (CNC). Adaptado de (Julkapli e Bagheri, 2017).

Devido às suas propriedades notáveis, o CNC tem uma ampla gama de aplicações em diversos setores. Na indústria de materiais, é utilizada como reforço em compósitos

poliméricos, aumentando suas propriedades mecânicas (Haldar & Purkait, 2020). Também pode ser empregada na produção de filmes finos (Zhang et al., 2019), membranas (P. R. Sharma et al., 2020), revestimentos (M. Sharma et al., 2020) e adesivos (Vineeth et al., 2019). Na área biomédica, o hidrogel de CNC é explorado para aplicações como engenharia tecidual, liberação controlada de fármacos e bioimagem (Du et al., 2019). A Tabela 2.3 apresenta um resumo das diferentes estratégias para a incorporação de celulose nanocristalina (CNC) em redes poliméricas ou para a preparação direta de hidrogéis. Além disso, a tabela 2.3 também destaca as aplicações biomédicas específicas associadas a essas abordagens.

Tabela 2.3: Método de preparação para hidrogéis baseados em CNCs e suas aplicações. Adaptado de (De France et al., 2017).

Material	Método de preparação para hidrogel	Aplicações	Referências
CNC, alginato	Homogeneização, extrusão	<i>Drug delivery</i>	(Supramaniam et al., 2018)
CNC, gelatina	Homogeneização	<i>Drug delivery</i>	(Ooi et al., 2016)
CNC, carboximetil quitosana	Homogeneização	Curativo	(Huang et al., 2018)
CNC, alginato, gelatina	Reticulação iônica Injetável	Engenharia tecidual	(K. Wang et al., 2016)
CNC, PEGDA	Impressão 3D	Engenharia tecidual	(Palaganas et al., 2017)
CNC, PVA	<i>Freeze-thaw</i>	Curativo	(Gonzalez et al., 2014)
CNC, ácido hialurônico	Extrusão Injetável	Engenharia tecidual	(Domingues et al., 2015)

O CNC tem despertado grande interesse como uma alternativa promissora aos materiais convencionais. Sua disponibilidade, versatilidade e excelentes propriedades a tornam um material com potencial significativo para inovação e avanços em diversas

áreas tecnológicas (Haldar & Purkait, 2020). O uso do CNC na impressão 3D é um avanço recente, impulsionado pelas propriedades de formação do gel de CNC em baixas concentrações, juntamente com sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e boas propriedades mecânicas (He & Lu, 2022). Essas características são consideradas favoráveis para a impressão 3D à base de CNC, curativos para feridas, materiais para engenharia tecidual, entre outros, nos quais o controle preciso da estrutura, forma e geometria dos poros são aspectos importantes para aplicações na área biomédica (Du et al., 2019).

2.3.5 Compósitos de alginato – celulose nanocristalina (CNC)

A impressão 3D de hidrogéis nanocompósitos de alginato e celulose nanocristalina (CNC) tem despertado grande interesse na área biomédica devido às suas propriedades únicas e às possíveis aplicações em diversos campos (Mallakpour et al., 2021). Esses hidrogéis combinam as vantagens do alginato, um polímero natural biocompatível amplamente utilizado, com as propriedades mecânicas e bioativas do CNC. Esses materiais possuem características como formação de hidrogel, biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica, processabilidade e baixa toxicidade (Krishna & Sankar, 2023). Além de todas as características citadas acima, o alginato é vantajoso como componente de uma tinta/biotinta devido à sua rápida reticulação quando em contato com cátions divalentes, como o Ca^{2+} , o que permite a formação e retenção da estrutura impressa, essa característica promove uma proteção das células após a impressão e/ou o encapsulamento de fármacos para o estudo de liberação controlada, propriedades importantes em aplicações de engenharia tecidual e *drug delivery* (Siqueira et al., 2019).

No entanto, géis de alginato possuem propriedades reológicas que afetam o processo de impressão 3D, como baixa pseudoplasticidade, comportamento viscoelástico linear do tipo líquido e baixa recuperação da viscosidade após a impressão, o que leva à necessidade de um material compósito para o aprimoramento dessas propriedades (Badhe & Nipate, 2020). Pinto Junior et al., (2019) estudaram a impressão 3D baseada em extrusão de hidrogéis nanocompósitos de alginato/CNC visando à construção de *scaffolds* para aplicações em Engenharia tecidual. O comportamento reológico para os géis de

alginato/CNC foi estudado com o objetivo de se alcançar uma tinta com concentração ótima de impressão. Os resultados mostraram que o comportamento pseudoplástico foi progressivamente aprimorado em função da concentração de CNC e que géis do sistema alginato/CNC com concentrações a partir de 4% de CNC (m/m) resultaram em géis macios com comportamento viscoelástico do tipo sólido. Esse aprimoramento nas propriedades reológicas ocorreu devido as interações eletrostáticas entre as cadeias aniônicas do alginato e do CNC que promovem uma reticulação física. Também foi relatado que os resultados da impressão 3D corroboraram com os resultados dos estudos reológicos, onde o aumento da concentração de CNC resultou numa melhor capacidade de impressão dos géis do sistema chegando numa concentração ótima de impressão de 2% de alginato e 10% de CNC (m/m). Mais adiante os parâmetros reológicos envolvidos no processo de impressão 3D baseado em extrusão serão discutidos para um maior entendimento do leitor.

Em resumo, os hidrogéis de alginato e CNC apresentam grande potencial para aplicações biomédicas devido às suas propriedades versáteis e capacidade de serem adaptados às necessidades específicas de cada aplicação. Além disso, a combinação desses biomateriais nos fornece um hidrogel com boas propriedades biológicas devido ao alginato e boas propriedades reológicas e mecânicas devido ao CNC. Com o contínuo avanço da tecnologia de impressão 3D e o aprimoramento desses biomateriais, podemos esperar importantes avanços na medicina regenerativa e no tratamento de diversas condições médicas no futuro.

2.3.6 Quitosana

A quitosana é um polímero catiônico obtido através da desacetilação parcial da quitina (Fig. 2.6a), um biopolímero encontrado no exoesqueleto de crustáceos, cutículas de insetos, algas e na parede celular de fungos (Aranaz et al., 2021). A desacetilação da quitina pode ser realizada por meio de hidrólise química em condições alcalinas, utilizando água alcalina concentrada, ou por hidrólise enzimática com a desacetilase. A quitosana é composta por unidades de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) e unidades desacetiladas de β -D-glucosamina (GlcN), que estão distribuídas aleatoriamente no polímero e conectadas por meio de ligações β -(1-4) -glicosídicas (Fig. 2.6b) (Naveed et

al., 2019). O grau de desacetilação da quitosana é uma medida que relaciona o número de unidades de GlcN com o número total de unidades de GlcN e GlcNAc (Aranaz et al., 2021).

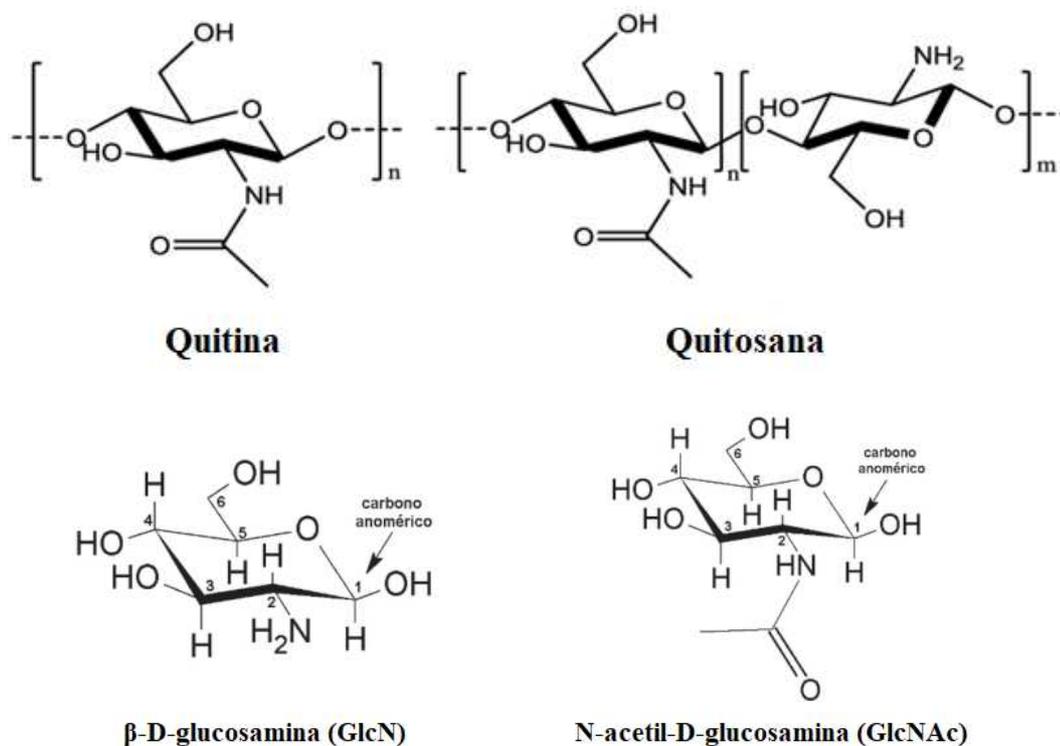


Figura 2.6: Representação esquemática da estrutura (a) quitina e quitosana (b) unidades de β-D-glucosamina (GlcN) e N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). Adaptado de (Naveed et al., 2019)

A quitosana possui três tipos de grupos funcionais reativos, grupos amino (-NH₂), hidroxila primária e hidroxila secundária (-OH) nas posições C-2, C-3 e C-6, respectivamente, e destaca-se por ser o único polissacarídeo natural com carga positiva. Essa característica permite interações com biomoléculas carregadas negativamente, lipídios, proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e diversos receptores celulares, desencadeando uma série de reações interconectadas em organismos vivos e conferindo propriedades superiores ao material. Dentre essas propriedades, destacam-se sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, efeito antioxidante e baixa resposta de rejeição no corpo, com pouca ou nenhuma formação de encapsulação fibrosa (Rajabi et al., 2021). Quanto a solubilidade

da quitosana, ela ocorre em meio ácido e pode ser explicada pela presença de grupos -NH₂ protonados em sua estrutura, já que o valor de pKa da quitosana é aproximadamente 6,5. Quando cerca de metade dos grupos amino estão protonados, a quitosana adquire solubilidade (Rinaudc et al., 1999).

Uma das aplicações da quitosana que têm sido amplamente exploradas é a impressão 3D de hidrogéis para aplicações biomédicas devido às suas propriedades versáteis e capacidade de formar estruturas tridimensionais complexas (Rajabi et al., 2021). Na impressão 3D, os hidrogéis de quitosana encontram uma das suas principais aplicações na engenharia tecidual, atuando como *scaffolds* ou suportes estruturais para o crescimento de células e tecidos. Devido às suas propriedades bioativas, a quitosana apresenta capacidade de promover a adesão e a proliferação celular, tornando-se um material promissor para a construção de tecidos biológicos (Sacco et al., 2018). Além disso, os hidrogéis de quitosana podem ser incorporados com fatores de crescimento, outros agentes bioativos e polímeros, a fim de estimular a diferenciação celular e a regeneração dos tecidos (Hao et al., 2022). Os hidrogéis de quitosana também têm sido utilizados na impressão 3D de sistemas de liberação controlada de fármacos. Esses hidrogéis podem atuar como veículos para a entrega de fármacos, permitindo a liberação sustentada e controlada ao longo do tempo. Esses dispositivos são especialmente relevantes para aplicações terapêuticas locais, onde a liberação direcionada de medicamentos é desejada (Hamedi et al., 2018).

A impressão 3D de hidrogéis de quitosana apresenta desafios técnicos que ainda precisam ser superados, como a otimização das propriedades mecânicas, reológicas e biológicas dos hidrogéis, bem como a garantia de viabilidade celular durante o processo de impressão. É essencial continuar a pesquisa e o desenvolvimento nessa área, a fim de aprimorar a aplicação dos hidrogéis de quitosana na impressão 3D na área biomédica.

2.3.7 Colágeno

O colágeno compreende um grupo de proteínas estruturais encontradas na matriz extracelular de diversos tecidos, sendo considerada a proteína mais abundante no organismo humano (Osidak et al., 2020). A distribuição dos diferentes tipos de colágeno nos tecidos animais varia de acordo com sua organização estrutural e hierárquica. Dentre

eles, o colágeno tipo I, encontrado nos tecidos ósseos, pele, tendões e ligamentos, é amplamente empregado em aplicações biomédicas, principalmente na engenharia tecidual, devido à sua disponibilidade em grandes quantidades, além de apresentar excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa antigenicidade. Por outro lado, os tipos II e IV são tipicamente encontrados na cartilagem e nas membranas basais, respectivamente (Marques et al., 2019).

De maneira geral, os colágenos (Fig. 2.7) são compostos por cadeias polipeptídicas que consistem em diferentes aminoácidos, seguindo uma sequência comum de tripeptídeos glicina-X-Y. Frequentemente, os aminoácidos X e Y são prolina e hidroxiprolina, respectivamente (Fig. 2.7a). A presença de hidroxiprolina é particularmente exclusiva dos colágenos, sendo utilizada para identificação e quantificação dessas proteínas em extratos. Essas cadeias polipeptídicas se organizam em uma configuração alfa, onde três delas se unem formando a característica estrutura de tripla hélice (Fig. 2.7b, c), que é a base para a estabilidade estrutural do colágeno, bem como para suas propriedades mecânicas notáveis. Essa organização hierárquica é fundamental para a formação de fibrilas e fibras de colágeno (Rezvani Ghomi et al., 2021).

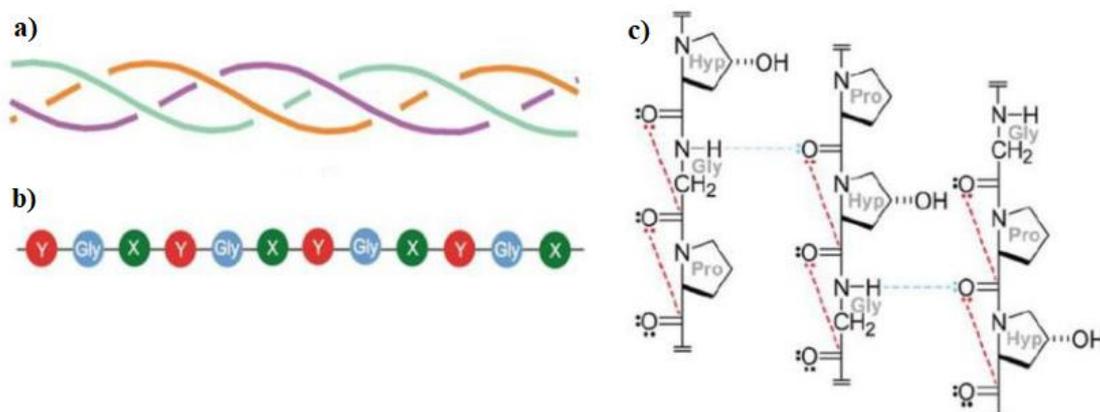


Figura 2.7: Estrutura do colágeno (a) Tripla hélice (b) X e Y representam principalmente resíduos de prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp) (c) Pontes de hidrogênio e interações π^* do colágeno, sendo representadas por linhas tracejadas azuis e vermelhas, respectivamente. Adaptado de (Rezvani Ghomi et al., 2021).

Entre a extensa família de colágenos, apenas alguns tipos são usados como biomateriais. O colágeno natural extraído diretamente de tecidos animais, como cauda de rato, pele suína e bovina, intestino, mucosa da bexiga e tendões, pode apresentar variações significativas de acordo com a fonte e levar a complicações por reações alérgicas e disseminação de doenças (Nocera et al., 2018). Devido suas excelentes propriedades biológicas, o colágeno vem sendo usado amplamente como hidrogéis na impressão/bioimpressão 3D para diferentes aplicações biomédicas como engenharia tecidual (Marques et al., 2019), tratamento de feridas (Smandri et al., 2020) e queimaduras (Sundar et al., 2021) e liberação controlada de fármacos (Zamboulis et al., 2022). Entretanto, a maioria dos estudos existentes sobre o uso de colágeno, destaca um problema central relacionado propriedades reológicas e mecânicas inadequadas da tinta/biotinta para o processo de impressão 3D (Geanaliu-Nicolae & Andronescu, 2020; Marques et al., 2019). Uma das abordagens possíveis para superar essa limitação é o reforço desses hidrogéis por meio de diferentes técnicas como funcionalização de polímero e redes de reticulação dupla, hidrogéis com redes interpenetradas (*Interpenetrating polymer network* - IPNs) e reforçados com nanocompósitos. Essas técnicas promovem mudanças nas propriedades reológicas dos hidrogéis afetando as principais características na impressão (Chimene et al., 2020).

Uma proposta para contornar essas propriedades inadequadas dos hidrogéis de colágeno foi apresentada por Diamantides et al. (2017). Segundo o estudo, uma maneira eficaz de melhorar a capacidade de impressão das tintas/biotintas de colágeno é aumentar o módulo de armazenamento da tinta antes da extrusão. Essa estratégia foi detalhada com maior precisão por Osidak et al. (2020), onde foi demonstrado que as biotintas de colágeno com um módulo de armazenamento significativamente maior do que o módulo de perda (comportamento do tipo sólido) são adequadas para a bioimpressão por meio da extrusão direta.

Em resumo, o colágeno é uma proteína amplamente utilizada nas aplicações biomédicas devido à sua abundância e boas propriedades biológicas e tem se mostrado promissor como uma tinta/biotinta para impressão/bioimpressão 3D. No entanto, as propriedades reológicas inadequadas para o processo de impressão 3D do colágeno é um desafio.

2.4 Técnicas de reforço de hidrogéis para impressão/bioimpressão 3D

Os primeiros hidrogéis impressos tridimensionalmente, simplesmente se comprometeram entre as propriedades reológicas, mecânicas e biológicas para produzir tintas/biotintas que eram medianas em ambos os aspectos (X. N. Zhang et al., 2022). Com o progresso das técnicas emergentes de impressão e bioimpressão 3D, tem ocorrido um significativo aumento no desenvolvimento de abordagens inovadoras destinadas a reforçar esses materiais, visando o aprimoramento de suas propriedades. (Deng et al., 2021). Para projetar essas formulações avançadas de tintas/biotintas, é importante entender as relações estrutura-propriedade-função das redes de hidrogel. Técnicas de reforço de tinta/biotinta como funcionalização de polímero e redes de reticulação dupla, hidrogéis com redes interpenetradas (*Interpenetrating polymer network* - IPNs) e reforçados com nanocompósitos (Figura 2.8), promovem mudanças nas redes de hidrogel afetando as principais características necessárias na impressão (Chimene et al., 2020). Nessa seção será abordada a técnica de reforço por nanocompósito, onde o CNC foi utilizado como modificador reológico visando o aprimoramento das propriedades reológicas e mecânicas dos hidrogéis.

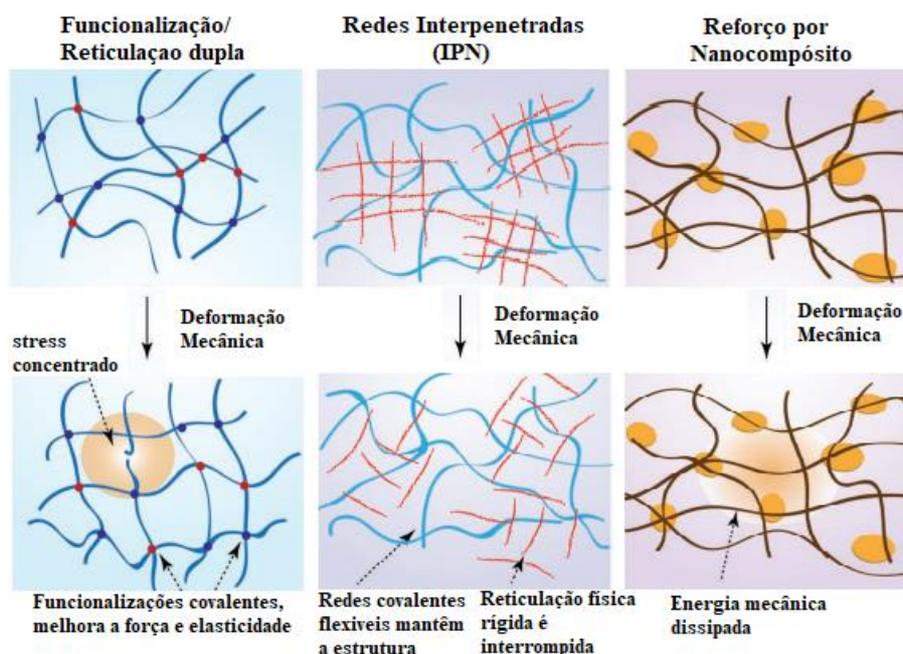


Figura 2.8: Visão geral das técnicas de reforço mecânico. Tintas/biotintas convencionais são tipicamente redes únicas com ligações cruzadas aleatoriamente. As técnicas

estabelecidas para o reforço mecânico de tintas/biotintas incluem funcionalização de polímero, redes interpenetradas (IPNs) e biotinta baseada em nanocompósitos. Adaptado de (Chimene et al., 2020).

2.4.1 Reforço por nanocompósitos

Nos últimos anos, os nanomateriais têm despertado um grande interesse na comunidade de engenharia biomédica (Bianchi & Carnevale, 2022). Sua alta área de superfície específica permite que até mesmo pequenas concentrações de nanopartículas tenham um impacto significativo nas propriedades de uma rede de hidrogel (Murali et al., 2021). As propriedades únicas dos nanomateriais aliada com a tecnologia de impressão 3D, têm sido exploradas em diversas aplicações biomédicas, incluindo a engenharia tecidual, administração de medicamentos, terapias contra o câncer e desenvolvimento de biossensores (Bianchi & Carnevale, 2022). A incorporação de nanomateriais tem sido utilizada para adicionar novas funcionalidades aos hidrogéis, como condutividade elétrica aprimorada, capacidade de resposta a estímulos, controle do comportamento celular, melhorias na capacidade de impressão e reforço mecânico (Park et al., 2022; Park et al., 2020).

Diversos tipos de nanopartículas, como grafeno, nanotubos de carbono (Carbon Nanotubes - CNTs), nanoargila, nanopartículas magnéticas e nanopartículas poliméricas, são amplamente empregados para reforçar hidrogéis poliméricos e conferir funcionalidades adicionais (Santra & Mohan, 2021). O reforço de hidrogéis por meio de nanopartículas pode ocorrer de diferentes maneiras, dependendo do tamanho, forma e química da superfície das nanopartículas (Figura 2.9). Geralmente, considera-se que as nanopartículas atuam como reticuladores físicos (reversíveis), interagindo com várias cadeias de polímero. Isso permite uma dispersão eficiente das tensões na rede e sua dissipação por meio do rompimento das ligações cruzadas formadas pelas nanopartículas de polímero (Dave & Gor, 2018). Esse mecanismo acarreta melhorias nas propriedades reológicas e mecânicas dos hidrogéis como pseudoplasticidade, recuperação da viscosidade, rigidez, extensibilidade e resistência mecânica. Além disso, nanopartículas bioativas podem ser usadas para aprimorar as propriedades biológicas dos hidrogéis como adesão, proliferação e migração celular (Zhao et al., 2020).

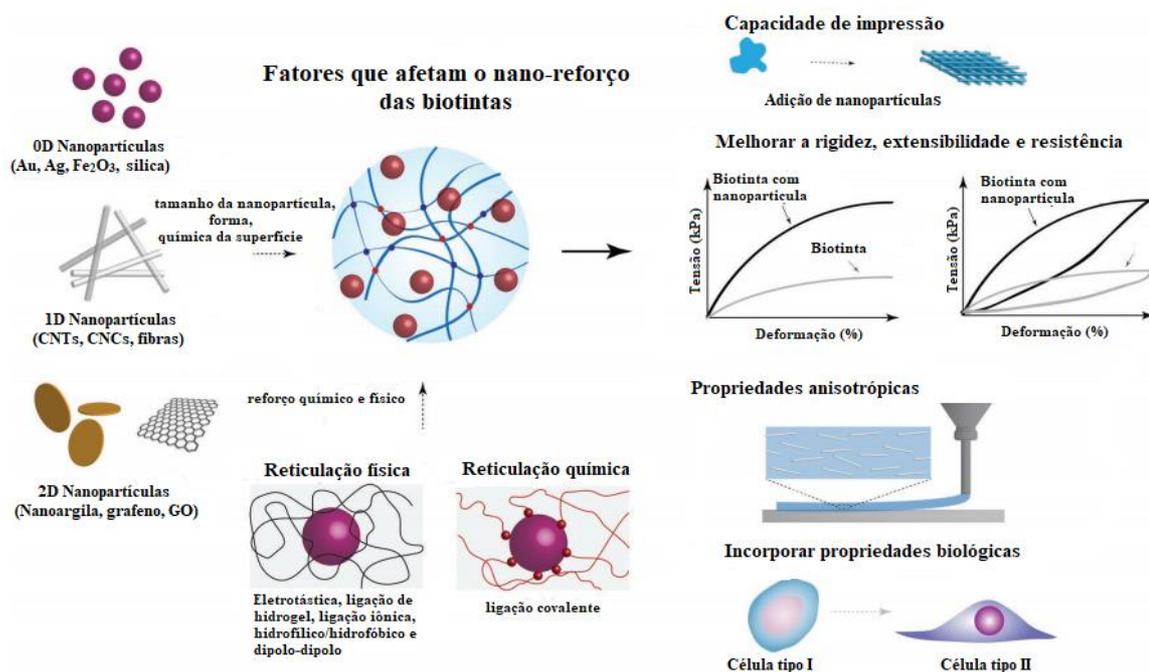


Figura 2.9: Biotinta baseada em reforço de nanocompósitos. Nanopartículas com uma variedade de tamanhos, formas e químicas de superfície podem reforçar mecanicamente as biotintas por meio de interações físicas e covalentes. Nanopartículas bioativas são capazes de direcionar a função celular em estruturas bioimpressas 3D. Adaptado de (Chimene et al., 2020)

Um dos nanomateriais amplamente usados como reforço de hidrogéis na impressão 3D são as nanoargilas (também conhecidas como nanossilicatos) (Guo et al., 2021). Sua boa solubilidade em água e biocompatibilidade combinadas com seus fortes efeitos nas propriedades reológicas e mecânicas impulsionaram sua popularidade no reforço de hidrogéis como alginato (Munoz-Perez et al., 2023), gelatina (Adib et al., 2020), polietilenoglicol (PEG) (Daguano et al., 2022), ácido hialurônico (Gaspar et al., 2021) e carboximetil celulose (Habib & Khoda, 2019). Os nanossilicatos são nanoplaquetas bidimensionais semelhantes a discos com menos de 1 nm de espessura e podem ser sintetizados de 25 nm a mais de 100 nm de diâmetro. Sua estrutura de cristal cria uma carga negativa permanente em ambas as faces e cargas positivas permanentes em torno da borda do disco. Os nanossilicatos possuem cargas superficiais permanentes e alta área

de superfície específica ($> 900 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) permitem que eles formem redes multifuncionais estáveis de reticulações eletrostáticas, que existem tanto entre partículas de nanoargila quanto como interações de nanoargila com cadeias poliméricas. Essas interações eletrostáticas (partícula - partícula e partícula - polímero) atuam como reticulações físicas aprimorando a capacidade de impressão e propriedades mecânicas dos hidrogéis (Das et al., 2019). Em um estudo, Dávila & d'Ávila (2019) relataram a avaliação reológica de tintas Laponita/alginate para impressão 3D baseada em extrusão. No estudo, géis de alginate com diferentes concentrações de Laponita foram avaliados com o objetivo de se chegar em uma tinta com boa capacidade de impressão. A tinta com boa capacidade de impressão foi definida em função do perfil de viscosidade, da capacidade de formação de filamentos, do ponto de fluxo e dos comportamentos sólido/líquido e a tinta com 5% em massa de Laponita foi a que teve melhor desempenho.

Outro nanomaterial utilizado como reforço de hidrogéis com propriedades semelhantes às dos nanosilicatos são os nanocristais de celulose (CNCs), esses nanocristais vem sendo utilizados como modificadores reológicos aprimorando as propriedades de impressão além de possuírem boas propriedades biológicas para aplicações biomédicas (Wang et al., 2021). A interação eletrostática entre os CNCs e o polímero resulta em hidrogéis com uma estrutura de rede reversível. Durante o processo de impressão, essa estrutura de rede entra em colapso durante o escoamento e se recupera rapidamente após a impressão. Essa característica aprimora as propriedades dos hidrogéis, como pseudoplasticidade e tensão de escoamento, que são propriedades importantes no processo de impressão 3D (Deng et al., 2021). A tensão de escoamento e a pseudoplasticidade contribuem para o fenômeno conhecido como escoamento pistonado (*plug flow*), onde o hidrogel se comporta como um fluido somente em uma camada fina próxima às paredes da extrusora (He & Lu, 2022). Devido sua grande área de superfície, os CNCs podem interagir com várias cadeias de polímero, seus efeitos nas propriedades de escoamento são ampliados quando incorporada com outros polímeros. Isso permite que a capacidade de impressão seja significativamente melhorada pela incorporação de pequenas quantidades de CNC à um polímero viscoso. Por exemplo, enquanto 2% de alginate é muito fluido para imprimir *scaffolds* de multicamadas, adicionar 10% de CNC como modificador reológico permite a impressão de estruturas de 30 camadas (Junior et al, 2019). Resultados semelhantes também foram relatados para uma tinta de carboximetil celulose (CMC) e CNC (da Fonsêca & d'Ávila, 2021).

Embora os nanocompósitos apresentem melhorias na capacidade de impressão e na resistência mecânica, sua utilização em tintas e biotintas levanta questões desafiadoras sobre a avaliação da sua biocompatibilidade em longo prazo devido às complexidades das interações das nanopartículas com sistemas biológicos (Zandi et al., 2021). Um dos principais desafios é que nanomateriais possam ter um impacto significativo nas interações destes com os sistemas biológicos em níveis subcelulares, influenciando a absorção celular, a biodegradabilidade e a imunogenicidade (Chimene et al., 2020). Outra limitação do uso de nanomateriais em aplicações biomédicas, são as incertezas regulatórias, pois as agências reguladoras ainda não estabeleceram regras claras sobre a avaliação da segurança dos nanomateriais, embora essa lacuna tenha sido reconhecida e esteja sendo abordada pelas agências (Cai et al., 2022). No geral, um progresso significativo foi feito na compreensão das respostas *in vitro* e *in vivo* de várias nanopartículas, mas a compreensão das interações biológicas dos nanomateriais ainda permanece incompleta.

O compromisso entre as propriedades de biocompatibilidade e capacidade de impressão para produzir tintas e biotintas aceitáveis para os processos de impressão e bioimpressão 3D para aplicações biomédicas é um desafio. No entanto, novas abordagens estão sendo desenvolvidas para melhorar a janela de biofabricação reforçando hidrogéis com eficiência, mantendo propriedades biológicas favoráveis. As diversas técnicas de reforço de hidrogéis tem se mostrado eficiente para obter alta fidelidade de impressão e fornecer um microambiente biocompatível com propriedades mecânicas aprimoradas (Chimene et al., 2020).

2.5 Parâmetros reológicos de tintas e biotintas no processo de impressão 3D baseado em extrusão

A impressão 3D baseada em extrusão de hidrogéis oferece a possibilidade de criar objetos tridimensionais de maneira ágil e personalizada (Park et al., 2022). Entretanto, a compreensão e o controle dos parâmetros reológicos dos materiais desempenham um papel crucial, pois são fundamentais para obter resultados de impressão com alta qualidade e consistência. Esses parâmetros reológicos têm uma importância significativa, uma vez que influenciam diretamente o processo de impressão, afetando a capacidade

dos materiais em serem extrudados de forma adequada (Bom et al., 2022; Fuentes-Caparrós et al., 2021).

Em geral, a reologia estuda a deformação e escoamento da matéria, ou seja, as respostas às tensões e/ou deformações aplicadas. No contexto da impressão 3D baseada em extrusão de hidrogéis, o comportamento reológico da tinta é inicialmente caracterizado pela ausência de escoamento quando está contida na seringa (ou cartucho). No entanto, ao ser submetida a forças externas, a tinta passa por uma transição para resistir à deformação e, em condições de alto cisalhamento, flui enquanto se move ao longo das paredes e do bocal de impressão. Conseqüentemente, a tinta assume uma nova forma até eventualmente retornar a um novo estado de repouso (Figura 2.10) (Schwab et al., 2020; Seoane-Viaño et al., 2021). Os parâmetros reológicos fundamentais que estão envolvidas nessas transições incluem a viscosidade, comportamentos pseudoplástico e viscoelástico, tensão de cisalhamento e recuperação da viscosidade. Essas propriedades estão diretamente relacionadas ao desempenho da tinta em diferentes fases do processo: antes da impressão (quando a tinta está em repouso e no início do escoamento), durante a impressão e após a impressão (precisão de impressão, fidelidade de forma e adesão) (Amorim et al., 2021; Schwab et al., 2020). Portanto, ao compreender e caracterizar essas propriedades reológicas, é possível obter informações importantes sobre o desempenho da tinta e garantir uma impressão de qualidade, tanto em termos de manipulação do material quanto na obtenção de resultados satisfatórios.

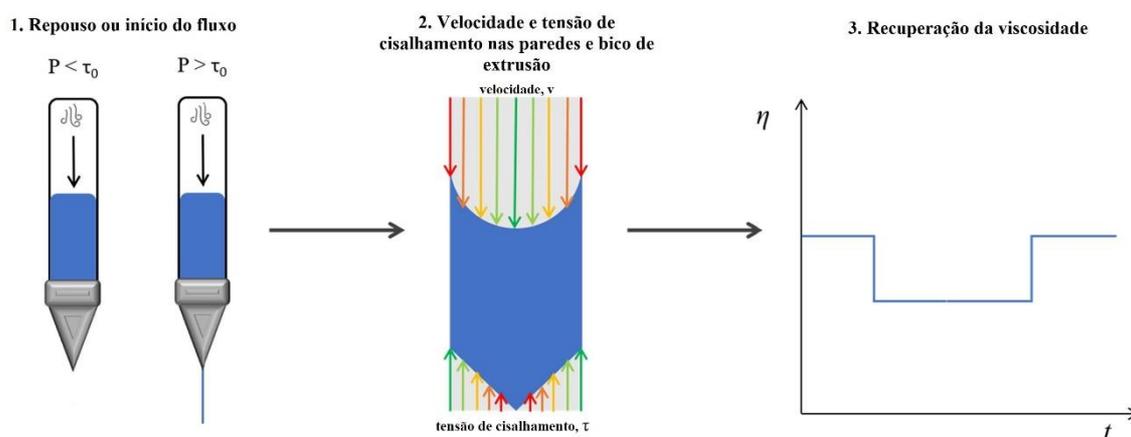


Figura 2.10: Parâmetros reológicos são importantes na impressão 3D por extrusão. Durante o processo, é necessário aplicar uma força maior que a tensão de escoamento do

material para movê-lo. A velocidade da tinta aumenta no centro do bocal e diminui perto das paredes. A tensão de cisalhamento é maior perto das paredes e menor no centro. Para uma impressão 3D precisa, é crucial que os materiais se recuperem após a deformação pela tensão de cisalhamento. Adaptado de (Bom et al., 2022).

2.5.1 Viscosidade

A viscosidade é a capacidade de resistência de um fluido ao escoamento sob a aplicação de tensões e desempenha um papel significativo na extrudabilidade, precisão de impressão e fidelidade de forma. A viscosidade é definida como a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (1)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa), η é a viscosidade (Pa.s) e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}).

No contexto das tintas de hidrogel, a viscosidade pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a temperatura, concentração de polímero, interações moleculares e massa molar, afetando assim o desempenho da tinta antes, durante e depois do processo de impressão 3D (Schwab et al., 2020). Geralmente, tintas com viscosidade mais elevada proporcionam uma maior precisão de impressão e têm uma maior capacidade de reter a forma após a extrusão. No entanto, é importante considerar que o aumento da viscosidade requer um aumento na tensão de cisalhamento durante a extrusão. Essa tensão de cisalhamento mais elevada pode danificar as células (no caso de um biotinta com células), rompendo as membranas celulares, tendo um impacto tanto na viabilidade celular quanto no desempenho biológico, bem como na capacidade de retenção de medicamentos (Cooke & Rosenzweig, 2021; Shahbazi & Jäger, 2020). Por outro lado, a baixa viscosidade pode reduzir a capacidade de impressão da tinta/biotinta e causar distribuição de células não homogêneas e rápida sedimentação celular (O'Connell et al., 2020). Portanto, compreender a função da viscosidade no processo de impressão 3D é crucial para obter uma extrusão adequada, garantir a precisão dimensional e assegurar a integridade

estrutural dos objetos impressos sem comprometer os aspectos biológicos e/ou farmacêuticos relacionados ao material.

Os fluidos Newtonianos exibem uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, ou seja, sua viscosidade é constante; por outro lado, os fluidos que não seguem essa linearidade são chamados de não Newtonianos (Cooke & Rosenzweig, 2021). Os fluidos não Newtonianos podem ser classificados como independentes do tempo, como pseudoplásticos e dilatantes; ou dependentes do tempo, como o comportamento tixotrópico ou antitixotrópico (Fig. 2.11). Um tipo de comportamento não Newtoniano é conhecido como pseudoplástico. Os fluidos pseudoplásticos exibem uma diminuição na viscosidade à medida que a taxa de cisalhamento aumenta. Em contrapartida, temos os fluidos dilatantes, que apresentam um aumento na viscosidade à medida que a taxa de cisalhamento aumenta. Além dos comportamentos independentes do tempo, há comportamentos dependentes do tempo. Um exemplo é o comportamento tixotrópico, em que a viscosidade do fluido diminui ao longo do tempo sob taxa de cisalhamento constante. Por outro lado, o comportamento antitixotrópico, também chamado de reopéxico, envolve um aumento na viscosidade do fluido ao longo do tempo sob taxa de cisalhamento constante (Cooke & Rosenzweig, 2021; Morrison, 2001).

Essas categorias descrevem como a viscosidade do fluido pode variar em resposta à aplicação de tensões de cisalhamento ao longo do tempo. Compreender e caracterizar essas propriedades reológicas dos fluidos não Newtonianos é essencial para controlar o processo de impressão 3D e otimizar a extrusão de materiais com propriedades reológicas específicas.

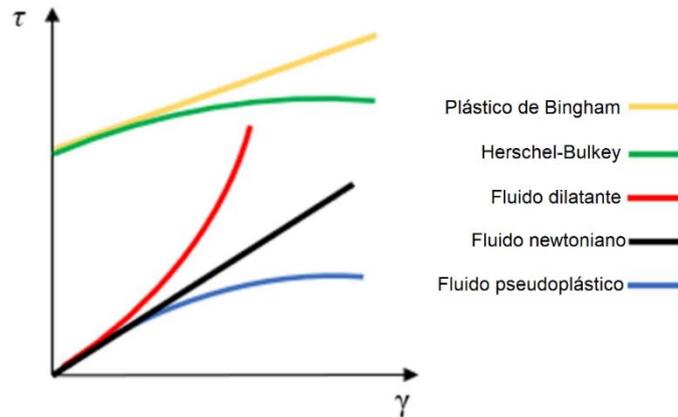


Figura 2.11: O comportamento de fluxo dos materiais é determinado pela relação entre a tensão de cisalhamento (τ) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). Essa relação é visualizada graficamente, onde a inclinação da curva resultante é conhecida como viscosidade. A partir do perfil da curva, os materiais podem ser classificados de acordo com seu comportamento de fluxo. Essa classificação desempenha um papel crucial na compreensão do comportamento dos materiais durante o processo de impressão 3D e fornece informações valiosas sobre a extrusão, manipulação e deposição dos materiais. Adaptado de (Morrison, 2001).

O comportamento dos fluidos Newtonianos pode ser descrito através da lei de Newton

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (2)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa), η é a viscosidade (Pa.s) e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento (s^{-1}).

O comportamento de fluidos não Newtonianos pode ser descrito por diferentes modelos, dependendo da dependência da viscosidade com a taxa de cisalhamento. Um modelo largamente utilizado é o modelo de viscosidade de lei de potências, proposto por Ostwald em 1925

$$\eta = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad (3)$$

onde K é o índice de consistência ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$) e n é o índice de lei de potências (adimensional). Dependendo do valor de n , pode-se identificar o comportamento Newtoniano e não Newtoniano. Se $n < 1$, tem-se o comportamento pseudoplástico; $n = 1$, Newtoniano e $n > 1$, dilatante.

A maioria das tintas utilizadas na impressão 3D baseada em extrusão apresenta comportamento não Newtoniano pseudoplástico, o que implica que sua viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. Os efeitos não Newtonianos frequentemente são atribuídos à reorientação de longas cadeias de polímeros e à interrupção de interações eletrostáticas, que são características comuns em tintas reforçadas. As tintas ideais para o processo de impressão 3D baseado em extrusão devem apresentar duas propriedades distintas. Primeiro, elas devem exibir um comportamento pseudoplástico, pois facilita o escoamento e a extrusão durante o processo de impressão 3D. Segundo, após a remoção da força de deformação, a viscosidade da tinta deve aumentar rapidamente. Essa propriedade é crucial para garantir uma alta fidelidade de forma e precisão de impressão, evitando deformações indesejadas ou perda de detalhes.

2.5.2 Comportamento viscoelástico

O comportamento viscoelástico desempenha um papel importante na impressão 3D baseada em extrusão, uma vez que indica a magnitude dos efeitos elástico e viscoso de tintas e biotintas. Essa característica é fundamental para o processo de impressão, pois permite que a tinta se deforme temporariamente durante a extrusão e, em seguida, retorne à sua forma original, mantendo a estrutura e a integridade das construções impressas (Bom et al., 2022). Entretanto, uma quantidade significativa de estudos realizados analisa principalmente a viscosidade, , como medida da influência dos componentes da tinta e, por fim, para selecionar a formulação ideal ou formulações ideais para suas pesquisas, sem considerar as propriedades viscoelásticas (Amorim et al., 2021).

A avaliação do comportamento viscoelástico é geralmente realizada através de testes oscilatórios. Esses testes permitem determinar o módulo de perda viscosa (G'') e o módulo de armazenamento elástico (G'), que descrevem as características viscoelásticas do material. No contexto da impressão 3D baseada em extrusão de hidrogéis, esses módulos estão associados ao comportamento viscoso da tinta durante o fluxo através do

bocal, a precisão da impressão e à fidelidade da forma após a conclusão do processo de impressão (Amorim et al., 2021; Townsend et al., 2019). Conforme ressaltado por Townsend et al. (2019), é essencial encontrar um equilíbrio adequado entre o módulo viscoso e o módulo elástico para assegurar uma alta precisão de impressão e fidelidade de forma. O estudo enfatiza a importância de ter uma tinta com propriedades reológicas que permitam um fluxo viscoso adequado durante a impressão, garantindo uma extrusão suave e consistente. Ao mesmo tempo, é necessário um componente elástico suficiente para manter a forma e a estrutura da construção impressa, evitando deformações indesejadas.

Os ensaios oscilatórios são realizados por meio de testes de amplitude ou varredura de frequência com tensão de cisalhamento controlada. Os testes de amplitude são frequentemente utilizados para determinar a região viscoelástica linear (LVE) e estabelecer a tensão de cisalhamento a ser aplicada no teste de varredura de frequência (Fig. 2.12a). O teste de varredura de frequência (Fig. 2.12b), por sua vez, permite não apenas caracterizar o comportamento viscoelástico das tintas de hidrogel dentro da LVE, mas também determinar o limite de escoamento. Além desses testes, uma sequência de eventos controlada pelo tempo com deformação de frequência única ou um teste de rampa controlado pela deformação de frequência única pode ser empregado para avaliar o comportamento viscoelástico dependente do tempo e da temperatura, respectivamente (Amorim et al., 2021; Cooke & Rosenzweig, 2021). Essas técnicas permitem uma caracterização das propriedades reológicas das tintas de hidrogel, abordando diferentes aspectos do comportamento viscoelástico.

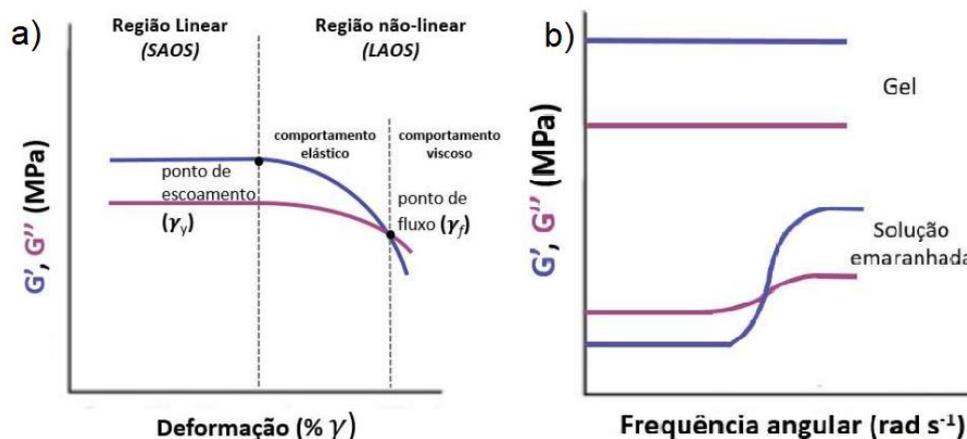


Figura 2.12: Testes de cisalhamento oscilatório de pequena amplitude (SAOS), a) Teste de amplitude, os módulos G' e G'' são medidos em função da deformação para determinar a região de viscoelasticidade linear (LVE), também é possível determinar os pontos de escoamento e de fluxo do hidrogel, b) Teste de varredura de frequência, através do ensaio de varredura de frequência é possível determinar a estrutura do material e os emaranhamentos moleculares que ocorrem desde baixas até frequências mais altas. Adaptado de (Mu et al., 2021).

Além disso, é altamente recomendado avaliar fator de amortecimento, conhecido como $\tan \delta$ (G''/G'), que descreve o comportamento viscoelástico das amostras. Esse parâmetro é particularmente relevante quando ocorre uma transição do tipo sol-gel na formação de hidrogéis (Gao et al., 2018). O fator de amortecimento, $\tan \delta$, fornece informações sobre a dissipação de energia durante a deformação do material e é uma medida importante para entender a capacidade do material de se adaptar a diferentes condições de deformação e manter a integridade estrutural (Seoane-Viaño et al., 2021). Em soluções semidiluídas, a sobreposição das cadeias poliméricas ocorre em baixas frequências, resultando em um comportamento viscoso predominante (*liquid-like*), onde o módulo de perda (G'') é maior que o módulo de armazenamento (G'). Nesse estágio, quando o módulo de armazenamento (G') supera o módulo de perda (G''), ocorre a transição do comportamento viscoso para o comportamento elástico (*solid-like*). Essa transição é observada como um ponto de gel. Em géis, essa transição não ocorre, pois o módulo de armazenamento (G') é maior que o módulo de perda (G'') em frequências menores. Essa característica é crucial na impressão 3D de hidrogéis, pois evita o colapso na estrutura do *scaffold* (Bom et al., 2022; Mu et al., 2021).

2.5.3 Recuperação da viscosidade

Um fluido tixotrópico é aquele que exibe uma recuperação de viscosidade dependente do tempo, após a redução da taxa de cisalhamento aplicada (Fu et al., 2021). Esse fenômeno de tixotropia pode ser caracterizado por meio de uma varredura de cisalhamento em três etapas (3ITT) (Fig. 2.13), que permite avaliar a viscosidade recuperada. Na primeira etapa, uma baixa taxa de cisalhamento é aplicada, simulando o estado próximo ao repouso na seringa. Em seguida, a taxa de cisalhamento é aumentada subitamente, correspondendo ao estado em que a tinta está fluindo pelo bico de impressão. Na terceira etapa, uma baixa taxa de cisalhamento é novamente aplicada, permitindo a reorganização das cadeias poliméricas. Esse processo promove a recuperação da viscosidade do fluido, restabelecendo suas propriedades originais (Jiang et al., 2019; X. Zhang et al., 2021).

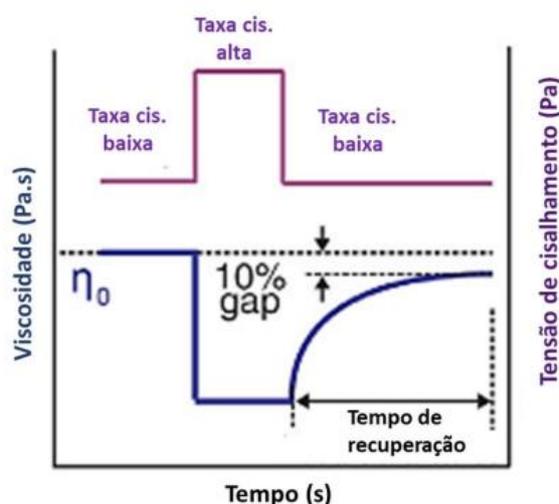


Figura 2.13: Teste de tixotropia de três intervalos de tempo. Esse ensaio pode ser conduzido para estudar o comportamento de recuperação da viscosidade da estrutura impressa em 3D e o tempo necessário para que essa recuperação aconteça. O teste mede a viscosidade em três intervalos de cisalhamento distintos. Adaptado de (Mu et al., 2021).

É evidente que os parâmetros reológicos desempenham um papel fundamental no processo de impressão 3D baseada em extrusão. Portanto compreender essas propriedades dos materiais utilizados é essencial para obter resultados de impressão de

alta qualidade e consistência. Nesse contexto, é necessário que os pesquisadores comecem a adotar protocolos de caracterização de tintas de hidrogel, que incluam tanto ensaios pré-impressão (reologia) quanto ensaios durante o processo de impressão. É preocupante que poucos pesquisadores considerem a reologia como uma ferramenta valiosa, limitando-se apenas a testes de viscosidade rotacional de rotina. Como consequência disso, a ausência de avaliação das propriedades elásticas implica na não consideração de fatores igualmente importantes, como a extrudabilidade, a precisão da impressão e a fidelidade de forma. Adicionalmente, conforme mencionado por Cooke e Rosenzweig (2021), há a possibilidade de projetar novas sequências reológicas que combinam a análise de diferentes parâmetros, os quais geralmente são caracterizados de forma separada, com o objetivo de replicar de maneira mais precisa o processo de impressão e as condições ambientais. É esperado que, em breve, protocolos de caracterização e otimização de tintas de hidrogel incluam uma variedade de testes reológicos mais abrangentes e robustos.

2.6 Aplicações biomédicas

A impressão 3D de hidrogéis para aplicações biomédicas é uma tecnologia inovadora que combina a versatilidade da impressão 3D com as propriedades únicas dos hidrogéis. Isso permite criar estruturas tridimensionais complexas com alta precisão (Li et al., 2020). Os hidrogéis são altamente biocompatíveis e podem imitar a matriz extracelular natural, o que os torna úteis em aplicações na medicina regenerativa (Catoira et al., 2019), liberação controlada de medicamentos (Zamboulis et al., 2022), engenharia tecidual (Advincula et al., 2021) e tratamento de feridas (Smandri et al., 2020). A impressão 3D de hidrogéis tem o potencial de revolucionar tratamentos médicos, melhorar resultados terapêuticos e oferecer soluções de saúde personalizadas. É uma área em crescimento que combina bioengenharia, ciência dos materiais e medicina, com um impacto significativo na saúde no futuro (Advincula et al., 2021). Nesta seção serão abordadas as aplicações dos hidrogéis aliada com a tecnologia de impressão 3D para engenharia tecidual e tratamento de feridas com foco no tratamento da leishmaniose cutânea, para melhor entendimento do leitor e desenvolvimento do trabalho.

2.6.1 Engenharia tecidual

A engenharia tecidual emprega os princípios biológicos e de engenharia para desenvolver substitutos funcionais destinados a substituir, reparar e regenerar tecidos e órgãos que foram perdidos, danificados ou acometidos por doenças. Esse campo tem apresentado um rápido avanço, buscando solucionar as limitações relacionadas à disponibilidade de tecidos doadores e às rejeições de transplantes. Os projetos de estruturas para suportes de tecidos (*scaffolds*) devem ser capazes de criar complexas arquiteturas tridimensionais com porosidade hierárquica e formas anatômicas variadas, visando alcançar as propriedades de transporte de massa e características mecânicas desejadas. Assim, busca-se combinar a funcionalidade mecânica com a capacidade de regeneração dos tecidos e órgãos. No entanto, os métodos tradicionais de fabricação, como moldagem por solvente, separação de fases, espuma de gás e liofilização, apresentam limitações para a produção de estruturas de suporte com topologias complexas e adequadas propriedades mecânicas (Li et al., 2020). A impressão 3D, como uma tecnologia de fabricação avançada, apresenta vantagens notáveis, como a capacidade de personalização e alta precisão. Com isso, tornou-se uma ferramenta cada vez mais poderosa para pesquisadores, engenheiros e profissionais da área clínica. A impressão 3D possui um enorme potencial como uma forma acelerada, acessível e promissora de traduzir conceitos de engenharia tecidual em implementações clínicas.

A engenharia tecidual tornou-se uma área de grande interesse e potencial, especialmente no que diz respeito aos hidrogéis, devido à sua capacidade de promover a adesão, crescimento e diferenciação celular. Os hidrogéis são adequados para permitir a troca eficiente de nutrientes e resíduos com os tecidos vizinhos, além de servirem como estruturas de suporte devido à sua biocompatibilidade e propriedades mecânicas adequadas. A combinação dessas propriedades justifica a pesquisa contínua de hidrogéis poliméricos para aplicações de engenharia tecidual (Krishna & Sankar, 2023).

Biopolímeros, polímeros sintéticos puros e materiais nanocompósitos são amplamente utilizados como materiais de partida para a fabricação de hidrogel (X. N. Zhang et al., 2022). Cada um desses materiais possui vantagens e desvantagens ao ser utilizado na fabricação de hidrogéis para aplicações em engenharia tecidual. Por exemplo, os biopolímeros são geralmente biocompatíveis e bioativos, porém costumam apresentar características estruturais intrínsecas que são difíceis de replicar em um ambiente de

laboratório (Li et al., 2020). Em contraste, o uso de polímeros sintéticos na formação de hidrogéis possibilita a seleção direcionada e a modificação de propriedades, como massa molecular e morfologia. De maneira similar, é possível adaptar nanocompósitos e misturas de polímeros para aprimorar as propriedades mecânicas de um hidrogel com foco em uma aplicação específica (Huang et al., 2022). Colágeno, gelatina e alginato são exemplos de polímeros de hidrogel de origem natural que têm sido amplamente estudados devido às suas aplicações biomédicas. Entretanto, um dos principais desafios consiste em realizar adaptações ou modificações nesses materiais sem comprometer suas estruturas nativas e suas propriedades biológicas. (Mallakpour et al., 2021).

Regeneração da pele

A pele humana possui uma anatomia complexa, composta por três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme, com uma espessura média de aproximadamente 2,5 mm. Essas camadas abrigam diferentes tipos de células de maneira regionalmente específica, incluindo queratinócitos e melanócitos na epiderme, fibroblastos na derme e tecido adiposo na base da hipoderme. O colágeno, por sua vez, está presente em todas as três camadas. A engenharia tecidual tem como objetivo desenvolver substitutos de pele que superem as limitações dos métodos tradicionais de terapia cutânea. Nesse contexto, a bioimpressão 3D surge como uma estratégia promissora, permitindo a produção ágil, confiável e em escala de substitutos de pele biomiméticos que atendam aos requisitos clínicos para a regeneração da pele humana. (Smandri et al., 2020).

Para restaurar a integridade da pele e promover a cicatrização de feridas de forma acelerada, têm sido propostos diversos tipos de biotintas naturais compostos por hidrogéis de alginato, gelatina e colágeno. Essas opções são selecionadas devido às suas propriedades desejáveis, que incluem a semelhança com a matriz extracelular da pele e excelente biocompatibilidade. Em um estudo conduzido por Zhao et al., (2016) foi comprovado que os *scaffolds* feitos de gelatina metacrilada (GelMA) apresentam a capacidade de induzir a formação de uma epiderme com múltiplas camadas, bem como promover o crescimento de queratinócitos em um tecido funcional que se assemelha à epiderme. Além disso, esse mesmo grupo utilizou hidrogéis de GelMA para desenvolver um *scaffold* tridimensional completamente celularizado, imitando a matriz extracelular, com o objetivo de acelerar o processo de cicatrização de feridas.

Ma et al., (2023) abordaram a bioimpressão 3D de um hidrogel de gelatina/alginato com células-tronco derivadas de tecido adiposo, que foi modificado com um gradiente de rigidez. O hidrogel impresso foi projetado para imitar a estrutura e as propriedades mecânicas da pele natural. Ao introduzir as células-tronco no hidrogel, esperava-se que elas contribuíssem para a regeneração dos tecidos da pele. O estudo propôs uma abordagem inovadora para a engenharia tecidual cutânea, utilizando a impressão 3D e células-tronco para alcançar a regeneração completa da pele em espessura total.

Em um outro estudo, Jiao et al., (2023) investigaram as propriedades dos hidrogéis de colágeno/alginato para a bioimpressão 3D de modelos de pele. O objetivo foi avaliar a viabilidade desses hidrogéis como biomateriais para a fabricação de estruturas de pele em laboratório. Foram analisadas as características físicas, como as propriedades reológicas dos hidrogéis, além de sua capacidade de suportar o crescimento celular. Os resultados mostraram que os hidrogéis de colágeno/alginato apresentaram propriedades adequadas para a bioimpressão e sustentação celular. Esses achados sugerem que esses hidrogéis podem ser promissores para a fabricação de modelos de pele utilizados em pesquisas e testes laboratoriais.

2.6.2 Tratamento de feridas

As lesões ou danos aos tecidos, também chamadas de feridas, representam um sério problema de saúde, responsável por uma parcela significativa dos gastos globais com cuidados de saúde a cada ano (Sen, 2019). As feridas podem ser classificadas com base no processo de cicatrização em feridas agudas ou crônicas. As feridas agudas são lesões que tendem a se curar dentro do período esperado de aproximadamente 2 a 3 meses, variando de acordo com a extensão e tamanho da lesão na pele. (Ndlovu et al., 2021). Já as feridas crônicas não seguem o processo de cicatrização padrão ao longo de um período prolongado. Exemplos de feridas crônicas incluem feridas diabéticas, úlceras cutâneas, queimaduras, entre outras (Patel et al., 2019). O processo de cicatrização de feridas é uma resposta imediata e protetora do corpo diante de uma lesão. Durante esse processo, os tecidos danificados ou destruídos são removidos, a fim de gerenciar as vulnerabilidades dos tecidos cutâneos e restaurar sua integridade (Beldon, 2010). No entanto, essa etapa requer cuidados importantes por parte dos pacientes e a aplicação adequada de coberturas

na ferida. Embora os curativos convencionais, como gaze, algodão, adesivos e bandagens ofereçam proteção contra contaminantes, sua troca frequente é necessária para evitar o dano dos tecidos adjacentes e eles tendem a aderir à lesão, o que torna a substituição dolorosa (Smandri et al., 2020).

Um curativo ideal deve possuir propriedades que o tornem adequado para proporcionar um ambiente propício ao processo de cicatrização. Essas propriedades incluem durabilidade, flexibilidade, permeabilidade ao vapor de água, aderência ao tecido e boas características mecânicas (Zou et al., 2019). Além disso, os materiais utilizados no curativo devem ser capazes de hidratar ou desidratar a ferida, manter um ambiente úmido, proteger contra infecções e prevenir a maceração (Huang et al., 2019). Os materiais de curativo baseados em polímeros têm a capacidade de oferecer essas propriedades desejadas. Esses polímeros podem ser classificados principalmente como biopolímeros e polímeros sintéticos (Abid et al., 2019). Exemplos de biopolímeros incluem gelatina, celulose, quitina, alginato, ácido hialurônico, quitosana, dextrano, elastina, fibrina, entre outros. No entanto, os curativos formulados apenas com biopolímeros geralmente apresentam baixas propriedades mecânicas. Portanto, uma estratégia promissora é combinar biopolímeros com polímeros sintéticos ou nanocompósitos para superar essas limitações e melhorar as propriedades mecânicas dos curativos à base de biopolímeros (Hussain et al., 2018).

As tecnologias de manufatura aditiva têm oferecido soluções rápidas no tratamento de feridas, evitando a contração e promovendo a cicatrização eficiente. Entre essas tecnologias, destaca-se a bioimpressão tridimensional (3D), uma técnica em constante evolução que visa utilizar materiais biocompatíveis incorporados com células vivas e fatores de crescimento, a fim de imitar e restaurar a MEC natural dos órgãos e tecidos humanos (Chouhan et al., 2019). Os hidrogéis de polímeros naturais são os materiais mais utilizados na impressão 3D de curativos para o tratamento de feridas. Devido a capacidade dos hidrogéis reterem grandes quantidades de volume de água, eles podem absorver o exsudato secretado pela ferida, reduzindo assim sua biocarga. Além disso, possuem boa biocompatibilidade e são biodegradáveis (Piao et al., 2021). A impressão 3D de *scaffolds* para o uso no tratamento de feridas possui várias vantagens, como o controle da construção de poros para a penetração de oxigênio, incorporação de drogas e liberação controlada dessas drogas ou outros compostos com propriedades regenerativas, anti-inflamatórias e antibactericida. Outra vantagem é a capacidade de ajustar as características dimensionais do curativo (Cleetus et al., 2020).

Um exemplo de polímero natural muito usado como curativo no tratamento de feridas é o alginato de sódio. Além de possuir todas as propriedades já citadas acima, a reticulação do alginato com íons de cálcio (Ca^{2+}) faz com que o alginato se torne um hemostático natural. Hemostáticos são materiais ou dispositivos, os quais têm a capacidade de promover o fechamento de tecidos orgânicos. Ao serem aplicados sobre a ferida, esses produtos absorvem os fluidos e expandem-se, vedando a lesão e exercendo pressão nos tecidos, o que impede o sangramento e proporciona alívio da dor ao paciente durante a troca de curativos. (Wróblewska-Krepsztul et al., 2019). Além disso, esse tipo de curativo proporciona um ambiente úmido que favorece a rápida formação de tecido de granulação e epitelização na região da ferida, resultando na cicatrização adequada do enxerto de pele proveniente da área doadora (O'Donoghue et al., 1997). Os curativos à base de alginato têm sido amplamente documentados na literatura e utilizados clinicamente no tratamento de feridas (Mallakpour et al., 2021; Varaprasad et al., 2020).

Cleetus et al., (2020) investigaram a impressão 3D de hidrogéis de alginato com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) incorporadas para terapia de cicatrização de feridas. Os resultados mostraram que os hidrogéis de alginato com nanopartículas de ZnO demonstraram propriedades antimicrobianas e aceleraram a regeneração de tecidos, auxiliando no processo de cicatrização de feridas. Esses achados sugerem que esses hidrogéis podem ser promissores para o desenvolvimento de terapias de cicatrização de feridas mais eficazes. Em um outro estudo Madadian et al., (2023) estudaram a impressão 3D de uma espuma de albumina/alginato para aplicações de curativos de feridas. A espuma foi fabricada usando uma combinação de albumina e alginato, sendo projetada para ser adequada para a impressão em 3D. Os resultados mostraram que a espuma impressa em 3D apresentou propriedades adequadas, como porosidade e capacidade de absorção de líquidos, que são importantes para o uso como curativo de feridas. Esses achados indicam que a espuma de albumina-alginato tem potencial para ser utilizada como curativo inovador em aplicações de tratamento de feridas.

Leishmaniose cutânea

A leishmaniose é uma doença tropical que representa uma ameaça significativa para a saúde pública e é causada por várias espécies do parasita do gênero *Leishmania*, transmitido pela picada das fêmeas dos flebotomíneos, conhecidos popularmente como

mosquito-palha (Kaye et al., 2020). As principais formas clínicas da leishmaniose são a cutânea, mucocutânea (Fig. 2.14) e visceral. A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais prevalente da doença e é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, como América Central e do Sul, Ásia, África e países do Mediterrâneo. Estima-se que cerca de 1,2 milhão de pessoas sejam infectadas com LC anualmente (Souto et al., 2019; Thakur et al., 2020). A LC é caracterizada pelo surgimento de úlceras no local da picada do flebotomíneo e, às vezes, pode curar-se espontaneamente (Santana et al., 2021; Souto et al., 2019).

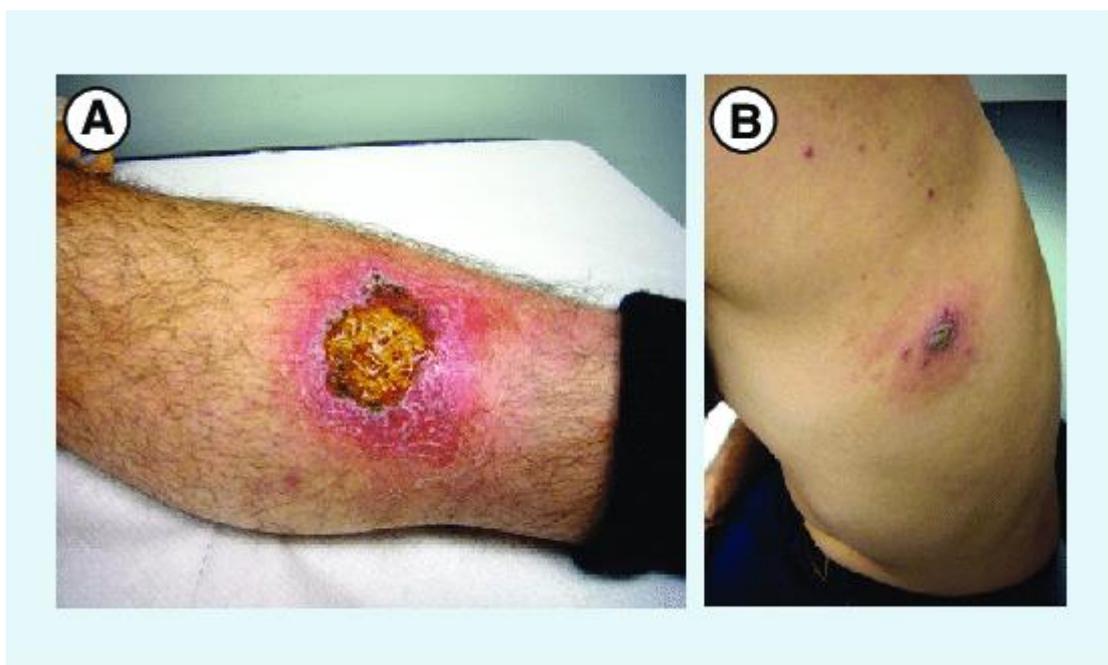


Figura 2.14: Infecção por *Leishmania braziliensis* com disseminação cutânea. (Mokni, 2019).

A transmissão ocorre quando fêmeas de flebotomíneos se alimentam do sangue do hospedeiro mamífero, regurgitando promastigotas no processo. Promastigotas são fagocitados por macrófagos residentes, onde se transformam em amastigotas no interior dessa célula. Amastigotas são adaptadas para suportar o ambiente ácido do interior do vacúolo parasitóforo, e se multiplicam para infectar novas células. O inseto vetor se infecta quando se alimenta do hospedeiro mamífero doente, e no intestino do inseto os amastigotas se transformam em promastigotas novamente para reiniciar o ciclo de transmissão (Fig. 2.15).

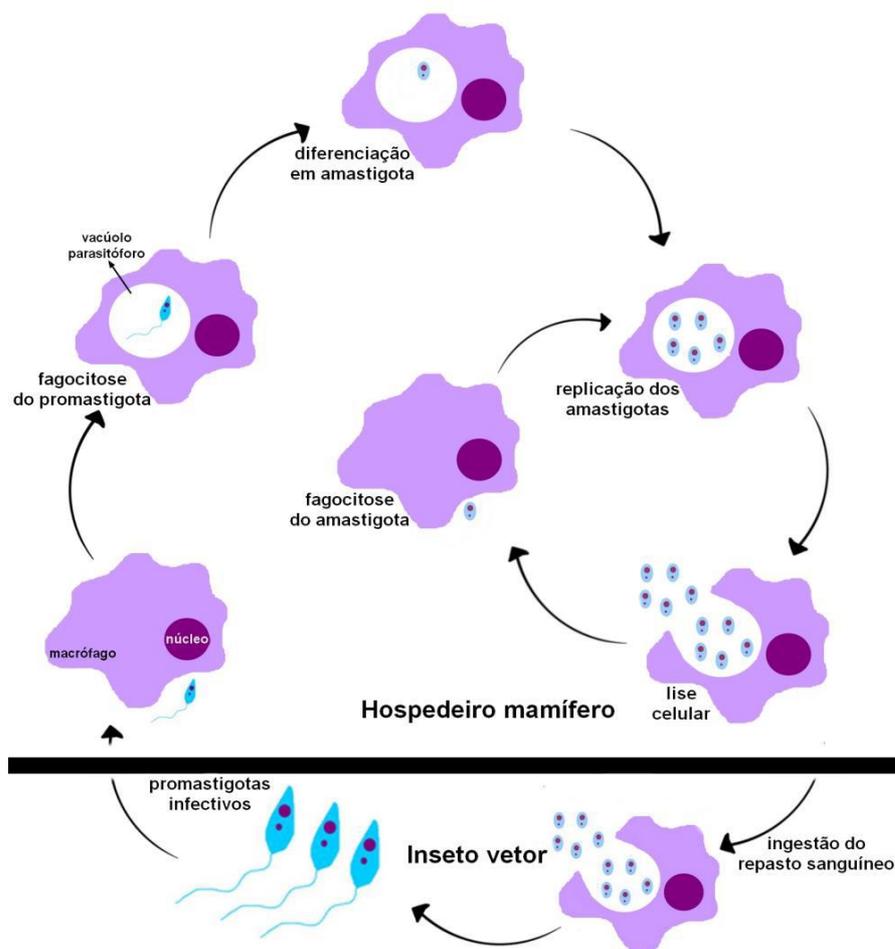


Figura 2.15: O ciclo de vida da *Leishmania* envolve a interação entre um hospedeiro mamífero e um inseto vetor, com diferentes formas biológicas. Adaptado de (Rosa et al., 2021).

No entanto, é importante tratar a infecção para evitar a transmissão da doença, reduzir o risco de complicações e diminuir a possibilidade de recidivas (Thakur et al., 2020). O tratamento da LC envolve o uso de medicamentos, como antimônio e antimonial pentavalente, que possuem eficácia limitada e apresentam alta toxicidade, além de exigir administração parenteral e internação do paciente para acompanhamento (Barral et al., 1983). Além disso, a entrega sistêmica de medicamentos por meio de injeção hipodérmica é limitada, com menos de 0,1% do medicamento alcançando a lesão cutânea. Isso pode levar ao acúmulo de medicamentos no baço e no fígado (Souto et al., 2019). Portanto, é necessário melhorar o tratamento da LC para superar essas desvantagens (Capela et al., 2019; Casalle et al., 2020).

Nos últimos anos, a tecnologia de impressão 3D aplicada no desenvolvimento de curativos tem surgido como uma abordagem promissora para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea. Essa tecnologia tem o potencial de ser usada para criar sistemas personalizados de liberação de medicamentos adaptados às necessidades de cada paciente (Severino et al., 2022). Um tipo de material que tem sido utilizado nesse contexto são os hidrogéis. Os hidrogéis são macios e hidrofílicos, o que os torna ideais para sistemas de liberação de medicamentos e curativos, pois podem ser carregados com medicamentos e implantados no local da infecção, permitindo uma liberação lenta do medicamento ao longo do tempo (Aguilar-de-Leyva et al., 2020). Essa abordagem pode aumentar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos colaterais associados às terapias tradicionais. Ao aproveitar as capacidades únicas da impressão 3D, os pesquisadores estão trabalhando no desenvolvimento de novos tratamentos inovadores para a leishmaniose que podem melhorar os resultados para os pacientes (Severino et al., 2022).

Estudos sobre o uso de hidrogéis no tratamento da leishmaniose podem ser encontrados na literatura, onde o tipo de hidrogel utilizado no tratamento varia dependendo da aplicação específica e do medicamento a ser administrado. Alguns hidrogéis comumente utilizados nesse campo incluem poliálcool vinílico (PVA) (Alexandrino-Junior et al., 2019), polietilenoglicol (PEG) (Jafari et al., 2022), nanocelulose (CNC) (Goonoo et al., 2022), quitosana (Shakeel et al., 2023) e alginato (Soeiro et al., 2021). Esses hidrogéis são escolhidos com base em suas propriedades, como biocompatibilidade, resistência mecânica e características de liberação do medicamento. Alexandrino-Junior et al. (2019) estudaram o desenvolvimento de um tratamento tópico para leishmaniose cutânea (LC) utilizando hidrogéis de poliálcool vinílico (PVA) contendo Anfotericina B (AmB). Os hidrogéis de PVA mostraram potencial na eliminação do parasita, prevenção de infecções secundárias, promoção da cicatrização e biocompatibilidade. Verificou-se que a AmB foi liberada de forma contínua e controlada pelos hidrogéis. Os resultados sugerem que os hidrogéis de PVA-AmB podem ser uma abordagem adequada e eficiente para o tratamento tópico da LC.

Em outro estudo, Soeiro et al., (2021) investigaram a produção de um nanocomplexo composto por alginato (Alg), um polímero natural, com AmB recoberto por nanocristais de celulose bacteriana (CNC). Os resultados de toxicidade *in vitro* indicaram que os nanocomplexos Alg-AmB podem ser considerados uma alternativa não tóxica para melhorar o efeito terapêutico do AmB. O alginato e os nanocristais de celulose estão sendo explorados como materiais potenciais para o tratamento tópico da

leishmaniose cutânea devido à sua biocompatibilidade, que é bem tolerada pela pele, reduzindo o risco de irritação cutânea ou outras reações adversas. Além disso, ambos podem formar hidrogéis que podem liberar medicamentos por um período prolongado, melhorando sua penetração através da pele e potencialmente aprimorando a eficácia do tratamento.

O tratamento da leishmaniose é complexo devido à alta toxicidade da maioria dos medicamentos (Souto et al., 2019). Os antimoniais pentavalentes oferecem melhores opções de tratamento com menor toxicidade em comparação aos sais de antimônio trivalentes (Sb III) que eram utilizados há mais de 100 anos, mas foram descontinuados devido à toxicidade, faixa de dosagem efetiva limitada e resistência do parasita (Casalle et al., 2020). O antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) é fornecido pelo Ministério da Saúde no Brasil com uma dose prescrita de 10-20 mg/kg/dia por 20-30 dias administrados por via intravenosa ou intramuscular (Ponte-Sucre et al., 2017). No entanto, Glucantime® apresenta alguns efeitos mutagênicos (Capela et al., 2019). A eficácia dos medicamentos antimoniais orgânicos é alcançada pela redução de Sb(V) para Sb(III) e pela inibição da tripanotona redutase e do estresse oxidativo (Denton et al., 2004). De acordo com as últimas diretrizes de tratamento da leishmaniose para as Américas (2ª Edição), os antimoniais pentavalentes são recomendados para o tratamento da leishmaniose mucocutânea, com ou sem pentoxifilina oral (PAHO, 2022).

Apesar da diversidade de espécies e das várias formas da doença, a farmacoterapia tem sido limitada por muitos anos. Esforços nas últimas décadas têm sido direcionados para o desenvolvimento de novos tratamentos com eficiência aprimorada, baixos custos e redução de efeitos colaterais (Oliveira et al., 2021; Santos et al., 2020). Investigar extratos e compostos com atividade biológica de plantas utilizadas na medicina tradicional é uma estratégia promissora na busca por compostos que possam ter o potencial de prevenir e tratar a leishmaniose (Aguilar-de-Leyva et al., 2020). A indústria farmacêutica tem demonstrado interesse global em substâncias naturais e/ou extratos para a criação de novas formulações com potencial terapêutico. Entre as diversas substâncias naturais investigadas, os extratos de plantas têm se destacado como fonte de constituintes com propriedades leishmanicidas. Em diferentes laboratórios ao redor do mundo, têm sido identificados fármacos derivados de fontes naturais (Ahmad et al., 2019).

Os fitocompósitos apresentam diversas vantagens, como a proteção contra efeitos tóxicos, melhoria do efeito terapêutico, aumento da segurança, prolongamento do tempo de ação e defesa contra degradação física e química (P. Wang et al., 2016). Diversas

plantas, como *Kalanchoe pinnata*, *Plumbago scandens*, *Physalis angulata*, *Piper aduncum*, *Tabemaemontana australis* e *Phyllanthus amarus* e *Melaleuca alternifolia* foram identificadas por possuírem atividade terapêutica contra a leishmaniose (Bahmani et al., 2015).

Óleo essencial de melaleuca

O óleo essencial de melaleuca, também conhecido como *Tea Tree Oil* (TTO), é um óleo essencial volátil derivado das folhas da planta nativa australiana *Melaleuca alternifolia*, composto por constituintes monoterpênicos como terpinen-4-ol (T4O), 1,8-cineol, limoneno, p-cimeno e α -terpineno. Tem sido usado por suas propriedades medicinais, incluindo potentes propriedades antimicrobianas contra uma ampla gama de bactérias, vírus e fungos, e efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antiparasitários (Lam et al., 2020). O TTO e seus componentes têm sido encontrados com atividades leishmanicida *in vitro* sem toxicidade significativa. Pesquisas avaliaram o impacto de diferentes óleos essenciais e sesquiterpenos isolados na viabilidade de promastigotas de *Leishmania major*, e os resultados mostraram que compostos do TTO, como α -pineno, aromadendreno, sabineno, T4O e terpinoleno, tiveram valores de IC50 (concentração necessária para eliminar 50% dos parasitas da cultura) de 55,3, 63,8, 126,6, 335,9 e 387,9 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Mikus et al., 2000). Estudos estabeleceram que o TTO deve ter um conteúdo mínimo de 30% de T4O para ser eficaz (Hami, 2022). Outro estudo *in vitro* constatou que o limoneno teve uma IC50 de $354,0 \pm 33,0 \mu\text{M}$ contra promastigotas de *L. major*. O tratamento com 300 μM de limoneno resultou em uma redução de 78% nas taxas de infecção em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Arruda et al., 2009).

3 IMPRESSÃO E BIOIMPRESSÃO 3D DE SCAFFOLDS DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL: AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE, ADESÃO E MORFOLOGIA CELULAR

Neste capítulo, o comportamento celular nos scaffolds de hidrogéis nanocompósitos do sistema alginato/CNC foi estudado. Foi observado que diferentes concentrações de alginato, CNC e o gel do sistema alginato/CNC não apresentaram citotoxicidade para células do tipo NIH3T3. Além disso, o gel contendo 2% (m/m) de alginato e 10% (m/m) de CNC demonstrou um aumento da população celular indicando assim uma proliferação celular após 96h de incubação. Scaffolds hexagonais com dimensão de 20x20 mm e 10 camadas foram impressos e células do tipo NIH3T3 foram semeadas sobre os scaffolds. Micrografias de fluorescência confocal demonstraram células viáveis nos scaffolds após 3 dias de incubação. Uma biotinta (alginato/CNC + NIH3T3) foi formulada e os resultados reológicos da tinta e biotinta demonstraram um comportamento pseudoplástico e viscoelástico predominantemente sólido. Portanto a incorporação de células no sistema alginato/CNC não alterou as propriedades reológicas adequadas para o processo de impressão 3D baseada em extrusão. Por fim, a bioimpressão foi realizada e micrografias de fluorescência confocal demonstraram células viáveis e aderidas após 3 dias de incubação. Com esses resultados, fica evidente que o sistema alginato/CNC tem grande potencial para aplicações na engenharia tecidual.

3.1 Material e Métodos

3.1.1 Material

Alginato de sódio de média viscosidade de algas marrons (massa molar entre 80.000 e 120.000 g.mol⁻¹, composto de aproximadamente 61% de ácido manurônico e 39% de ácido gulurônico) e cloreto de cálcio, foram ambos adquiridos da Sigma-Aldrich Corp., EUA. Nanocristais de celulose, hidrolisados com ácido sulfúrico a partir de polpa de madeira, foi adquirida da Celluforce, Canadá. De acordo com o fornecedor, a largura e o comprimento das partículas do tipo haste CNC são de 5 a 20 nm e 150 a 200 nm, respectivamente. Para a cultura celular e testes biológicos foram usados meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), dimetilsulfóxido (DMSO), paraformaldeído, BSA, Triton, azul de tripan, MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], FITC-faloidina e 40,6 diamidino-2 fenilindol (DAPI) todos foram adquiridos da Sigma-Aldrich Corp., EUA. Soro fetal bovino (FBS) (Gibco, Life Technologies, Burlington, ON, Canadá), penicilina, estreptomicina, solução salina tamponada com fosfato (DPBS) e frascos de cultura de tecidos de 75 cm². (CORNING).

3.1.2 Preparação da tinta e biotinta

Inicialmente o alginato de sódio, o CNC e o cloreto de cálcio foram submetidos a três ciclos de esterilização por luz ultravioleta (UV) com duração de 30 minutos cada. Em seguida, o alginato de sódio na proporção de 2% (em massa) foi dissolvido em água deionizada (tipo II, com condutividade inferior a 1 µS.cm⁻¹), utilizando um agitador de vórtex por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se e dissolveu-se o CNC em uma quantidade de 10% (em massa) também com o auxílio do agitador de vórtex durante 10 minutos. As amostras foram então submetidas a sonicação a 40 kHz por 10 minutos usando o equipamento de limpeza ultrassônica Unique USC 700.

Para o preparo da biotinta, as células NIH3T3 foram cultivadas como descrito acima, tripsinizadas, contadas usando o método de exclusão de azul tripan e ressuspensas

em meio DMEM. Utilizando duas seringas e um conector *luer lock*, o meio de suspensão de células foi misturado ao gel de alginato/CNC a uma concentração de 1:10 (v/v). A densidade celular final na biotinta foi de 10^6 células/mL. Todas as tintas e biotintas foram preparadas no fluxo laminar.

3.1.3 Cultura celular

Fibroblastos de camundongo (NIH3T3) foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina G e estreptomicina. As células foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos de 75 cm² a 37 °C em um ambiente umidificado com 5% de CO₂ até a confluência de 70%, em seguida foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (DPBS), tratadas com 0,25% de Tripsina / EDTA por 10 min para liberar as células do frasco, e em seguida sedimentadas por centrifugação a 1500 rpm por 5 min e, finalmente, ressuspensas com meio DMEM para a densidade celular desejada.

3.1.4 Avaliação da citotoxicidade

O ensaio MTT (brometo de 3- [4,5- dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi realizado para avaliar a citotoxicidade das concentrações de alginato (0,5, 1,0, 1,5, 2%) e CNC (2, 4, 6, 8, 10%) em massa, e para a mistura com alginato a 2% (m/m) e CNC a 10% (m/m).

Fibroblastos de células de camundongo (NIH3T3) foram semeados em placas de 96 poços a 3×10^3 células/poço com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina G e estreptomicina e incubadas por aproximadamente 12 h. Com a confluência de aproximadamente 70%, a monocamada celular foi lavada 3x com DPBS (solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco), 200 µL de alginato de diferentes concentrações e CNC dissolvidos no meio de cultura DMEM foram adicionados a cada poço e 200 µL de meio de cultura de células foram adicionados ao grupo controle (branco).

As células foram então incubadas por 12, 24, 48, 72 e 96h. Posteriormente, as células foram incubadas em um DPBS contendo 10 μL de agente MTT (0,5%) a 37 °C por 3h. O sobrenadante foi removido e 100 μL de DMSO foram adicionados a cada poço para garantir a solubilização dos cristais de formazan. Finalmente, a absorbância foi determinada usando um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços em um comprimento de onda de 570 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.1.5 Caracterização Reológica da Biotinta

As análises reológicas da biotinta foram conduzidas utilizando um Reômetro Compacto Modular Anton Paar MCR-102. Esses testes foram realizados a uma temperatura de 25 °C, empregando uma geometria de cone placa (CP50-1) com um diâmetro de 50 mm. O teste de viscosidade foi realizado em uma faixa de taxa de deformação de 0,01 a 1000 s^{-1} . Além disso, foram conduzidos testes de varredura de amplitude com uma frequência angular de 10 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ e amplitude de deformação variando de 0,01 a 100%. Com base nos resultados desses testes, foi determinado o intervalo de viscoelasticidade linear (LVE) para uma deformação de 1% ($\gamma_0 = 1\%$) e também foi identificado o ponto de fluxo para as amostras sólidas. O ponto de fluxo é definido como o cruzamento dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') quando eles se tornam iguais. Além disso, para a análise da biotinta, foram conduzidos testes de varredura de frequência na faixa de 0,1 a 240 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$. Todos os procedimentos de teste foram realizados em triplicata para garantir a precisão e a confiabilidade dos resultados.

Todos os resultados foram comparados com os resultados reológicos já obtidos por Junior et al. (2019), com o objetivo de estudar a influência da densidade celular nos parâmetros reológicos.

3.1.6 Impressão e bioimpressão dos *scaffolds*

Foram impressos *scaffolds* do sistema alginato/CNC com 10 camadas, dimensão 20x20 mm (com 0,41 mm de altura de camada) através do cabeçote modular desenvolvido

por (Dávila, Manzini, d'Ávila, et al., 2022), com velocidade de 10 mm.s^{-1} e espaçamento de 0,41 mm através de um bico cônico 22G de 14 mm de comprimento e 0,41 mm de diâmetro interno. O software Repetier-Host V2.1.3 foi utilizado para as impressões. Os arquivos de código g contendo os caminhos de impressão foram gerados usando o software BioScaffoldsPG 2.0 (Dávila, Manzini, da Fonsêca, et al., 2022). Após a impressão, os *scaffolds* foram reticulados em uma solução de cloreto de cálcio na concentração de 100 mmol.L^{-1} durante 10 minutos e armazenados em meio DMEM para os testes biológicos. Para os testes biológicos, 10^6 células/mL em meio DMEM foram semeadas sobre os *scaffolds* e deixadas em cultivo em placas de cultura de 12 poços a 37°C em um ambiente umidificado com 5% de CO_2 durante 3 dias. Após o cultivo celular nos *scaffolds*, foi realizada a microscopia ótica para ver o comportamento celular nos *scaffolds*.

Para a bioimpressão, foram impressos *scaffolds* com a biotinta de Alginato/CNC contendo 10^6 células/mL (preparada conforme o item 3.1.4), com 5 camadas, dimensão 8x8 mm com os mesmos equipamentos e parâmetros de processo descritos acima. Após a bioimpressão, os *scaffolds* foram reticulados em uma solução de cloreto de cálcio na concentração de 100 mmol.L^{-1} durante 10 minutos. Após a reticulação, os *scaffolds* foram deixados em cultivo com meio DMEM suplementado em placas de cultura de 24 poços a 37°C em um ambiente umidificado com 5% de CO_2 durante 3 dias.

3.1.7 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células NIH3T3 nos *scaffolds* impressos foram avaliadas qualitativamente usando o ensaio de viabilidade Live/Dead® que consiste em calceína-AM e homodímero de etídio - I. No dia 3 o meio celular foi aspirado dos poços e os *scaffolds* foram lavados com DPBS três vezes. As amostras foram protegidas da luz e incubadas com o Live/Dead por 45 min. Após lavagem múltipla com DPBS, o microscópio confocal de fluorescência (INFABIC-UNICAMP) foi utilizado para observar as células, as quais apresentavam fluorescência verde (excitação/emissão 488/515nm) identificadas segundo o protocolo do fabricante do kit como células vivas ou a fluorescência vermelha (570/602 nm) para identificar as células mortas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.1.8 Morfologia e adesão celular

As células NIH3T3 bioimpressas nos *scaffolds* foram coradas para F-actina e núcleos para observação ao microscópio confocal de fluorescência. As amostras foram fixadas com paraformaldeído 4% em DPBS por 10 min a temperatura ambiente, após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes com DPBS. Em seguida as amostras foram permeabilizadas e bloqueadas com uma solução contendo 3% de BSA, 0,8% de Triton em DPBS 1M por 1 hora em temperatura ambiente, após a permeabilização e bloqueio as amostras foram lavadas 3x com DPBS. Para marcação da F-actina, as amostras foram incubadas no escuro com e FITC-faloidina em DPBS na diluição de 1:40 e os núcleos das células foram co-corados com 40,6 diamidino-2 fenilindol (DAPI) em DPBS na diluição de 1:2000 por 30 min em temperatura ambiente. As imagens foram obtidas em um microscópio confocal de fluorescência do INFABIC nos comprimentos de onda 405 nm para o DAPI e 647 nm para a faloidina. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.2 Resultados e Discussão

3.2.1 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos géis do alginato, CNC e do sistema Alginato/CNC foi avaliada pelo teste MTT (Figura 3.1), onde os géis foram dissolvidos em meio DMEM e expostos a uma camada de células de fibroblastos de camundongo de linhagem NIH3T3 e incubado por 12 horas, para os polímeros puros e 24, 48, 72 e 96 horas para o sistema Alginato/CNC. O MTT é uma substância de cor amarela que passa por um processo de redução, através da ação da enzima desidrogenase mitocondrial, resultando na formação de um composto púrpura chamado formazan. Esse teste permite avaliar a atividade mitocondrial, onde apenas as células metabolicamente ativas têm a capacidade de converter o sal amarelo MTT em cristais de formazan (Carvalho, 2019). Para o estudo em questão, foram selecionados fibroblastos, que são células do tecido conjuntivo. Essas células desempenham um papel fundamental na deposição, remodelação e organização

da matriz extracelular, especialmente durante o processo de cicatrização de feridas (Carvalho, 2019). Vale destacar que, ao avaliar a biocompatibilidade por meio de testes, incluindo citotoxicidade *in vitro*, foram seguidos os critérios estabelecidos pela norma ISO10993-5 (2009). Esses critérios foram baseados na viabilidade celular do grupo controle utilizado como referência.

- Amostra não citotóxica: viabilidade celular $> 90\%$;
- Amostra levemente citotóxica: viabilidade celular entre 60 e 90%;
- Amostra moderadamente citotóxica: viabilidade celular de 30 a 59%;
- Amostra severamente citotóxica: viabilidade celular $\leq 30\%$.

Após 12 horas, os resultados obtidos a partir do ensaio de citotoxicidade indicaram uma boa viabilidade celular ($> 90\%$) para todas as concentrações de alginato e CNC puro analisadas, confirmando assim a não citotoxicidade desses polímeros. Para as amostras contendo 1,5 e 2% (m/m) de alginato, é possível observar uma maior população celular. A concentração do alginato influencia no metabolismo da célula e difusão dos componentes necessários provenientes do meio de cultura. Bittencourt et al., (2019), estudaram a aplicação de géis de alginato cultivados com condrócitos para regeneração de cartilagem. No estudo, a concentração de 1,5% (m/m) de alginato obteve a melhor biocompatibilidade, tendo sido usada 1,0%, 1,2%, 1,5% e 2% (m/m). O mesmo comportamento foi observado para a amostra contendo 10% (m/m) de CNC. Já para o sistema Alginato/CNC, uma atividade não citotóxica pode ser observada e houve um aumento da população celular quando comparada com os polímeros puros. Também foi possível observar, que quando analisadas em tempos diferentes, houve um aumento da população celular para os tempos de 72 e 96 horas indicando assim uma proliferação celular. De acordo com Naseri et al. (2016), a incorporação de CNC (nanocristais de celulose) pode melhorar a adesão, disseminação e crescimento das células nos hidrogéis de alginato. Por outro lado, Pariente et al. (2002) destacam que a exposição direta das células aos biomateriais permite simular as interações celulares *in vivo*, tanto entre células transplantadas quanto com os biomateriais implantados, o que possibilita a avaliação dessas interações célula-biomaterial.

Esses resultados mostram que o sistema Alginato/CNC nas concentrações de 2% (m/m) para o alginato e 10% (m/m) para o CNC, é promissor para formulação de uma

biotinta para bioimpressão 3D e aplicações da Engenharia Tecidual por apresentarem biocompatibilidade adequada além da proliferação celular.

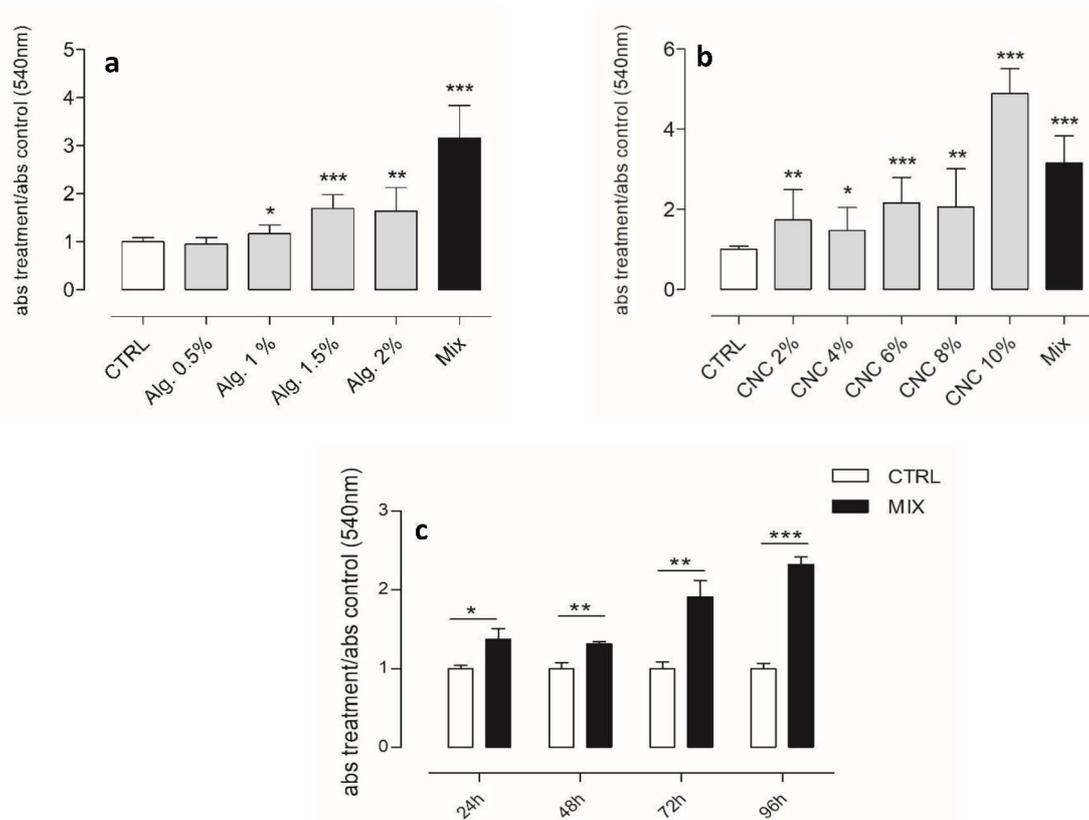


Figura 3.1: Porcentagem média da viabilidade de fibroblastos de camundongo (NIH3T3): (a) comparação entre o Alginato puro e Alginato/CNC (mix) para o tempo de 12 horas, (b) comparação entre o CNC puro e Alginato/CNC (mix) para o tempo de 12 horas e (c) Alginato/CNC nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. (N = 3; os dados mostram diferenças significativas; Anova: $p < 0,05$ com (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

3.2.3 Preparo e caracterização reológica da biotinta

Como não houve atividade citotóxica para o gel de Alginato/CNC (2% alginato e 10% CNC em massa), uma biotinta foi obtida na proporção 1:10 (0,2 mL de suspensão celular e 1,8 mL do gel de alginato/CNC), onde a densidade celular final na biotinta foi de 10^6 células/mL. Após a formulação da biotinta, testes reológicos foram realizados com

objetivo de comparar a viscosidade (Figura 3.2a) e módulos elástico (G') e de perda (G'') (Figura 3.2b) da tinta e da biotinta para avaliar o efeito da adição de células no comportamento reológico da biotinta. Os resultados reológicos foram comparados com de Pinto Junior et al., 2019 e pode-se observar que houve um decréscimo da viscosidade da biotinta em comparação com a da tinta, mantendo comportamento pseudoplástico similar. Quanto aos resultados dos módulos elástico (G') e de perda (G''), ambos sistemas apresentaram um comportamento viscoelástico do tipo sólido, comportamento esse importante para o processo de impressão, que evita o colapso da estrutura bioimpressa. Porém, pode-se observar que a presença de células acarretou diminuição de ambos os módulos.

Como as características de pseudoplasticidade e comportamento do tipo sólido foram mantidas na biotinta, pode-se considerar que a densidade celular de 10^6 células/mL no gel de Alginato/CNC não afetaram fortemente esses comportamentos, pode-se considerar que essa biotinta é promissora para uso da bioimpressão 3D de *scaffolds*.

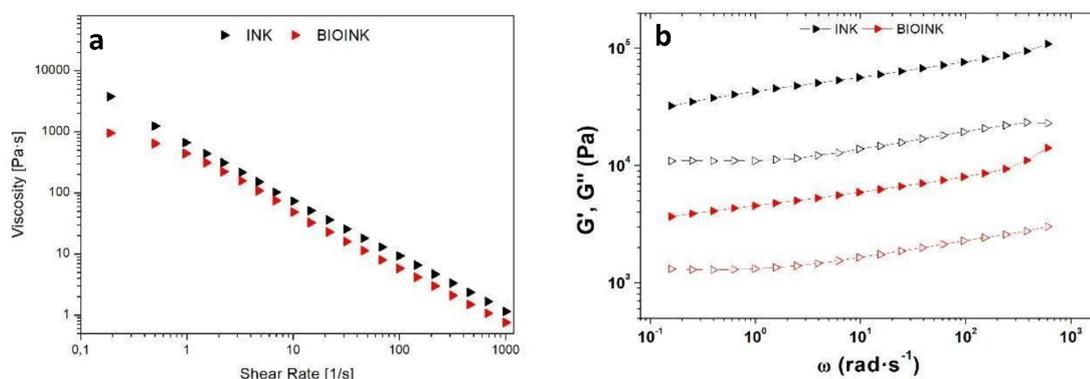


Figura 3.2: (a) Curvas de viscosidade como função da taxa de cisalhamento da tinta e biotinta e (b) Comportamento viscoelástico, módulo elástico (G') (símbolos fechados) e módulo de perda (G'') (símbolos abertos) da tinta e biotinta.

3.2.4 Avaliação da viabilidade celular

Após os estudos de citotoxicidade, observou-se que não houve efeito tóxico para as células NIH3T3 na presença do sistema Alginato/CNC (2% alginato e 10% CNC em

massa). Com isso, estudou-se o comportamento das células semeadas sobre os *scaffolds*. Foram impressos *scaffolds* de 10 camadas e dimensões 20x20 mm (Fig. 3.3) e cultivadas com células NIH3T3 durante 3 dias em estufa à 37 °C e 5% de CO₂.

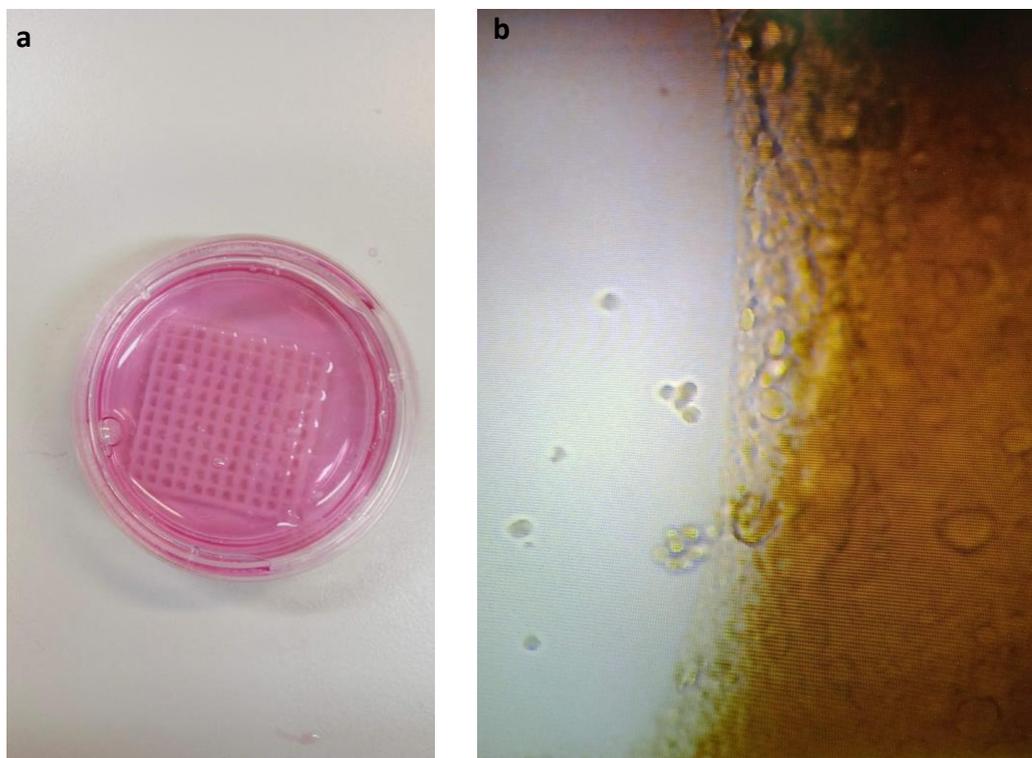


Figura 3.3: (a) *Scaffold* impresso, (b) Imagem do microscópio ótico, *scaffold* de Alginato/CNC em cultura com NIHT3T por 3 dias.

Após 3 dias de cultivo foi realizada a microscopia ótica do *scaffold*. Foi possível observar algumas células em suspensão e na borda do filamento. Já na superfície do *scaffold* não foi possível afirmar que existem células, pois o formato arredondado dos poros é muito parecido com o formato dos fibroblastos quando não aderido, também não foi possível confirmar a adesão dos fibroblastos. Os fibroblastos quando aderidos possuem um formato alongado. Para confirmar se existem células saudáveis na superfície e dentro dos filamentos dos *scaffolds*, o teste Live/Dead foi realizado para indicar qualitativamente a viabilidade das células. Uma vez que a difusão de nutrientes no *scaffold* é um desafio significativo (Melo, 2019), optamos por usar microscopia confocal de fluorescência para determinar a viabilidade celular nos *scaffold* utilizados. Os resultados do ensaio Live/Dead são mostrados na Figura 3.4.

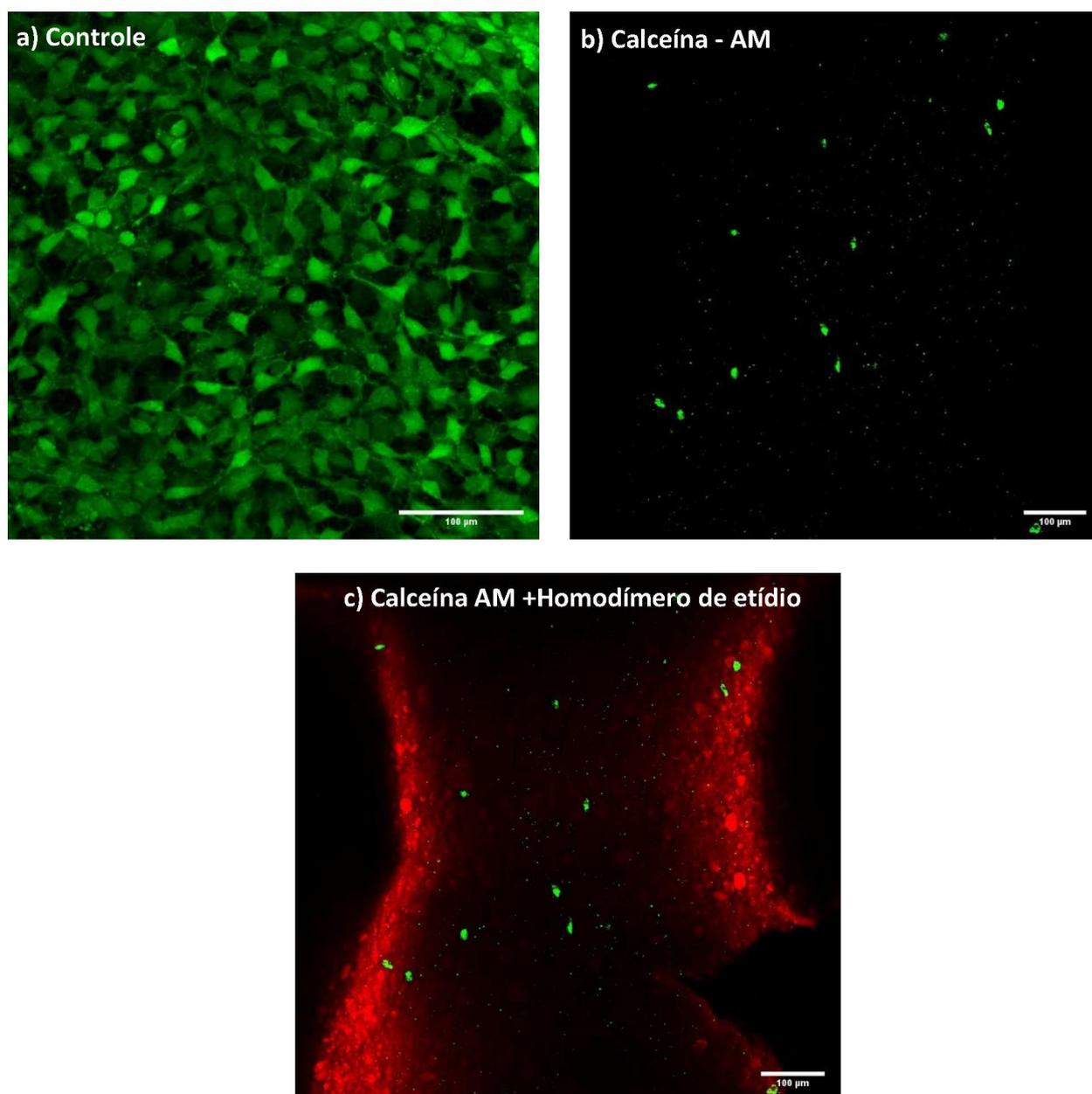


Figura 3.4: Microscopia confocal de fluorescência para as células NIH3T3 semeadas sobre o *scaffold* e coradas com calceína - AM e homodímero de etídio - I após 3 dias de cultura. (a) controle; (b) as células vivas em verde, (c) as células mortas em vermelho, (d) sobreposição. Barras de escala a 100 µm. Magnificação 40x.

Após 3 dias de cultivo, foi realizado o ensaio de viabilidade utilizando o kit Live/Dead nos *scaffolds*. Esse kit é composto por calceína-AM, um marcador celular derivado da fluoresceína. Esse marcador tem a capacidade de se acumular no interior das células vivas que possuem membranas intactas, resultando na emissão de fluorescência

pelas células. Por outro lado, o homodímero de etídio-I é internalizado pelas células mortas que apresentam membranas danificadas. Esse marcador sofre um aumento de 40 vezes em sua fluorescência quando se liga ao DNA presente nas células mortas. (Melo, 2019). Nas imagens de microscopia confocal de fluorescência é possível observar células vivas em verde e células mortas em vermelho, entretanto não foi possível confirmar que a coloração em vermelho eram células mortas, pois percebeu-se que o homodímero de etídio – I corou fracamente o *scaffold*. Esse problema pode estar relacionado com a lavagem do *scaffold* após a marcação com o kit Live/Dead que pode não ter sido suficiente para remover o excesso do marcador.

Os resultados comprovam que foi possível identificar células NIH3T3 saudáveis nos *scaffolds* do sistema Alginato/CNC após 3 dias de cultivo, sendo assim um sistema promissor para aplicação em engenharia tecidual.

3.2.5 Morfologia e adesão celular

A morfologia e adesão das células NIH3T3 nos *scaffolds* bioimpressos do sistema alginato CNC foi realizada através da microscopia confocal de fluorescência. A coloração em azul mostra o núcleo corado com DAPI e a coloração em magenta mostra as fibras de actina corado com faloidina. É possível observar que as células estão aderidas e espalhadas pela superfície do *scaffold*. Na imagem tridimensional (Fig. 3.5) foi possível observar que as células estão conectadas por prolongamentos celulares contendo filamentos de actina, sugerindo a formação de junções aderentes. Nota-se que os fibroblastos mantiveram sua morfologia alongada preservada independente do processo de bioimpressão 3D.

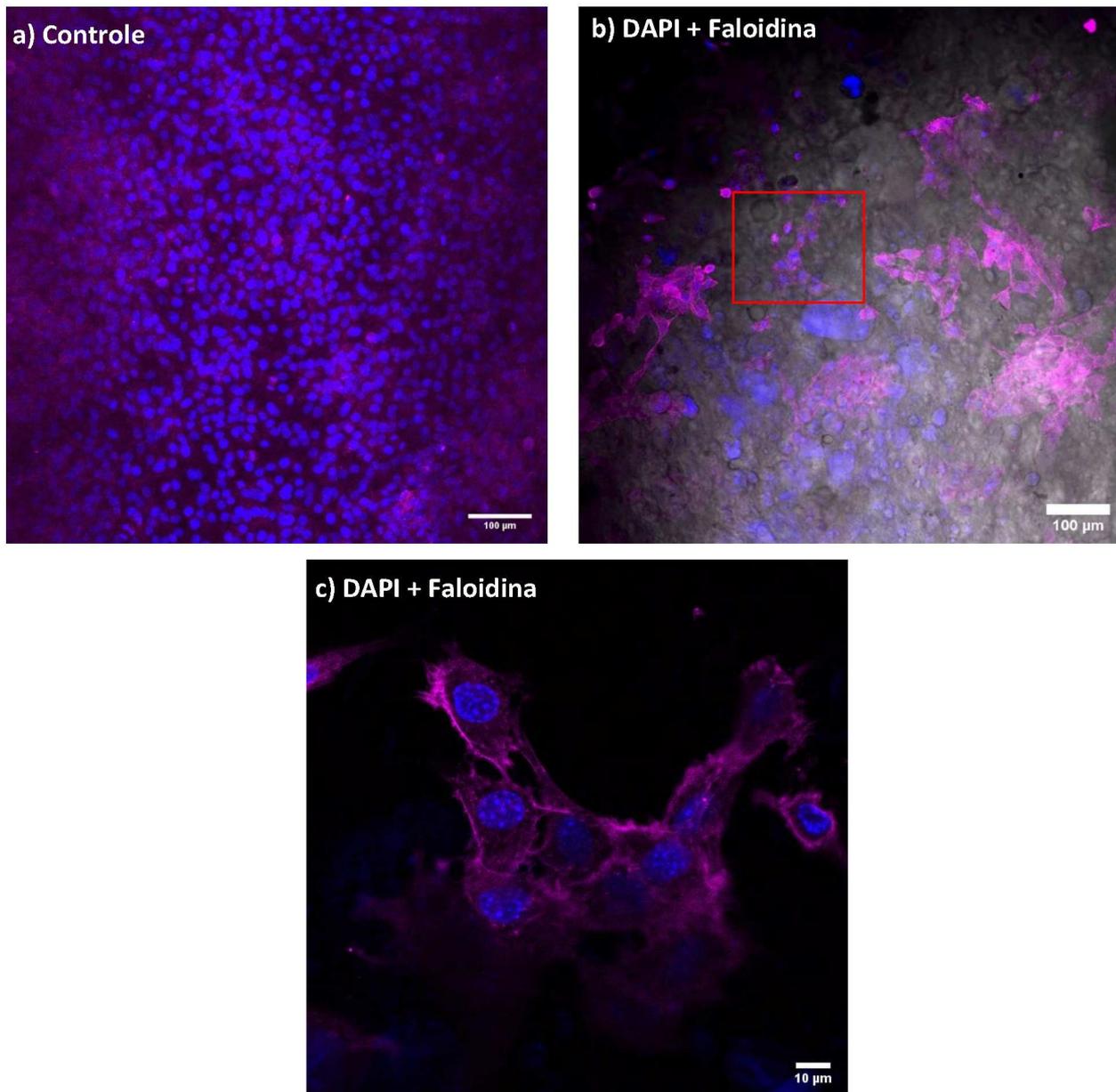


Figura 3.5: Marcação com DAPI/faloidina após 3 dias de cultura dos *scaffolds* em células do tipo NIH3T3. (a) grupo de controle NIH3T3, (b) marcação nuclear DAPI (azul), (c) F-actina marcada com faloidina (magenta) e (d) imagem fluorescente sobreposta de componentes celulares imunocorados (mesclados). Barras de escala: 100 μm para (a, b) e 10 μm para (c). Ampliação 40x.

3.3 Conclusões

Testes *in vitro* permitiram avaliar a viabilidade celular de fibroblastos de camundongo do tipo NIH3T3 em géis de alginato, CNC e do sistema alginato/CNC. Todas as concentrações de alginato e CNC analisadas demonstraram baixa citotoxicidade, entretanto, as concentrações de 1,5 e 2% (m/m) de alginato e 10% (m/m) de CNC obtiveram os melhores resultados demonstrando uma proliferação celular após 12h de cultivo celular. O sistema Alginato/CNC também demonstrou ter baixa citotoxicidade e foi possível observar uma proliferação celular maior após o período de 96h. Portanto, maiores concentrações de alginato e CNC contribuem para uma maior biocompatibilidade e viabilidade celular para células do tipo NIH3T3. Testes reológicos mostraram que a densidade celular de 10^6 células/mL não altera as propriedades reológicas da biotinta. Células do tipo NIH3T3 foram semeadas sobre *scaffolds* e marcadas com live/dead para se avaliar a viabilidade celular. Micrografias confocais de fluorescência demonstraram células viáveis nos *scaffolds* após 3 dias de cultura. Finalmente, a bioimpressão foi realizada e marcações com DAPI e faloidina demonstraram células viáveis e aderidas nos *scaffolds* após 3 dias de cultura. Com isso, o sistema alginato/CNC demonstrou ter baixa citotoxicidade, boa viabilidade celular sendo um candidato promissor para impressão/bioimpressão 3D de *scaffolds* para aplicações na engenharia tecidual.

4 IMPRESSÃO 3D DE SCAFFOLDS MULTICAMADAS DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA INCORPORADO COMO POTENCIAL TRATAMENTO TÓPICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

*Neste capítulo, a impressão por extrusão de hidrogéis nanocompósitos do sistema alginato/CNC/quitosana, alginato/CNC/colágeno com óleo essencial de melaleuca (TTO) incorporado, foi avaliada para a obtenção de scaffolds com 2 regiões distintas, visando estudar o potencial uso no tratamento tópico da leishmaniose cutânea. Esse trabalho foi desenvolvido durante o doutorado sanduíche na escola de farmácia da Queens University at Belfast no Reino Unido, sob a supervisão do Professor Dimitrios Lamprou. Testes reológicos foram conduzidos variando-se as concentrações de CNC para o sistema alginato/CNC/colágeno e quitosana para o sistema alginato/CNC/quitosana, para obtenção de tintas com boa capacidade de impressão. As tintas identificadas como adequadas para impressão foram avaliadas em função do perfil de viscosidade, ponto de escoamento, comportamento viscoelástico linear, recuperação da viscosidade. Foi também avaliada a capacidade de impressão de scaffolds variando a pressão de extrusão. As tintas contendo 2% (m/m) de alginato, 8% (m/m) de CNC e 0,75% (m/m) de quitosana e 2% (m/m) de alginato, 6% (m/m) de CNC e 0.5% (m/m) de colágeno exibiram comportamentos reológicos adequados para o processo de impressão 3D baseado em extrusão e boa capacidade de impressão na pressão de 19 PSI e entre 13 e 16 PSI respectivamente. As caracterizações química e térmica comprovaram a incorporação do TTO. Por fim, a atividade leishmanicida do TTO puro e incorporados nos scaffolds foi avaliada para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Para ambas as culturas de parasitas o TTO demonstrou ter boa atividade leishmanicida. Portanto, os scaffolds de hidrogéis nanocompósitos incorporados com TTO, aliado ao processo de impressão 3D baseado em extrusão, demonstraram ter grande potencial para o desenvolvimento de um tratamento tópico para leishmaniose cutânea.*

4.1 Material e Métodos

4.1.1 Material

Alginato de sódio de média viscosidade de algas marrons (peso molecular entre 80.000 e 120.000 g/mol), quitosana de baixo peso molecular, colágeno de tendão de Aquiles bovino, ácido acético, Tween® 80 e solução de íons cálcio 0,1M, foram adquiridos da Sigma–Aldrich Corp., EUA. Os nanocristais de celulose, hidrolisados com ácido sulfúrico de polpa de madeira, foram adquiridos da Cellulforce, Canadá. De acordo com o fornecedor, a largura e o comprimento das partículas do tipo haste CNC são 5 a 20 nm e 150 a 200 nm, respectivamente. O óleo essencial de Melaleuca (*Tea Tree oil* (TTO)) foi adquirido de Alva, Wallenhorst, Alemanha. O TTO foi usado como obtido. As principais substâncias do óleo essencial são, α -tujeno (0,8%), terpinen-4-ol (44,7%), α -terpineol (3,0%), γ -terpineno (22,5%), 1,8-cineol (4,2%) e α -terpineno (9,7%) foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas GC/GC-MS (citar).

4.1.2 Preparação dos géis da primeira região: Alginato/CNC/Colágeno com óleo essencial de Melaleuca (*Tea Tree Oil*) incorporado

Para o preparo dos géis da primeira camada, 0,5% (m/m) de colágeno foi dissolvido em uma solução de ácido acético 0,5% (v/v) usando um agitador magnético a 400 rpm a 5°C por 4 horas. Após a dissolução completa do colágeno, 2, 4 e 6 % (m/m) de CNC foram adicionados e dispersos por 2 horas a 25°C. Finalmente, 2% (m/m) de alginato de sódio foi adicionado e disperso em vórtice por 1 hora. As amostras foram armazenadas por 12 horas antes dos testes reológicos e impressão 3D. Com os testes reológicos, foi possível selecionar a amostra com as melhores propriedades reológicas para impressão 3D e para incorporação do TTO.

Os géis com TTO incorporados foram preparados de acordo com a metodologia relatada por Deng et al., 2021, com algumas modificações: primeiro, uma emulsão foi

preparada adicionando 100, 50 e 25% mg/mL de TTO em uma solução contendo 0,5% (v/v) de ácido acético e 1% (v/v) de Tween 80 com um homogeneizador turrax a 5000 rpm por 10 minutos, seguido pela adição de 0,5% (m/m) de colágeno disperso com um agitador magnético a 400 rpm a 5°C por 4 horas. Após a dissolução completa do colágeno, a porcentagem de CNC com as melhores propriedades reológicas foi adicionada e dispersa por 1 hora a 25°C. Finalmente, 2% (m/m) de alginato de sódio foi adicionado e disperso em misturador de vórtice por 1 hora.

4.1.3 Preparação dos géis da segunda região: Alginato/CNC/Quitosana

Os géis foram preparados de acordo com a metodologia relatada por Sánchez-González et al., 2011, com algumas modificações: determinadas concentrações de quitosana foram dispersas em uma solução de ácido acético a 0,5% (v/v) usando um agitador magnético a 400 rpm por 2 horas a 25°C, seguido de a adição de 6% (m/m) de CNC com dispersão por 2 horas a 25 °C. Em seguida, 2% (m/m) de alginato de sódio foi adicionado e dissolvido usando um agitador de vórtice por 1 hora. A concentração total de alginato e CNC na solução foi mantida em 2 e 10% (m/m), respectivamente, e a concentração de quitosana foi variada de 0,1 a 1% (m/m). As concentrações utilizadas neste trabalho são apresentadas na Tabela 4.1. As amostras foram armazenadas por 12 horas antes dos testes reológicos e impressão 3D.

Tabela 4.1: Concentrações dos géis de Alginato/CNC/Quitosana.

Géis de Alginato/CNC/Quitosana		
Alginato (% m/m)	CNC (% m/m)	Quitosana (% m/m)
2	8	0.1
2	8	0.25
2	8	0.5
2	8	0.75
2	8	1

4.1.4 Caracterização Reológica

As análises reológicas foram conduzidas utilizando um reômetro HAAKE MARS 40. Para esses testes, utilizou-se uma geometria de placas paralelas (C35/2°) com um diâmetro de 35 mm e uma distância entre as placas de 1 mm. Os testes de viscosidade de cisalhamento em estado estacionário foram realizados na faixa de 0,01 a 1000 s⁻¹. Já os testes de varredura de amplitude foram conduzidos a uma frequência angular de 10 rad.s⁻¹, com a deformação variando de 0,01 a 100%, para obter a faixa de viscoelasticidade linear (LVE). A deformação $\gamma_0 = 1\%$ foi adotada para todas as amostras, e o ponto de fluxo foi determinado para as amostras com comportamento sólido (onde $G' > G''$). Esse ponto é definido pelo cruzamento dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G''). Adicionalmente, foram realizados testes de varredura de frequência para suspensões na faixa de 0,1 a 240 rad.s⁻¹. A recuperação da estrutura após uma taxa de cisalhamento também foi avaliada por meio de testes de recuperação de viscosidade (Souto et al., 2019). Para simular as condições de impressão 3D, esse teste foi realizado em três etapas: no intervalo de descanso, uma taxa de cisalhamento baixa (1 s⁻¹) foi aplicada durante 25 segundos, seguida por uma taxa de cisalhamento alta e constante (500 s⁻¹) a partir de 50 segundos. O intervalo de regeneração foi conduzido com uma taxa de cisalhamento de 1 s⁻¹ durante 250 segundos. Todas as caracterizações reológicas foram realizadas em triplicata.

4.1.5 Impressão 3D e Capacidade de impressão

A impressão 3D foi realizada utilizando a impressora Allevi I, (Allevi, Filadélfia, EUA). Para gerar os caminhos de impressão, foram utilizados arquivos de código G, os quais foram criados através do software Repetier-Host V2.1.3. A extrusão durante o processo de impressão foi feita com o auxílio de um bico cônico 22G de 25 mm de comprimento e 0,41 mm de diâmetro interno, fornecido pela Injex, Brasil. Antes da impressão, todas as amostras passaram por um processo de centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos em uma centrífuga Kasvi K14-4000, com o objetivo de eliminar bolhas de ar

presentes nos materiais. Esse procedimento de preparação foi essencial para garantir a qualidade da impressão e a integridade das amostras produzidas.

Para avaliar a adequação dos diferentes géis, testes de impressão foram realizados. Géis das duas camadas com diferentes viscosidades (na primeira camada variou-se a concentração de CNC e na segunda camada variou-se a concentração de quitosana) foram avaliados em diferentes pressões de extrusão. Foram impressos *scaffolds* com dimensões de 8x8 mm, altura da camada de 0,41 mm, 5 filamentos, velocidade de impressão de 5mm.s⁻¹ e 5 camadas. Os parâmetros de impressão dos *scaffolds* são apresentados na tabela 4.2.

Após a impressão, os géis da primeira camada (Alginato/CNC/Colágeno) com a melhor capacidade de impressão foram selecionados para incorporação do TTO. Para as caracterizações, os *scaffolds* foram impressos e reticulados com uma solução de cloreto de cálcio 100 mmol.L⁻¹ e deixados secar por 48 horas a 25°C.

Tabela 4.2: Parâmetros de impressão dos *scaffolds*.

Primeira região – Alginato/CNC/Colágeno					
Variação da concentração de CNC (m/m)	Distância entre filamentos (mm)	Altura de camada (mm)	Velocidade de impressão (mm.s ⁻¹)	Pressão de extrusão (PSI)	Número de camadas
2,4, 6, 8	0,41	0,41	5	4; 7; 10; 13; 16; 19; 22	5
Segunda região – Alginato/CNC/Quitosana					
Variação da concentração de quitosana (m/m)	Distância entre filamentos (mm)	Altura de camada (mm)	Velocidade de impressão (mm.s ⁻¹)	Pressão de extrusão (PSI)	Número de camadas
0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1	0,41	0,41	5	4; 7; 10; 13; 16; 19; 22	5

4.1.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos *scaffolds* usando FTIR foi realizada para identificar com precisão os compostos presentes nas amostras individuais. A análise foi realizada usando um espectrômetro de reflexão total atenuada (ATR)-FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet is50 FTIR com ATR integrado), em amostras sólidas. Os *scaffolds* foram analisados em uma atmosfera inerte em um comprimento de onda de 4000 a 600 cm em 64 varreduras com uma resolução de 4 cm e um intervalo de 1 cm. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.1.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada usando o Netzsch Autosampler (Wolverhampton, Reino Unido) usando painéis de alumínio padrão. As faixas de temperatura e taxas de aquecimento foram adaptadas para cada formulação de gel como segue; Alginato (A), CNC, Quitosana (CS), Colágeno (COL), 2A-8CNC-0,5COL e 2A-8CNC-0,5CS: -30 °C a 250 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min; 2A-8CNC-0.5COL com 5% de TTO incorporado e TTO puro: -30 °C a 350 °C com taxa de aquecimento de 10 °C min. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.1.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As morfologias de superfície dos *scaffolds* impressos foram observadas usando uma microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada usando um microscópio eletrônico de varredura de mesa TM3030 (Hitachi, Japão). As amostras foram aderidas em discos de carbono adesivos duplos fixados em *stubs* de alumínio. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.1.9 Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de melaleuca (TTO)

Cultivo de parasitas

Promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/1994/H3227), foram mantidos em cultura a 26°C em garrafas de cultura de 25 cm² em meio 199 (0393, Sigma Aldrich), suplementado com 1 mmol.L⁻¹ de L-glutamina, 0.1 mmol.L⁻¹ de adenina, 0.0005% de hemina, 40 mmol.L⁻¹ de HEPES e 10% de soro fetal bovino, com pH final 7.4. Para a manutenção das culturas de *L. braziliensis*, 10% de SFB e 2% de urina estéril foram adicionalmente suplementados. Repiques foram realizados a cada 4 dias para manter a cultura em fase logarítmica.

Cultivo das células hospedeiras

Macrófagos de linhagem RAW 264.7 foram mantidas em cultura a 37°C em atmosfera úmida e 5% CO₂ em garrafas de cultura de 25 cm² em meio RPMI-1640 (6504, Sigma Aldrich), suplementado com 1.2 mmol.L⁻¹ de piruvato de sódio, 2 mmol.L⁻¹ de L-glutamina, 40 mmol.L⁻¹ de HEPES e 10% de SFB, pH 7.4. Repiques foram realizados a cada 3 dias.

Testes de viabilidade

Para os ensaios de viabilidade e citotoxicidade celular, promastigotas (5x10⁶ células/poço) e macrófagos (4x10⁵ células/poço) foram incubados com concentrações decrescentes de TTO (10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 e 78 µg/mL) em placas de 96 poços (Nest) por 24 e 48 h, a 26°C e 37°C, respectivamente. O óleo foi diluído em meio de cultura com o auxílio de 1% (v/v) de etanol. Esfregaços foram obtidos ao fim do período de incubação para avaliação morfológica dos promastigotas a partir de 10 µL da cultura, que secaram em temperatura ambiente em lâmina para posterior fixação com metanol e coloração (kit Panótico Rápido, Laborclin) para observação microscópica.

Após o período de incubação, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, 5 mg/mL em PBS, Sigma Aldrich) foi adicionado para avaliar a atividade metabólica celular. A reação foi finalizada com a adição de SDS 20%. Densidades ópticas foram adquiridas após leitura de absorvância a 600 nm e 650 nm, como referência, em espectrofotômetro de placa. Para determinar concentrações efetiva (EC50) e citotóxica (CC50) para 50% das culturas, as densidades ópticas foram normalizadas a partir do controle não tratado (100% de viabilidade), e os valores de EC50 e CC50 foram obtidos a partir da regressão não-linear (inibidor vs. Resposta normalizada) pelo software GraphPad Prism 8.0 (Boston, USA).

Para avaliar o *scaffold* impregnado nas concentrações de 100; 50 e 25 mg/mL de TTO, 5×10^6 /poço de promastigotas foram incubados em placas de 24 poços na presença do *scaffold* por 24h. Após esse período, o *scaffold* foi removido e o ensaio com MTT foi conduzido conforme descrito anteriormente. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.2 Resultados e Discussão

4.2.1 Caracterização reológica dos géis de Alginato/CNC/Quitosana

Cisalhamento em regime permanente

As curvas de viscosidade em relação à taxa de cisalhamento para os géis de alginato puro, CNC puro, alginato/CNC e alginato/CNC/quitosana são ilustradas na Figura 4.1. Na Figura 4.1a, pode-se observar que todas as amostras apresentam um comportamento pseudoplástico, no qual a viscosidade aumenta com a adição de CNC e quitosana em baixas taxas de cisalhamento. Além disso, as amostras contendo apenas alginato exibem uma região de platô Newtoniano a baixas taxas de cisalhamento, característico de uma solução aquosa deste polissacarídeo. A adição progressiva de CNC e quitosana resulta em um aprimoramento do comportamento pseudoplástico, o que sugere a ocorrência de interações eletrostáticas entre os componentes. As hastes de CNC possuem uma grande área superficial e são hidrofílicas, e a incorporação de alginato favorece a formação de

pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila (OH^-) do CNC e os grupos carboxila (COO^-) do alginato (Figura 4.2b). Essas ligações são caracterizadas como uma reticulação física, um tipo de ligação fraca e reversível, o que pode explicar o aumento da viscosidade nos géis (Pinto Junior, 2019).

Já a adição da quitosana, promove o aumento da viscosidade e do comportamento pseudoplástico devido às interações eletrostáticas dos grupos amino catiônicos (NH_3^+) da quitosana com os grupos (COO^-) do alginato (Fig. 4.2a), também caracterizando uma reticulação física (Bhattarai et al., 2010; Xing et al., 2019). Enquanto isso, o CNC pode atuar como um agente de reticulação multifuncional para ligar fisicamente a matriz do alginato com a matriz da quitosana (Fig. 4.2a) (Lavoine et al., 2014). Além disso, as pontes de hidrogênio entre os CNCs também podem aumentar a possibilidade de emaranhamento físico adicional (Fig. 4.2c) deixando a rede tridimensional do gel mais densa promovendo também o aumento da viscosidade (Lindman et al., 2021).

Já na figura 4.1b variou-se a concentração de quitosana no gel de alginato/CNC/quitosana e pode-se observar que houve um aumento na viscosidade para as amostras contendo 0,25; 0,5 e 0,75% (m/m) quando comparadas com a amostra contendo 0,1% (m/m) de quitosana, aumento esse que pode estar associado as interações eletrostáticas do tipo dipolo-dipolo entre os grupos NH_3^+ da quitosana com os grupos COO^- do alginato (Fig. 4.2a). Entretanto, o mesmo não ocorre quando a curva contendo 1% (m/m) de quitosana é comparada com as demais concentrações, onde pode-se observar uma diminuição da viscosidade. Essa diminuição da viscosidade pode estar associada com a preferência das interações eletrostáticas entre as cadeias da quitosana com as cadeias do alginato reduzindo a interação entre as cadeias do alginato com o CNC, e por terem um caráter mais fraco (interações do tipo dipolo-dipolo são mais fracas quando comparadas com as pontes de hidrogênio) quando comparadas com as ligações de hidrogênio formadas entre o CNC e o alginato.

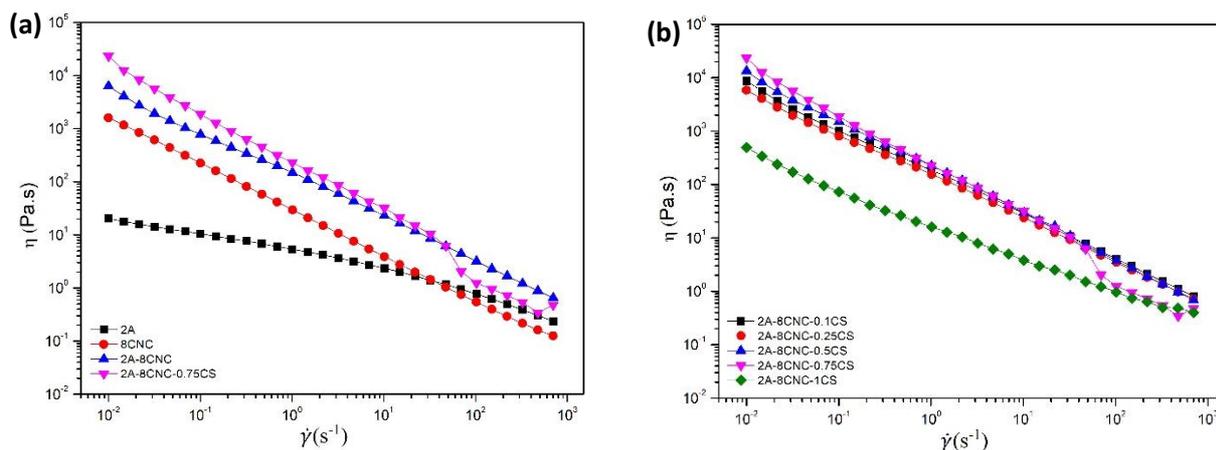


Figura 4.1: Viscosidade (η) como função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$): (a) géis de alginato puro, CNC puro, Alginato/CNC e Alginato/CNC/Quitossana (b) géis de Alginato/CNC/Quitossana com variação da concentração de quitossana.

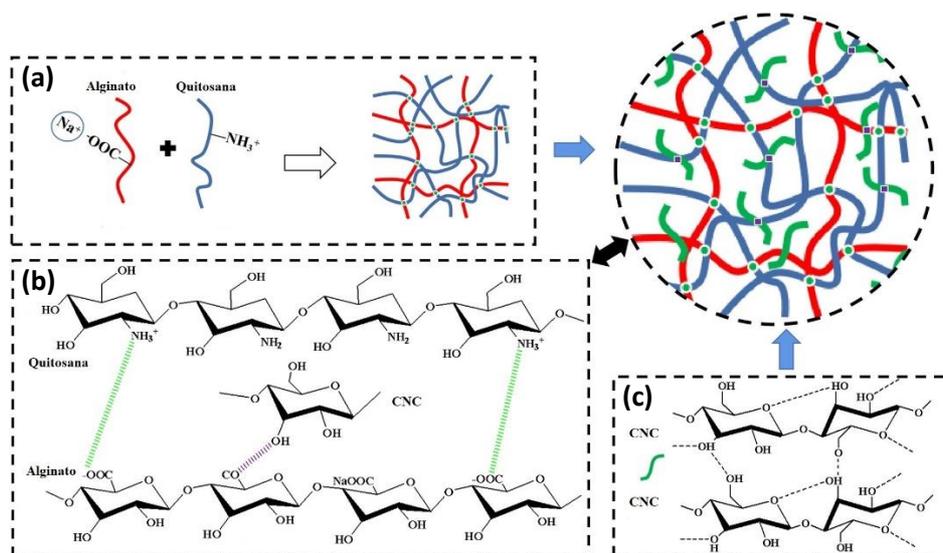


Figura 4.2: Esquema das interações envolvidas na síntese dos géis de Alginato/CNC/Quitossana: Interação do complexo polieletrólito entre alginato e quitossana (a), o mecanismo de formação de hidrogéis compostos Alginato/CNC/Quitossana (b) e pontes de hidrogênio entre CNC (c). Adaptada de (Deng et al., 2021).

Portanto, as interações eletrostáticas entre as cadeias dos polímeros do gel de alginato/CNC/quitossana promovem o aumento da viscosidade e do comportamento pseudoplástico, requisito esses importantes no processo de impressão 3D. Uma alta viscosidade impede a formação de gotículas de tensão superficial e o colapso do objeto impresso, já o comportamento pseudoplástico faz com o que o gel tenha alta viscosidade

em pequenas taxas de cisalhamento e baixa viscosidade em altas taxas de cisalhamento (Malda et al., 2013).

Cisalhamento oscilatório

Testes de cisalhamento oscilatório foram realizados para analisar as características de escoamento e viscoelásticas dos géis de alginato puro, CNC puro, alginato/CNC e do sistema alginato/CNC/quitosana e estão apresentados na Figura 4.3. Na Figura 4.3a, estão apresentados os resultados da varredura da amplitude a uma frequência angular constante de 10 rad^{-1} versus uma tensão variando de 0,1 a 100%. Pode-se observar que a solução de alginato possui um comportamento do tipo líquido ($G' < G''$) e que o ponto de escoamento ($G' = G''$) não é observado. Pelo contrário, quando se adiciona CNC e quitosana ao alginato, todos os géis possuem um comportamento do tipo sólido ($G' > G''$) e o ponto de escoamento é observado. Esse comportamento pode estar associado à reticulação física caracterizada pelas ligações de hidrogênio entre as hastes do CNC e as cadeias de alginato e as interações eletrostáticas dos grupos amino catiônico da quitosana com os grupos carboxil do alginato. Para o gel de alginato/CNC/quitosana contendo 1% (m/m) pode-se observar que houve um deslocamento do ponto de fluxo para uma menor taxa de deformação, comportamento esse que é corroborado pelos resultados da curva de viscosidade discutidos anteriormente (Figura 4.1b), como o gel possui uma viscosidade menor, uma menor taxa de deformação é necessária para que ocorra a transição do comportamento sólido para líquido do gel.

O ponto de escoamento é um parâmetro reológico muito importante para o processo de impressão 3D para se obter um gel com boa capacidade de impressão. Este ponto fornece um indicativo do início do escoamento no processo de impressão, que está associado à transição do comportamento do tipo sólido para o líquido ou viscoso (Malda et al., 2013).

Além disso, na Fig. 4.3b estão mostrados os resultados da varredura de frequência. A diferença de inclinação nas curvas G' ou G'' refletiu a compatibilidade entre os componentes dos géis, ilustrando que as partículas estavam bem dispersas (Gupta et al., 2017). É corroborado que a amostra de alginato se comporta como líquido em alta frequência. Por outro lado, as amostras contendo CNC e quitosana possuem um

comportamento do tipo sólido em toda a faixa analisada. Pode-se observar também, que a adição de quitosana e CNC acarretou o aumento de G' e G'' dos géis.

Este resultado mostrou que o comportamento viscoelástico foi fortemente influenciado pela adição de quitosana e CNC em géis alginato/CNC/quitosana. No presente estudo, o CNC atuou como um reticulador multifuncional, o emaranhamento físico resultante e a reticulação no sistema podem levar a um aumento de G' e G'' (Yang et al., 2017). Os resultados mostram que estas amostras podem ter propriedades adequadas para o processo de impressão 3D baseada em extrusão.

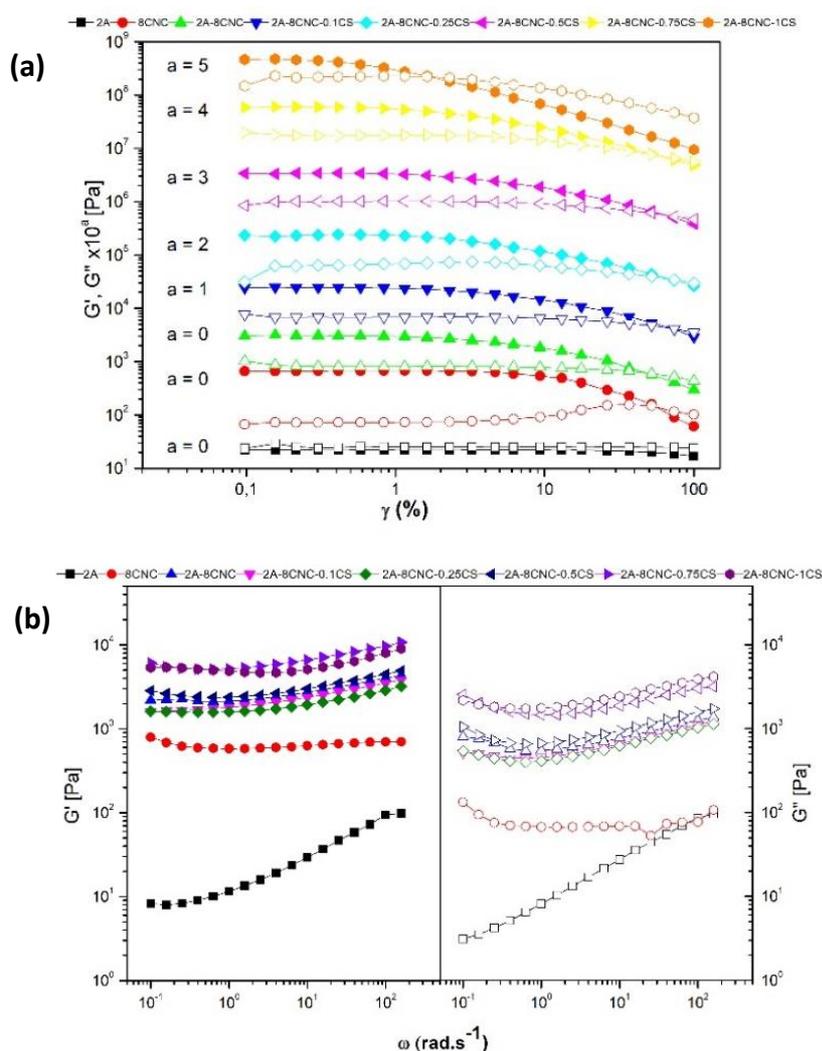


Figura 4.3: Módulo de armazenamento (G') (símbolos sólidos) e módulo de perda (G'') (símbolos abertos) em função de: (a) tensão (γ) e (b) frequência angular (ω). Géis de alginato, CNC, alginato/CNC e alginato/CNC/quitosana.

Recuperação de viscosidade

Para simular as condições de impressão 3D, o teste de recuperação de viscosidade (tixotropia) foi realizado em três intervalos (3ITT) foi realizado. Esse teste permite determinar a percentagem da viscosidade recuperada após o cisalhamento. Na Figura 4.4 estão apresentados os resultados da recuperação da viscosidade para os géis de alginato/CNC/quitosana variando a concentração de quitosana. Pode-se observar que os géis com concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5% (m/m) de quitosana precisam de um curto intervalo de tempo para recuperar a estrutura inicial. Quando o material flui através da ponta do bocal de impressão, as hastes de CNC, bem como as cadeias de alginato e quitosana, tendem a se alinhar na direção do fluxo. Esse alinhamento resulta em uma redução da viscosidade, conforme discutido nos resultados das curvas de viscosidade, e mantém-se constante durante o intervalo de alta taxa de cisalhamento. Quando a alta taxa de cisalhamento é interrompida, a recuperação da viscosidade ocorre quase instantaneamente, indicando uma regeneração rápida da estrutura do material. Esse comportamento é atribuído à reorganização das interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre as hastes de CNC, alginato e quitosana, que são fundamentais para a recuperação da viscosidade e da estrutura do gel (Pinto Junior, 2019). Já para as amostras contendo 0,75 e 1% (m/m) de quitosana ocorre uma recuperação parcial da viscosidade, o que pode estar associado a um maior tempo de recuperação das estruturas das cadeias dos polímeros do sistema, devido a um maior emaranhamento físico promovido pelas interações eletrostáticas dos grupos funcionais dos polímeros do sistema e/ou pelo fato da quebra das ligações serem irreversíveis.

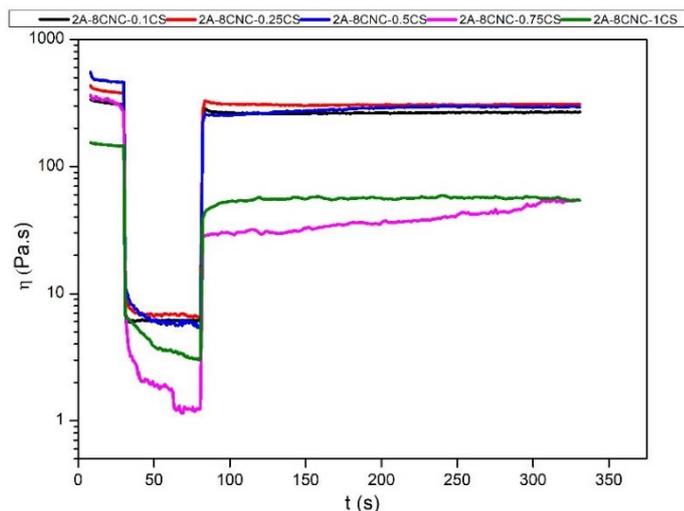


Figura 4.4: Viscosidade (η) em função do tempo (t) para o teste de recuperação para os géis de Alginato/CNC/Quitosana.

A recuperação da viscosidade foi de cerca de 70% após 50s para os géis contendo 0,1; 0,25 e 0,5% (m/m) de quitosana, 11% para os géis com 0,75% (m/m) e 26% para os géis com 1% de quitosana. Após 250 s a recuperação da viscosidade para os géis contendo 0,1; 0,25 e 0,5% (m/m) de quitosana foi de 100%, 19% para os géis com 0,75% (m/m) e 37% para os géis com 1% (m/m). Essa rápida capacidade de reconstruir a estrutura é vantajosa para aumentar a estabilidade do objeto impresso, contribuindo para melhorar a qualidade da impressão. Segundo Peak et al. (2018), uma recuperação inicial de 80% da viscosidade é considerada significativa para a impressão 3D.

4.2.2 Caracterização reológica dos géis de Alginato/CNC/Colágeno

Cisalhamento em regime permanente

A caracterização reológica dos géis de alginato/colágeno e alginato/CNC/colágeno foi realizada e os resultados estão apresentados na Figura 4.5, na qual a concentração de CNC foi variada e a viscosidade em função da taxa de cisalhamento foi medida. Todos os sistemas exibiram um comportamento pseudoplástico, entretanto, as amostras contendo CNC apresentaram um comportamento mais acentuado, principalmente nas

amostras com 4 e 6% (m/m) de CNC. Essa diferença pode ser atribuída às interações eletrostáticas entre as hastes de CNC e as cadeias de alginato, como discutido na seção 4.2.1. Durante a produção de nanocristais de celulose, o ácido sulfúrico é frequentemente utilizado como agente hidrolisante, resultando na introdução de grupos ácidos carregados negativamente. Isso promove a dispersão homogênea e a estabilização eletrostática das partículas de CNC no gel. Para concentrações mais baixas de CNC, o comportamento pseudoplástico é induzido tanto pelo alinhamento das estruturas de cristal líquido em baixas taxas de cisalhamento quanto pelo alinhamento das hastes de CNC em altas taxas de cisalhamento. Em contraste, para concentrações mais altas de CNC, o comportamento pseudoplástico é atribuído à destruição dos agregados causada pelo cisalhamento aplicado. Por outro lado, nas amostras contendo apenas Alginato/Colágeno, foi observado um platô Newtoniano em baixas taxas de cisalhamento, um comportamento característico e esperado para soluções poliméricas.

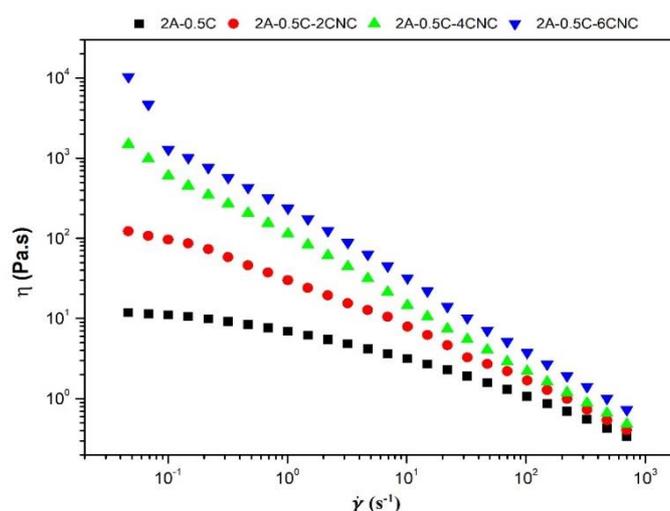


Figura 4.5: Viscosidade (η) como função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) para os géis de alginato/colágeno e alginato/CNC/colágeno, variando-se a concentração de CNC.

Cisalhamento oscilatório

Foram realizados testes de cisalhamento oscilatório para avaliar comportamento viscoelástico linear dos géis de alginato/Colágeno e alginato/CNC/colágeno. Na Figura 4.6a, os resultados da varredura de amplitude de deformação são apresentados. Em uma frequência angular constante de 10 rad^{-1} , o gel de alginato/colágeno apresenta um

comportamento do tipo líquido, o que também é observado no gel contendo 2% (m/m) de CNC. Por outro lado, nas concentrações de 4% e 6% (m/m) de CNC, o comportamento é do tipo sólido, devido à formação de reticulações físicas entre as hastes de CNC e as cadeias de alginato. Nessas concentrações, o ponto de fluxo é claramente identificado. Na Figura 4.6b, os resultados da varredura de frequência são apresentados, reforçando que a amostra de alginato/colágeno, em sua maior parte, se comporta como um líquido, mas apresenta uma transição para o comportamento sólido no ponto de cruzamento. Esse comportamento pode ser atribuído às cadeias mais longas de alginato, que não conseguem se desemaranhar completamente em altas frequências (Yu et al., 2014).

A amostra contendo 2% de CNC exibe um comportamento sólido em baixas frequências, enquanto as amostras com 4% e 6% de CNC apresentam comportamento sólido em toda a faixa de frequência analisada. Essas amostras têm potencial para serem consideradas boas candidatas para impressão 3D, devido à sua capacidade de comportamento sólido e estabilidade estrutural.

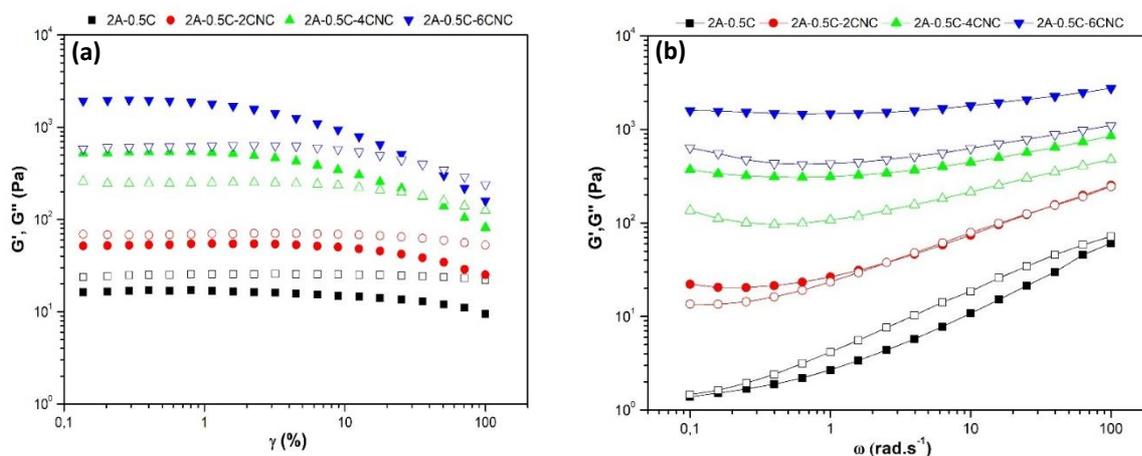


Figura 4.6: Módulo de armazenamento (G') (símbolos sólidos) e módulo de perda (G'') (símbolos abertos) em função de: (a) tensão (γ) e (b) frequência angular (ω). Géis de alginato/CNC/colágeno

Recuperação de viscosidade

Na Figura 4.7 estão apresentados os resultados da recuperação da viscosidade para os géis de alginato/CNC/colágeno variando a concentração de CNC. Em geral, a adição

de CNC tende a melhorar a recuperação da viscosidade dos géis de alginato, provavelmente devido à formação de ligações físicas entre as hastes de CNC e as cadeias de alginato. Pode-se observar que houve uma rápida recuperação da viscosidade para todas as concentrações analisadas, o que está associado a uma rápida regeneração da estrutura formada entre as hastes do CNC e as cadeias do alginato. Para o gel contendo apenas Alginato/Colágeno a recuperação da viscosidade após 50 s foi de 64%, já quando adicionamos o CNC a recuperação da viscosidade foi de 50, 41 e 76% para as concentrações de 2, 4 e 6% (m/m) de CNC respectivamente. Pode-se observar que só houve uma melhora na recuperação da viscosidade no gel contendo 6% (m/m) de CNC. Após 250 s a recuperação da viscosidade para os géis de Alginato/Colágeno e do gel com 2% de CNC foi de 89%, já para os géis com 4 e 6% de CNC foi 75 e 65% respectivamente.

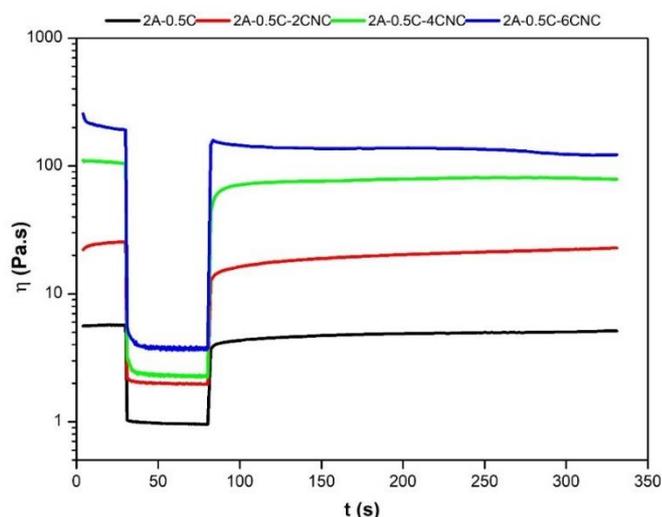


Figura 4.7: Viscosidade (η) em função do tempo (t) para o teste de recuperação para os géis de Alginato/CNC/Colágeno.

4.2.3 Impressão 3D e Capacidade de impressão

Após os estudos reológicos, a capacidade de impressão foi avaliada através da impressão 3D de *scaffolds* dos géis da primeira e segunda camada variando-se a pressão de extrusão. Na figura 4.8 estão apresentados os resultados da capacidade de impressão para os géis de alginato/CNC/quitosana, onde a concentração de quitosana foi variada.

Pode-se observar que a pressão de extrusão e a concentração de quitosana influenciam na capacidade de impressão. A concentração da quitosana influencia diretamente na viscosidade dos géis, discutidos na seção 4.3.1. Géis com uma maior viscosidade necessitam de uma maior pressão de extrusão. Entretanto, os géis com alta viscosidade quando impressos em baixas pressões de extrusão não possuem boa capacidade de impressão. Isso ocorre devido a não formação do filamento contínuo, a velocidade de impressão é maior que a pressão de extrusão, com isso o filamento se rompe comprometendo a qualidade dos *scaffolds* (Junior et al., 2019). Também pode-se observar que o gel contendo 0,75% (m/m) de quitosana na pressão de 19 PSI teve a melhor capacidade de impressão mesmo tendo uma recuperação de viscosidade inferior ao gel de 0,5%.

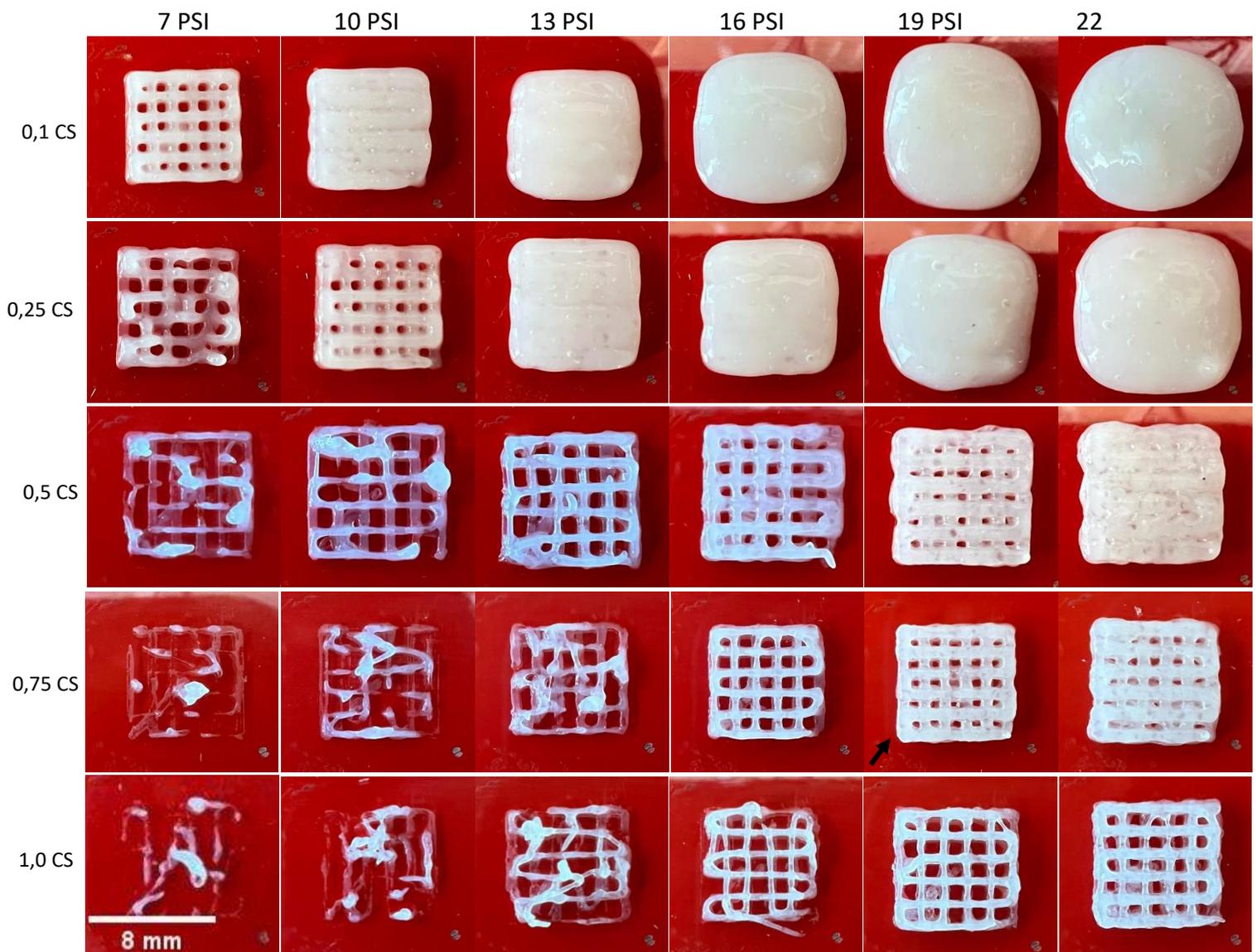


Figura 4.8: Avaliação da capacidade de impressão dos géis de Alginato/CNC/Quitosana em diferentes pressões de extrusão. A seta em preto indica o *scaffolds* com melhor capacidade de impressão.

Na figura 4.9 são apresentados os resultados da capacidade de impressão para os géis de alginato/CNC/colágeno, onde a concentração de CNC foi variada. Pode-se observar que para o gel contendo alginato/colágeno não foi possível realizar a impressão. Isso ocorre devido ao fato de o gel não atender as características reológicas adequadas para o processo de impressão por extrusão. Nessa concentração o gel tem o comportamento do tipo líquido predominante em toda faixa de tensão analisada e uma baixa viscosidade, isso faz com que o gel escoe pelo bico de impressão sem que haja uma pressão de extrusão, com isso ocorre a formação de gotas e não do filamento contínuo, requisito esse importante para o processo de impressão. Quando adicionamos 2% (m/m) de CNC ao gel de alginato e colágeno, pode-se observar que não ocorre o escoamento do gel pelo bico de impressão. Isso ocorre devido ao aumento da viscosidade promovido pela adição do CNC. Entretanto, ao realizar a impressão observa-se que não ocorre a formação de um filamento bem definido e que a estrutura entra em colapso logo após a impressão, resultado esse que está relacionado ao comportamento também ser do tipo líquido e da baixa recuperação da viscosidade. Já para o gel contendo 4% (m/m) de CNC, o comportamento é do tipo sólido, entretanto, a baixa viscosidade faz com que o gel não tenha uma boa capacidade de impressão mesmo em baixas pressões de extrusão. Por fim, o gel contendo 6% (m/m) de CNC não apresenta boa capacidade de impressão em baixas pressões de extrusão devido à sua alta viscosidade, porém, nas pressões de 13 e 16 PSI apresenta boa capacidade de impressão devido ao seu comportamento pseudoplástico acentuado, comportamento do tipo sólido e uma rápida recuperação da viscosidade. Resultados esses que corroboram com os resultados da caracterização reológica.

É evidente que a adição de CNC melhora a capacidade de impressão dos géis de Alginato/Colágeno, que está diretamente relacionada com as propriedades reológicas como viscosidade, comportamentos pseudoplástico e viscoelástico e da recuperação da viscosidade. Esses resultados mostram como os estudos reológicos pré-impressão podem ser importantes para se alcançar um gel com boa capacidade de impressão.

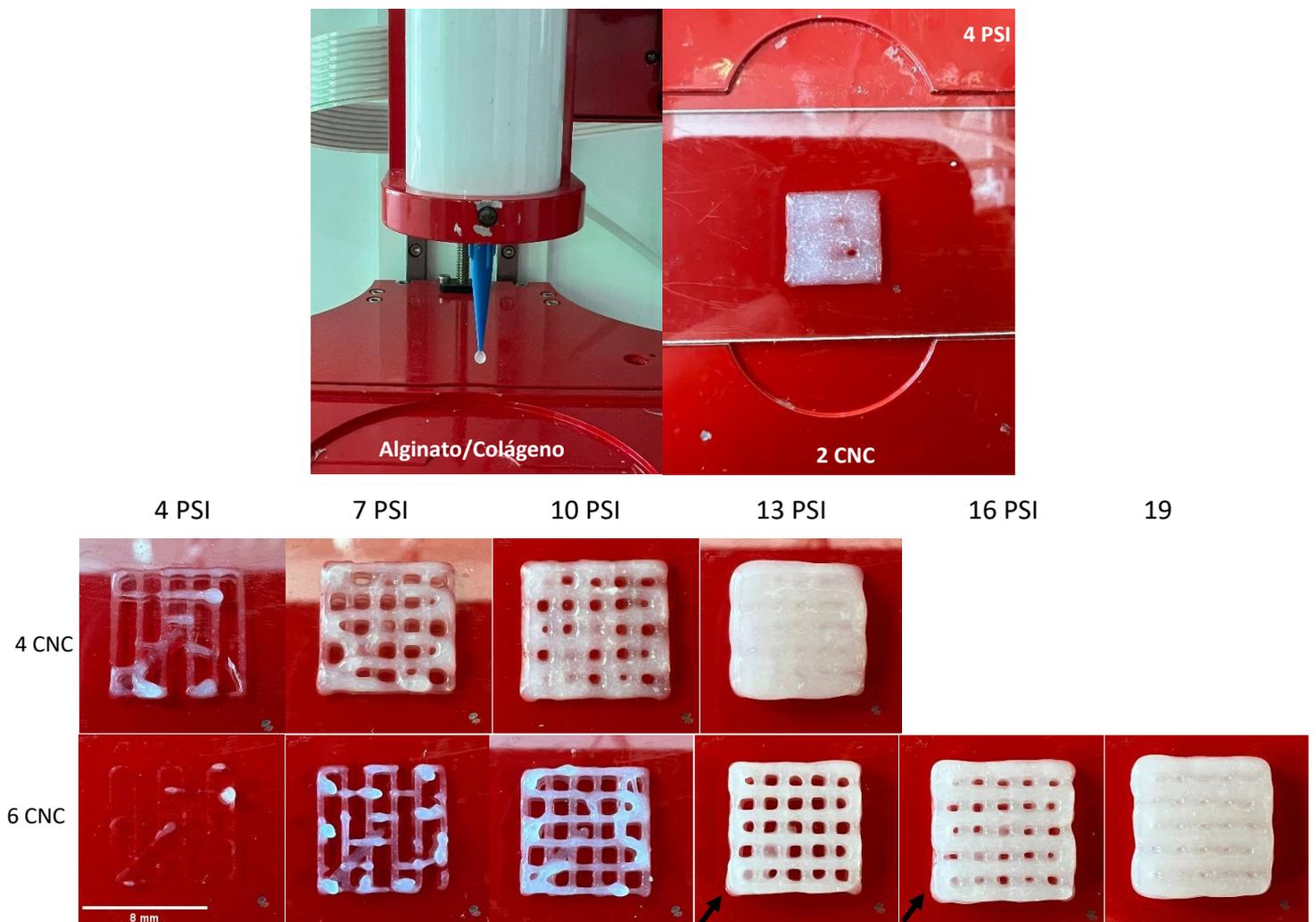


Figura 4.9: Avaliação da capacidade de impressão dos géis de Alginato/CNC/Colágeno em diferentes pressões de extrusão. As setas em preto indicam os *scaffolds* com melhores capacidade de impressão.

Após os estudos da caracterização reológica e da capacidade de impressão, os géis que obtiveram os melhores resultados para o processo de impressão baseado em extrusão foram os sistemas contendo: 2% (m/m) de alginato, 8 % (m/m) de CNC e 0,75% (m/m) de quitosana para o gel da segunda camada e 2% (m/m) de alginato, 6% (m/m) de CNC

e 0.5% (m/m) de colágeno para o gel da primeira camada. Para o gel da primeira camada (alginato/CNC/colágeno) será feita a incorporação do óleo essencial de melaleuca e em seguida ambos os géis das duas camadas serão caracterizados química, térmica e morfológicamente. Os géis foram reticulados em solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 100 mmol.L^{-1} por 10 minutos antes das caracterizações.

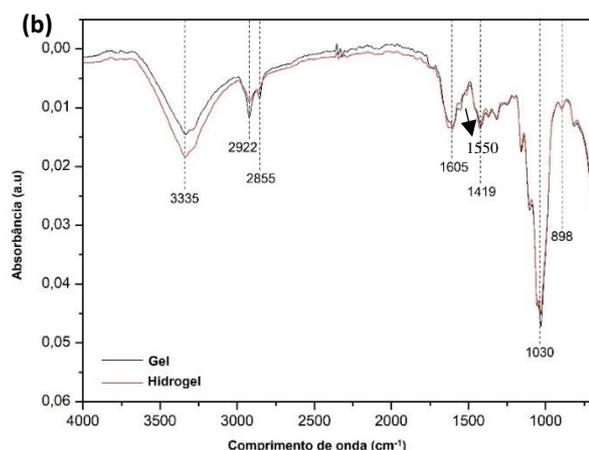
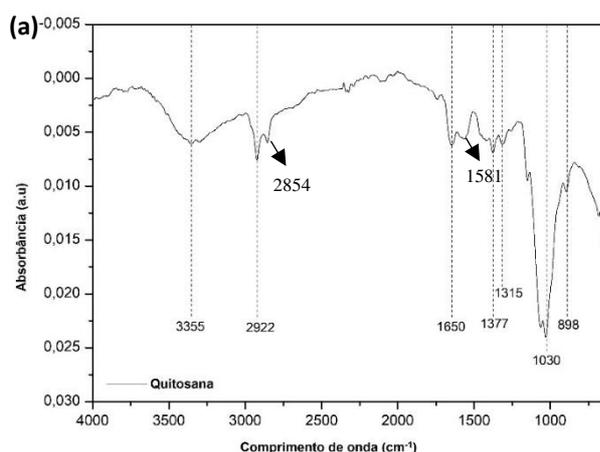
4.2.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho (FT-IR) dos polímeros puros e dos géis e hidrogéis reticulados da segunda camada (alginato/CNC/quitosana) são apresentados na Figura 4.10. No espectro de FTIR da quitosana (Fig. 4.10a), uma banda larga em $3090\text{-}3540 \text{ cm}^{-1}$ é atribuída às vibrações de estiramento das ligações O-H e N-H. As bandas que apareceram em 2854 e 2922 cm^{-1} são atribuídas à vibração de alongamento das ligações C-H. A banda localizada em 1581 cm^{-1} está correlacionada com a vibração de flexão do N-H (resíduos da banda N-acetilada, amida II). O pico em torno de 1650 cm^{-1} é originado da vibração em tesoura da água absorvida e da vibração do estiramento da carbonila (amida I) deste polissacarídeo. As bandas em 1377 e 1315 cm^{-1} correspondem à flexão O-H e alongamento assimétrico da vibração da ponte C-O-C, respectivamente (Pourjavadi et al., 2020; Shaheen et al., 2019).

Para o alginato de sódio e os CNCs (Figura 4.10c), é possível observar um pico na faixa de $3600\text{-}3200 \text{ cm}^{-1}$, o qual é característico da vibração de alongamento das ligações O-H presentes nesses polissacarídeos. Além disso, é notado um pico em torno de 2925 cm^{-1} para o alginato (Huq et al., 2012) e em 2904 cm^{-1} para os CNCs, que é atribuído à sobreposição das vibrações de alongamento simétrica e assimétrica das cadeias alifáticas C-H. (Naseri et al., 2016; Tang et al., 2014). As bandas observadas em 1630 , 1419 e 1031 cm^{-1} , alongamento assimétrico de COO^- , alongamento simétrico de COO^- e alongamento de CO, respectivamente para o alginato de sódio (Zhao et al., 2021). Em 1635 cm^{-1} , é possível observar um pico relacionado à ligação O-H, resultado da absorção de água pela celulose (Naseri et al., 2016). De acordo com Qiao et al. (2016), a água é adsorvida nas moléculas de celulose, e esse pico ainda é detectado mesmo nas amostras que foram secas, pois a interação entre celulose e água dificulta a completa remoção da água presente. As bandas de 1384 cm^{-1} e 894 cm^{-1} são atribuídas às flexões

dos grupos O-H e às vibrações de deformação dos grupos C-H da celulose, respectivamente (Li et al., 2012). Já o alongamento dos grupos C-O-C é observado em 1160 cm^{-1} , relacionado à estrutura da celulose (Dai & Fan, 2011).

No espectro do sistema alginato/CNC/quitosana (Fig. 4.10b), a banda em 1581 cm^{-1} originada da vibração em tesoura do NH_2 na quitosana desaparece e uma banda em 1550 cm^{-1} originada do NH_3^+ grupos apareceu devido ao envolvimento em interações eletrostáticas com alginato (Pourjavadi et al., 2020; Shaheen et al., 2019). Além disso, a banda COO- simétrica do alginato de sódio em 1419 cm^{-1} tornou-se mais larga e a banda COO- assimétrica do alginato de sódio em 1630 cm^{-1} mudou para um número de onda mais baixo, 1605 cm^{-1} , e se fundiu com a banda de grupos NH_3^+ em 1550 cm^{-1} devido à complexação dos polímeros no sistema alginato/CNC/quitosana. Para os espectros dos géis e hidrogéis do sistema alginato/CNC/quitosana esperava-se observar um deslocamento do pico em 1419 para 1428 cm^{-1} evidenciando a reticulação do alginato de sódio indicado pela presença de íons cálcio formando a estrutura de caixa de ovos (*eggbox*) e a presença de CNC (Voo et al., 2015), resultados esses apresentados para somente os géis de alginato e CNC em meio aquoso. Esse fato pode estar associado a dissolução dos polímeros em um meio ácido e das interações eletrostáticas que ocorrem entre o alginato, CNC e a quitosana.



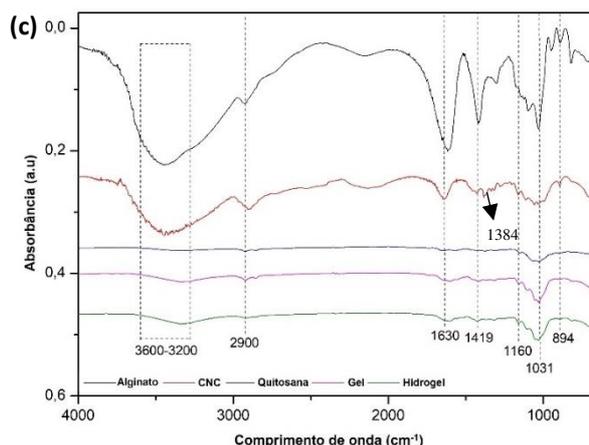


Figura 4.10: Espectro de infravermelho de (a) quitosana, (b) gel e hidrogel do sistema Alginato/CNC/Quitosana, (c) alginato, CNC, quitosana, Alginato/CNC/Quitosana reticulados e não reticulados.

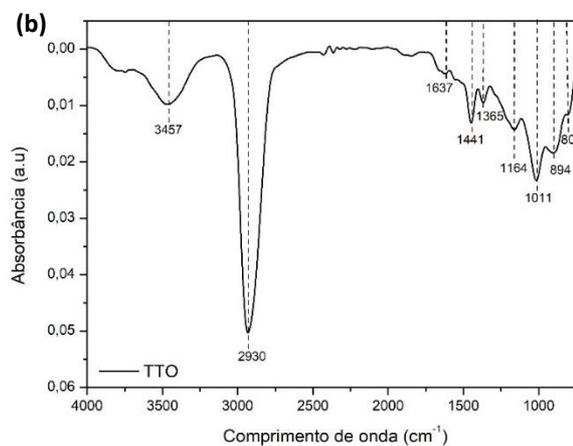
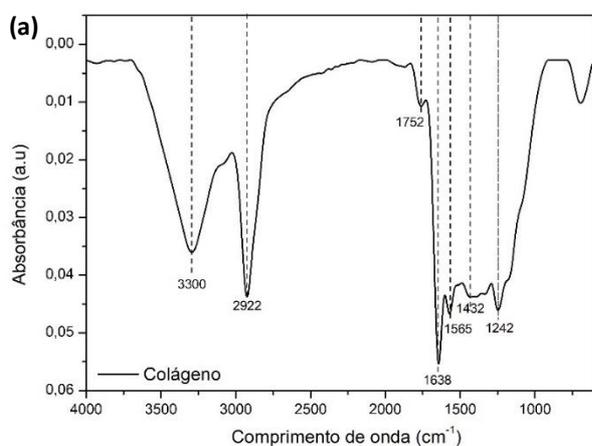
Na figura 4.11 são apresentados os espectros de infravermelho (FT-IR) para os géis da primeira camada (alginato/CNC/colágeno). Foram analisados os polímeros puros alginato, CNC (já discutidos acima) e colágeno, o óleo essencial de melaleuca (TTO) e os géis do sistema alginato/CNC/colágeno com e sem o TTO incorporado. No espectro do colágeno (Fig. 4.11a) no qual é possível identificar as bandas correspondentes à amida A em 3300 cm^{-1} e amida B em 2922 cm^{-1} e as três bandas principais de colágeno em 1638 cm^{-1} (típica da amida I devido ao estiramento da carbonila -C-H), 1565 cm^{-1} (relacionado à amida II devido a vibrações no plano da ligação N-H e alongamento C-N) e 1242 cm^{-1} (correspondente a vibrações no plano da amida III devido ao alongamento C-N e deformação N-H). Os picos identificados em 1432 cm^{-1} e na região entre 1417 cm^{-1} e 1360 cm^{-1} correspondem à estereoquímica dos anéis pirrolidínicos da prolina e da hidroxiprolina. Os picos encontrados na região entre 3100 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} ocorrem devido ao estiramento O-H e N-H da amida A (Júnior et al., 2015).

Na figura 4.11b é apresentado o espectro FTIR para o TTO. Os principais componentes do TTO, como terpinen-4-ol, α -terpineol, γ -terpineno e α -terpineno têm estruturas aromáticas (Ghosh et al., 2022). A banda larga em 3457 cm^{-1} é a vibração de alongamento O-H do terpinen-4-ol, o principal componente do TTO. O pico em 2922 cm^{-1} corresponde à vibração de alongamento de CH_2 , e o pico entre 1441 e 1365 cm^{-1} representa picos de sobreposição de vibrações de flexão de CH_3 e CH_2 e vibração de esqueleto de carbono aromático (Huang et al., 2019). O pico em 1637 cm^{-1} corresponde

ao pico de absorção da vibração de estiramento da ligação dupla C=C. As bandas espectrais localizadas em 1164 e 1011 cm^{-1} são atribuídas ao alongamento da ligação C-O-C e à ligação C-O no 1,8-cineol respectivamente. Por fim, as vibrações em 804 e 894 cm^{-1} ocorrem devido aos anéis aromáticos C-O-C (Ghosh et al., 2022).

O sistema alginato/CNC/colágeno (Fig. 4.11c) exibiu os principais picos do alginato de sódio, indicando a incorporação total do colágeno e o CNC na matriz do alginato. Vale a pena notar que o pico de alongamento da hidroxila no espectro em 3300 cm^{-1} do sistema foi deslocado para um maior comprimento de onda em comparação com o espectro do alginato de sódio, indicando a formação da ligação de hidrogênio intermolecular entre os componentes o alginato o CNC e o colágeno (Yan et al., 2018).

Para o sistema alginato/CNC/colágeno com o TTO incorporado (Fig. 4.11c), também é observado os principais picos do alginato de sódio, indicando a incorporação do óleo no sistema. Entretanto, é possível observar que houve sobreposição dos picos 1441 e 1365 cm^{-1} do TTO com o pico em 1419 cm^{-1} do alginato de sódio. Outra mudança importante é o aumento do pico em 3328 cm^{-1} indicada pela vibração de alongamento O-H do terpinen-4-ol indicando a presença do óleo no sistema.



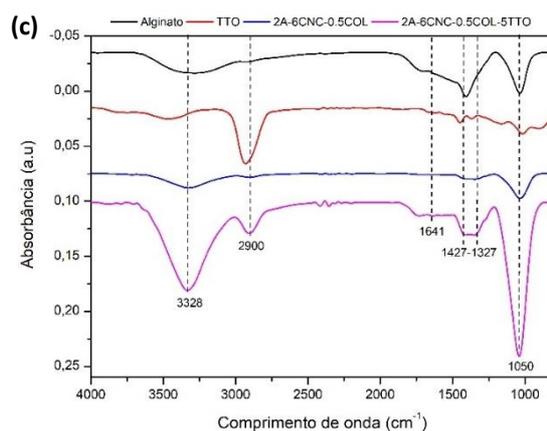


Figura 4.11: Espectro de infravermelho de (a) colágeno, (b) TTO, (c) alginato, TTO, Alginato/CNC/Colágeno com e sem TTO incorporados.

4.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC para os géis da segunda camada são apresentadas na figura 4.12. Conforme mostrado na Figura 4.12a, dois picos com temperaturas próximas a 165 e 233 °C foram encontrados no termograma DSC da amostra de alginato de sódio. O pico endotérmico em 165 °C é referente a transição de fase, segundo Yang et al., 2017, é possível observar a temperatura de transição vítrea do alginato de sódio com um pico endotérmico que ocorre em torno de 100 a 200 °C dependendo da massa molecular da amostra e das condições de armazenamento (Iurciuc et al.). Também se percebe que o alginato não possui picos endotérmicos relacionados a fusão, neste caso, observou-se um pico exotérmico em 233 °C na curva de DSC do alginato referente a degradação da amostra. Segundo Sánchez et al., 2021, é possível observar a temperatura de degradação do alginato de sódio com um pico exotérmico que ocorre em torno de 100 a 200 °C, dependendo da massa molar da amostra e das condições de armazenamento (Sánchez-Fernández et al., 2021).

Para a amostra de CNC (Fig. 4.12b) dois picos endotérmicos são observados. O pico em 99° é referente a perda de água, pois o CNC é higroscópico e pode conter uma quantidade significativa de água adsorvida em sua superfície e poros. A perda de água pode ser observada na faixa de temperatura de 25 a 150 °C, dependendo da quantidade de água da amostra. O pico em 141 °C é referente a transição de fase, o CNC pode apresentar

transições de fase, incluindo transições de ordem-desordem e transições de fase líquido cristalina. Essas transições podem ser observadas na faixa de temperatura de 100 a 250 °C, dependendo da estrutura e do grau de cristalinidade da amostra (Li et al., 2023).

Para a quitosana (Fig. 4.12c) também são observados 2 picos endotérmicos, o pico próximo a 100 °C referente a desidratação e o pico em 174 °C referente a decomposição térmica da quitosana (Ulag et al., 2019). Na figura 4.12d são apresentadas as curvas de DSC para o gel e o hidrogel do sistema alginato/CNC/quitosana. Para o gel (não reticulado), são observados 2 picos endotérmicos, um pico próximo a 100 °C referente a perda de água e um pico em 160 °C referente a temperatura de fusão. Já para o hidrogel (reticulado), ocorrem 2 picos endotérmicos a mais que no gel, em 196 e 212 °C indicando a formação do hidrogel, devido à ocorrência do processo de fusão (Tapia et al., 2004). Dois eventos de fusão indicam que o hidrogel possui regiões de ordenamento distintas.

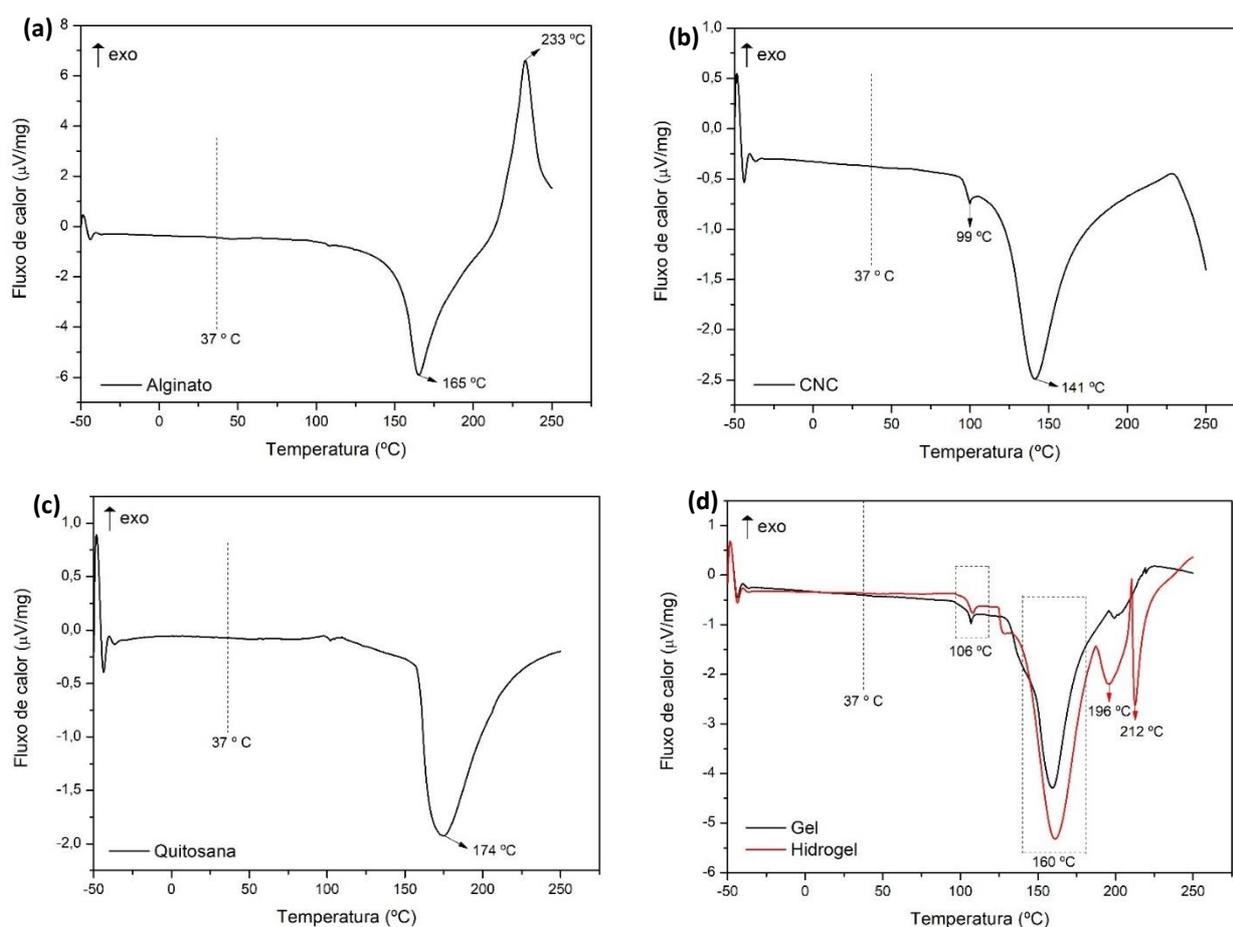


Figura 4.12: Curvas de DSC para (a) Alginato de sódio (b) CNC (c) Quitosana e (d) Géis e hidrogéis do sistema Alginato/CNC/Quitosana.

As curvas de DSC para os géis da primeira (alginato/CNC/colágeno camada são apresentadas na figura 4.13. Conforme mostrado na Figura 4.13a, dois picos endotérmicos característicos com temperaturas de pico próximas a 89 e 229 °C foram encontrados no termograma DSC da amostra de colágeno. Isso é semelhante a estudos anteriores (Bozec & Odlyha, 2011; Salomé Machado et al., 2002) .Esses picos endotérmicos são atribuídos à temperatura de desnaturação e à temperatura de degradação térmica da molécula de colágeno, respectivamente. Conforme sugerido por Cui et al., 2007, a disparidade nas temperaturas de desnaturação e degradação de vários espécimes de colágeno é atribuída às suas diferentes composições de aminoácidos obtidas de diferentes organismos (Cui et al., 2007).

Para o óleo essência de melaleuca (TTO) dois picos endotérmicos com temperaturas próximas a 233 e 258 °C são observados na Figura 4.13b. Esses picos estão relacionados com a perda de compostos voláteis do óleo essencial, segundo Ge et al., 2015, a temperatura de volatilização dos compostos do TTO ocorre entre 170 e 260 °C (Ge & Ge, 2015).

Nas figuras 4.13c e d são apresentadas as curvas de DSC para os géis do sistema Alginato/CNC/Colágeno sem e com óleo de melaleuca (TTO) incorporados. Pode-se observar 2 picos endotérmicos com temperaturas próximas a 165 e 184 °C para o sistema sem o TTO incorporado e 168 e 198 °C para o sistema com o TTO incorporado. Esses picos estão relacionados a temperatura de transição de fase dos polímeros do sistema. Também é possível observar que a curva de DSC para o sistema com TTO incorporado possui um pico endotérmico em 268 °C referente a volatilização dos compostos do TTO, provando assim a incorporação do óleo do sistema.

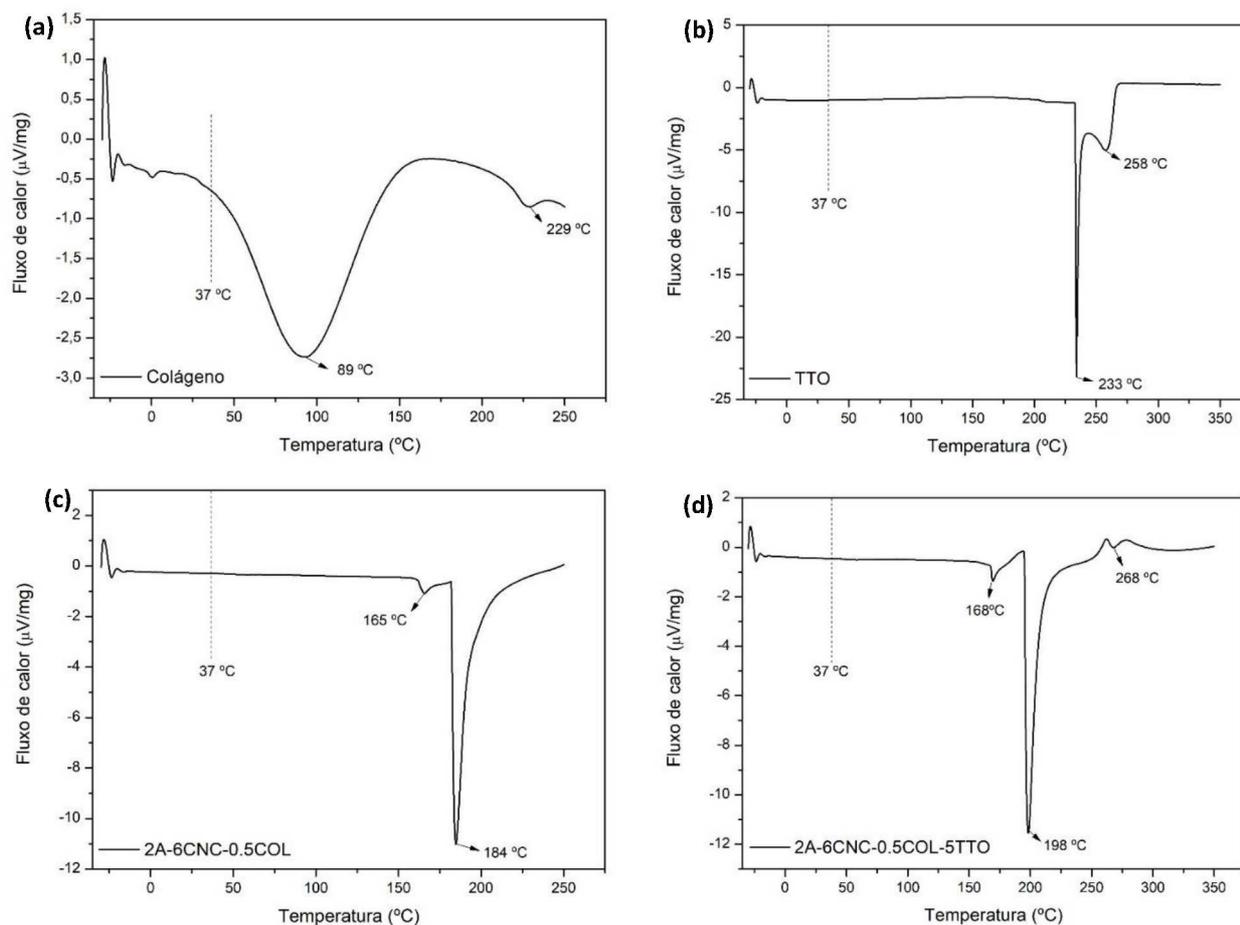


Figura 4.13: Curvas de DSC para (a) Colágeno tipo I (b) Óleo essencial de melaleuca (TTO) (c) Alginato/CNC/Colágeno e (d) Alginato/CNC/Colágeno com TTO incorporado.

4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada a fim de elucidar o estado de dispersão devido às interações formadas entre os CNCs, o alginato e a quitosana. A Figura 4.14 são apresentadas as micrografias das superfícies dos *scaffolds* inteiros e fraturados dos hidrogéis de alginato/CNC/quitosana referentes a segunda camada. É possível observar na Fig. 4.14b que o filamento do *scaffold* possui uma superfície fibrosa e alinhada na direção da extrusão, isso ocorre devido ao processo de impressão 3D onde a taxa de cisalhamento é maior no bico de impressão, essa alta taxa de cisalhamento faz com que as cadeias poliméricas e as hastes dos CNC se alinhem, esse alinhamento faz com que a viscosidade diminua e o gel escoe formando o filamento

contínuo. Nas Figuras 4.14c e d são mostradas as imagens da fratura dos *scaffolds*. É possível observar uma morfologia densa e de paredes rugosas, sugerindo hidrogéis mais resistentes (Carvalho, 2019).

É evidente pelas imagens que a distribuição de CNC na matriz do hidrogel não é uniforme e a aglomeração de CNC pode ser observada. Os CNCs têm uma tendência substancial de aglomeração durante o processo de produção e secagem. A aglomeração ocorre devido à alta área específica dos CNCs, alta energia de superfície e presença de grupos hidroxila na superfície dos CNCs, resultando na formação de pontes de hidrogênio extras entre os cristais (Das et al., 2021). A superfície de fratura tem estrutura mais rugosa com maior número de agregados micrométricos sugerindo que a interação entre os CNCs prevalece quando comparadas as interações entre Alginato/CNC e/ou Quitosana/CNC (Szefer et al., 2021).

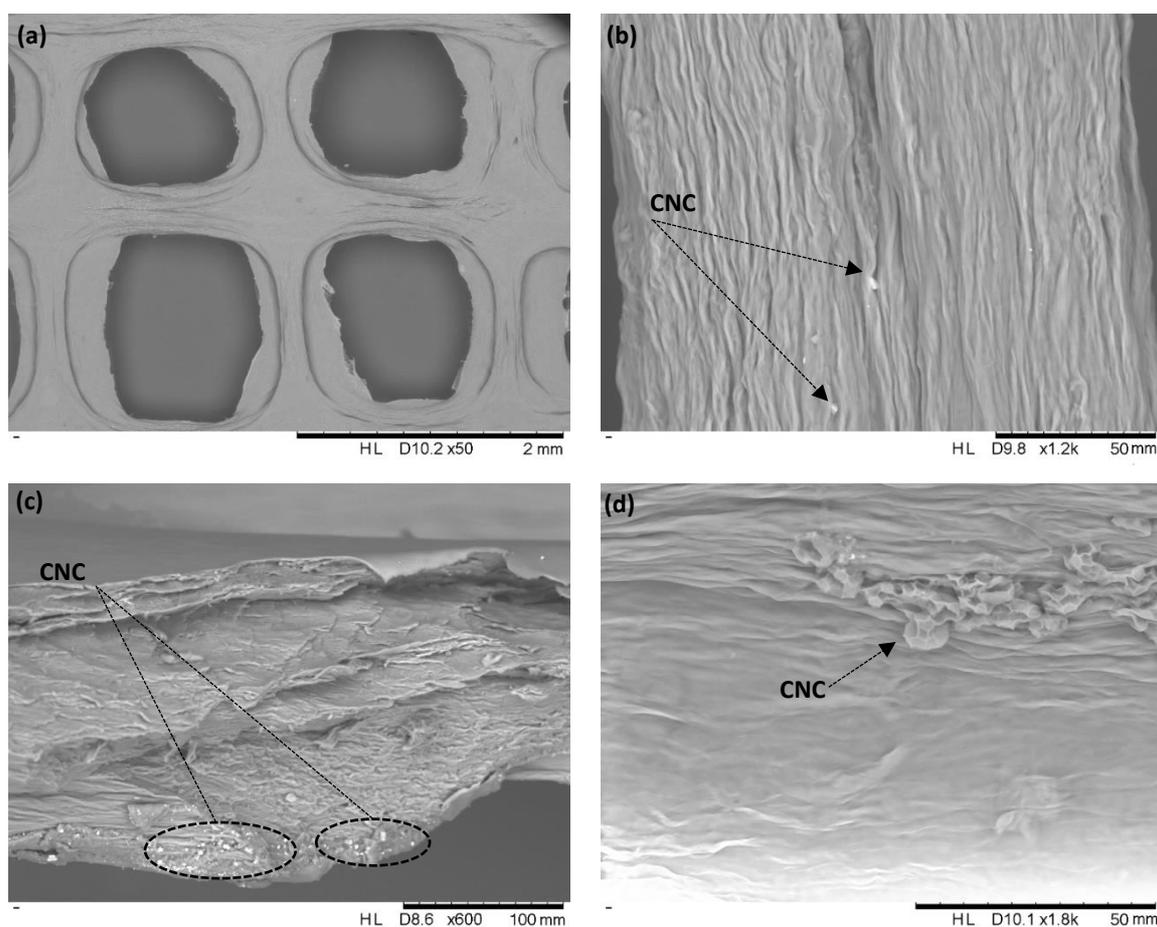


Figura 4.14: Micrografias MEV dos *scaffolds* do sistema Alginato/CNC/Quitosana (a) magnificação de 50x; (b) magnificação de 1200x; (c) magnificação de 600x e (d) magnificação de 1800x.

Na Figura 4.15 são apresentadas as micrografias MEV dos *scaffolds* da primeira camada do sistema Alginato/CNC/Colágeno com e sem TTO incorporado. Os resultados são bem parecidos com as micrografias dos *scaffolds* segunda camada. Também é possível observar uma morfologia rugosa e porosa, entretanto, pode-se observar que os CNCs estão mais dispersos tanto para os *scaffolds* com e sem TTO incorporados. Isso pode estar relacionado ao fato de ter uma concentração menor de CNC para os *scaffolds* da primeira camada (8% em massa para os hidrogéis com quitosana e 6% em massa para os hidrogéis com colágeno), com isso as interações CNC-CNC ocorrem em uma menor quantidade formando menos agregados (Szefer et al., 2021). Quanto a incorporação do TTO, A presença do TTO não alterou as características microestruturais do scaffold. O MEV foi utilizado para observar a morfologia. A presença do TTO já foi discutida no FTIR.

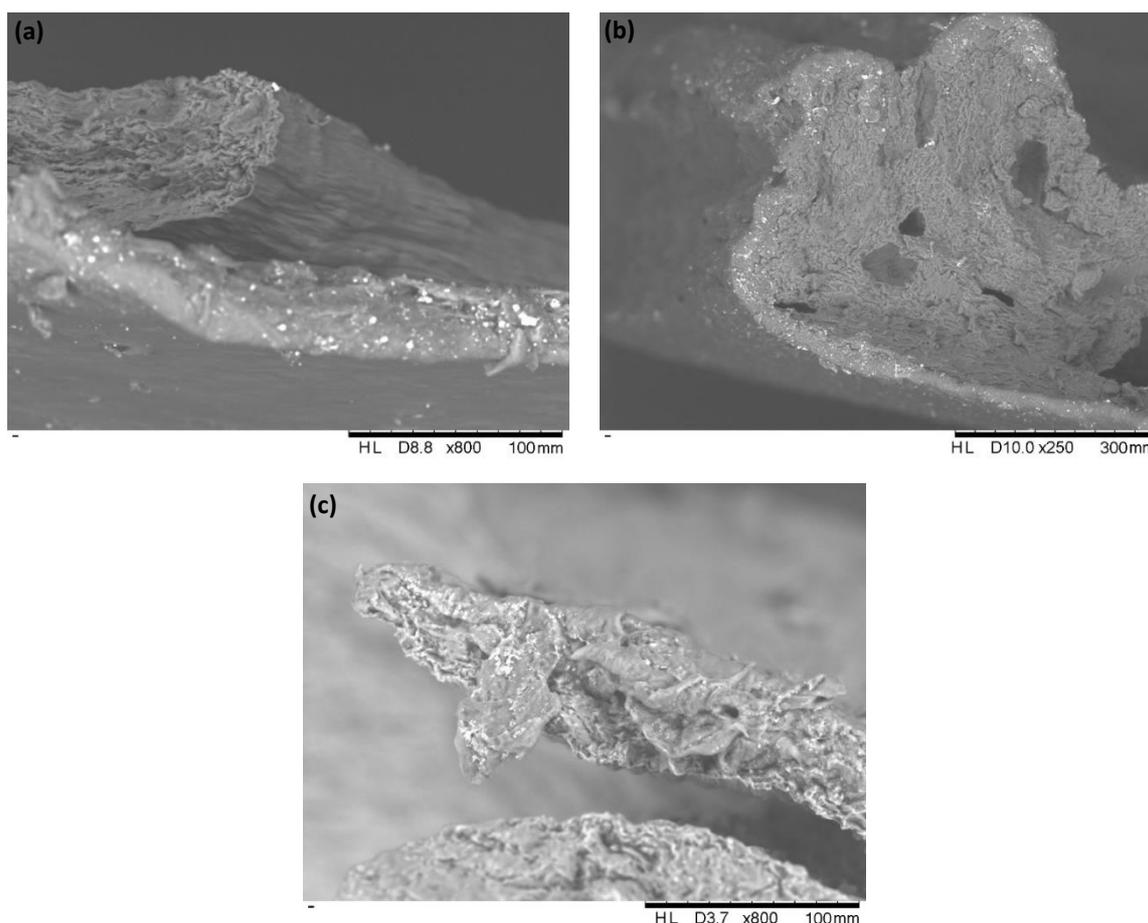


Figura 4.15: Micrografias MEV dos *scaffolds* do sistema Alginato/CNC/Colágeno (a) sem TTO incorporado e magnificação de 800x; (b) com TTO incorporado e magnificação de 250x e (c) com TTO incorporado e magnificação de 800x.

4.2.7 Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de melaleuca (TTO)

Viabilidade dos promastigotas

A avaliação inicial da atividade leishmanicida do TTO foi realizada com 5×10^6 promastigotas em fase logarítmica de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, incubados com 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156 e 78 $\mu\text{g/mL}$ de TTO, em placa de 96 poços por 24 e 48h, para avaliar uma possível ação tempo-dependente, e os resultados estão apresentados na Figura 4.16. A concentração inibitória do TTO para 50% dos promastigotas (EC50) de *L. amazonensis* foi de 574,2 $\mu\text{g/mL}$ após 24h e 515,9 $\mu\text{g/mL}$ após 48h. Já para os promastigotas de *L. braziliensis*, o EC50 foi de 750,4 $\mu\text{g/mL}$ após 24h e 660,3 $\mu\text{g/mL}$ após 48h (Tabela 4.3). É possível observar que após 48h a concentração de TTO necessária para inibir 50% dos parasitas foi menor, demonstrando assim uma possível atividade tempo-dependente. Além disso, as concentrações de 5000 e 10000 $\mu\text{g/mL}$ de TTO inibiram 100% dos parasitas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* após 24h e concentrações acima de 2500 $\mu\text{g/mL}$ após 48h. Mikus et al., (2000) estudaram a atividade leishmanicida do TTO e encontraram valores de EC50 de 403 $\mu\text{g/mL}$ para promastigotas de *L. major* após 72h de incubação.

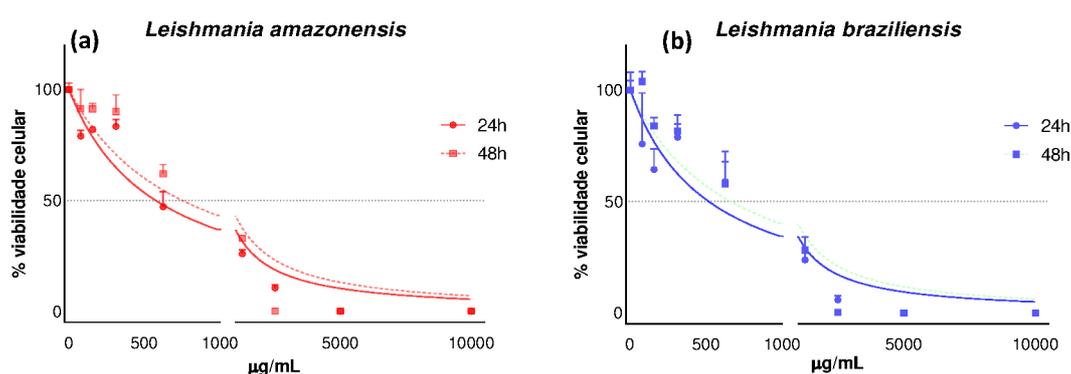


Figura 4.16: Viabilidade celular de promastigotas de (a) *L. amazonensis* e (b) *L. braziliensis* incubados com TTO por 24 e 48h. Cada concentração está expressa como média \pm desvio padrão da % de células viáveis das triplicatas de um único ensaio e os valores de EC50 expressos em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4.3: Concentração inibitória de TTO em promastigotas (EC50).

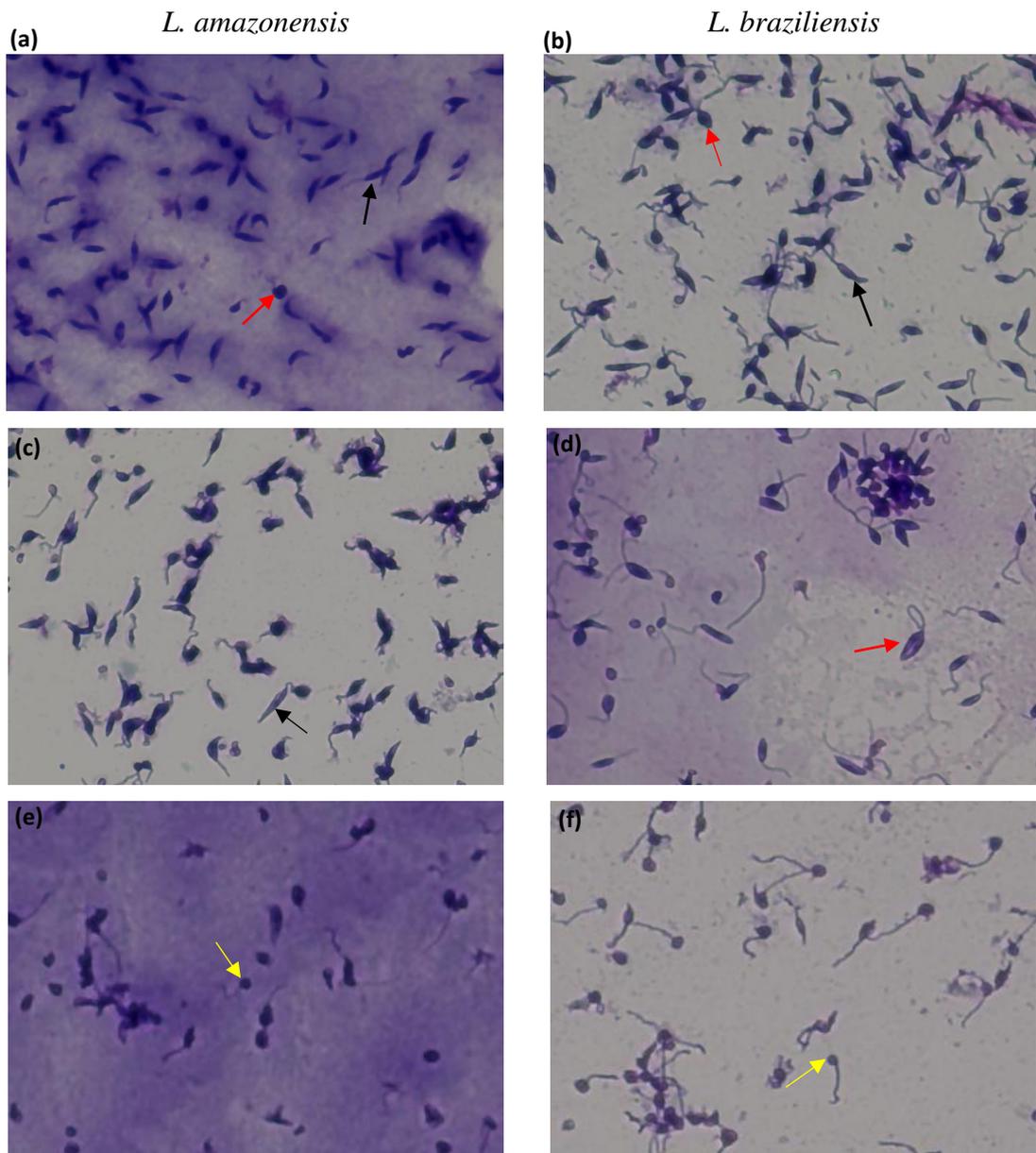
	EC50	
	24h	48h
<i>L. amazonensis</i>	574,2 µg/mL	515,9 µg/mL
<i>L. braziliensis</i>	750,4 µg/mL	660,3 µg/mL

O TTO contém mais de 100 componentes voláteis que são principalmente hidrocarbonetos oxigenados, monoterpenos monocíclicos e monoterpenos bicíclicos e muitos de seus componentes demonstraram ter atividades leishmanicida in vitro (Lam et al., 2020). Em um estudo, foram avaliados os efeitos do TTO e de terpenos isolados na viabilidade de promastigotas de *Leishmania major* usando o ensaio Almar Blue; os valores de EC50 do TTO e seus compostos isolados como α -pineno, aromadendreno, sabineno, T4O e terpinoleno contra promastigotas de *L. major* foram 403,0, 55,3, 63,8, 126,6, 335,9 e 387,9 µg/mL, respectivamente (Mikus et al., 2000). Nesses resultados, é possível observar valores próximos de EC50 para o T4O e o TTO devido ao fato de o T4O ser o componente majoritário do TTO. Em outro estudo in vitro, o EC50 do limoneno, outro composto do TTO, contra promastigotas de *L. major* foi de $354,0 \pm 33,0$ µmol.L⁻¹. O tratamento de macrófagos infectados por *L. amazonensis* com 300 µmol.L⁻¹ de limoneno resultou em 78% de redução nas taxas de infecção (Arruda et al., 2009).

A citotoxicidade dos terpenos contra promastigotas de *Leishmania* pode estar associada ao aumento da fluidez da membrana plasmática e ruptura da membrana alterando assim a morfologia do parasita. Os monoterpenos presentes no TTO podem bloquear as acetilcolinesterases (AChE) em parasitas, o que pode contribuir para sua atividade antiparasitária (Lam et al., 2020). A Acetilcolinesterase participa da síntese da fosfatidilcolina (FC), o fosfolípido mais abundante tanto nas membranas superficiais (14,9%) como em todo o citoplasma celular (51,6%) de *Leishmania*. Com isso, o bloqueio da acetilcolinesterase prejudica a síntese de fosfatidilcolina comprometendo a membrana plasmática da leishmania (Bezabh et al., 2022).

Esfregaços foram obtidos a partir do teste de viabilidade de 24h para avaliação da morfologia dos parasitas em função da concentração de TTO (Fig. 4.17). No controle podemos observar a morfologia fusiforme dos promastigotas com corpo alongado e

flagelo livre bem como divisão celular (Fig. 4.17a, b). Na menor concentração de 78 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 4.17c, d) observa-se ainda a presença de parasitas em replicação e morfologia fusiforme, para ambas as espécies, enquanto 625 $\mu\text{g/mL}$, (próximo ao EC_{50} ; Fig. 4.17e, f) promoveram alterações morfológicas (arredondamento do corpo e perda de flagelo) em diversas células. A partir da concentração de 1250 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 4.17g, h), observa-se uma drástica queda na densidade celular e células restantes com morfologia alterada



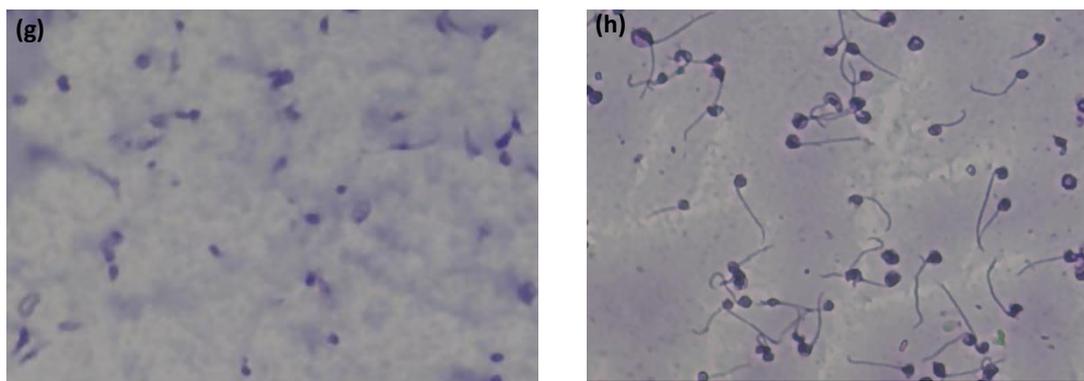


Figura 4.17: Micrografias obtidas de esfregaços de cultura de promastigotas incubadas com TTO. (a) e (b) Controle não tratados com parasitas exibindo morfologia fusiforme (setas pretas) e em divisão (setas vermelhas). (c) e (d) Promastigotas tratadas com 78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TTO. (e) e (f) Promastigotas tratadas com 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TTO (próximo ao EC50), apresentam arredondamento do corpo celular (setas amarelas). (g) e (h) Promastigotas tratadas com 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TTO, apresentam baixa densidade e viabilidade celular.

A avaliação da atividade leishmanicida dos *scaffolds* com TTO incorporados se deu com 5×10^6 promastigotas em fase logarítmica de *L. amazonensis*, incubados com 100, 50 e 25 mg/mL de TTO, em placa de 24 poços por 24h e estão apresentados na figura 4.18. A viabilidade celular para o *scaffold* contendo 25 mg/mL de TTO foi de 29%, já para o *scaffold* contendo 50 mg/mL de TTO a viabilidade foi de 15% e por fim, a viabilidade para o *scaffold* contendo 100 mg/mL de TTO foi de aproximadamente 10%, sendo o *scaffold* com maior ação leishmanicida para os parasitas. Também é possível observar que a ação leishmanicida do TTO é dose-dependente após incubação de 24h.

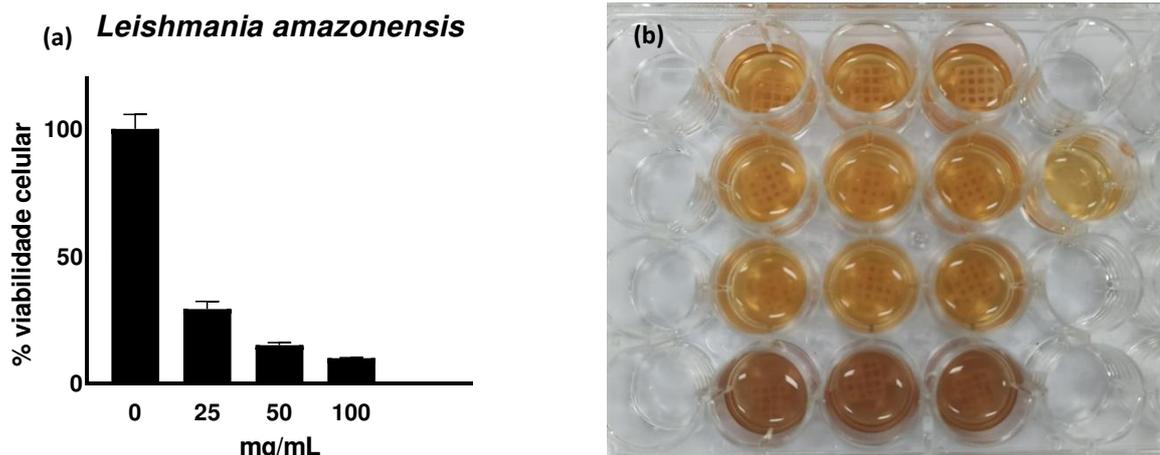


Figura 4.18: Viabilidade celular para os *scaffolds* incorporados com diferentes concentrações de TTO após 24h de incubação para *L. amazonensis*. (a) Porcentagem de células viáveis nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/mL de TTO incorporados nos *scaffolds*. (b) *Scaffolds* após 24h de cultura e adição de MTT.

Na tabela 4.4 encontram-se os valores de viabilidade celular para o TTO puro e para os *scaffolds* com TTO incorporado para *L. amazonensis* após 24h de incubação. É possível observar que concentrações do TTO puro a partir de 1250 $\mu\text{g/mL}$ foram letais para 100% dos parasitas. Além disso, até na menor concentração analisada é possível observar uma ação leishmanicida de aproximadamente 20%. Quanto as concentrações do TTO nos *scaffolds*, foram utilizadas concentrações maiores para garantir que o EC50 fosse atingido após 24h. É possível observar que em todas as concentrações de TTO nos *scaffolds* a viabilidade celular foi menor que a do EC50, garantindo assim uma ação leishmanicida promissora.

Tabela 4.4: Viabilidade celular para o TTO puro e *scaffolds* incorporados em cultura com *L. amazonensis* após 24h. A linha em vermelho indica o EC50 para o óleo puro. A média e o desvio padrão é baseado na triplicata de 1 experimento.

TTO puro		
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade (%)	Ação leishmanicida (%)
78	$79,0 \pm 2,57$	$21 \pm 2,57$
156	$82,0 \pm 0,93$	$18 \pm 0,93$
312	$83,4 \pm 3,17$	$15,7 \pm 3,17$
574,2	50	50
625	$47,1 \pm 6,85$	$52,9 \pm 6,85$
1250	$25,8 \pm 1,96$	$74,2 \pm 1,96$
2500	$10,5 \pm 1,96$	$89,5 \pm 1,96$
5000	0 ± 0	100
10000	0 ± 0	100
<i>Scaffolds</i> com TTO		
Concentração (mg/mL)	Viabilidade (%)	Ação leishmanicida (%)
25	29	71
50	15	85
100	9	91

Viabilidade em macrófagos

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados inicialmente com 5×10^5 células de macrófagos de linhagem RAW 264.7, com 24h de incubação nas mesmas concentrações de TTO utilizadas para os testes de viabilidade celular em promastigotas para obtenção da concentração citotóxica para 50% da cultura (CC50) (Fig. 4.19). Com os valores de CC50 e EC50 é possível calcular a seletividade do TTO dividindo o CC50 pelo EC50 (Índice de Seletividade = CC50/EC50). A concentração citotóxica do TTO para 50% dos macrófagos RAW 264.7 foi de 1226,5 $\mu\text{g/mL}$ após 24h. Assmann et al., (2018) reportaram que concentrações acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de TTO foram citotóxicos para células mononucleares de sangue periférico (PBMCs que incluem os macrófagos), após 24h de incubação. Além disso as concentrações acima de 1250 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram ter alta citotoxicidade para os macrófagos. Já o índice de seletividade foi de 2,13 para *L.*

amazonensis e 1,63 para *L. braziliensis* e estão apresentados na tabela 4.5. O TTO demonstrou ser menos tóxico para os macrófagos e mais ativo contra os parasitas, pois foi 2,13 vezes mais seletivo contra promastigotas de *L. amazonensis* e 1,63 vezes mais seletivo contra promastigotas de *L. braziliensis* demonstrando assim a boa atividade leishmanicida do TTO.

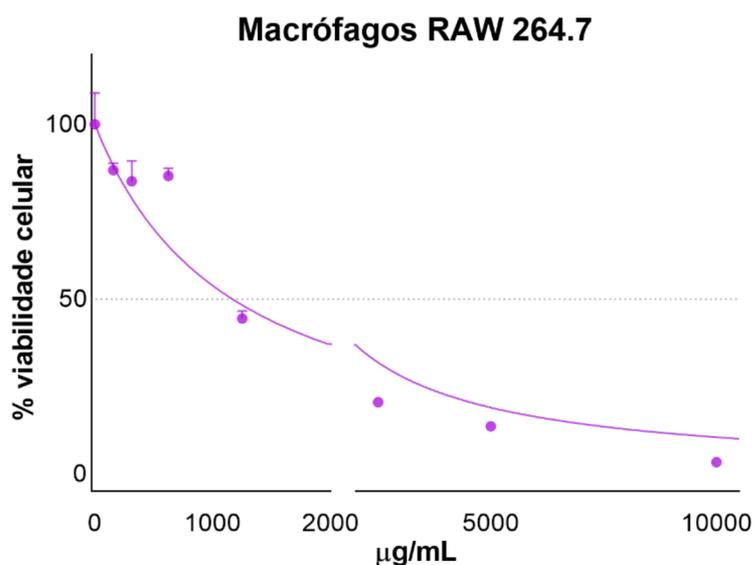


Figura 4.19: Viabilidade celular de macrófagos de linhagem RAW 264.7 incubados com TTO por 24h. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão da % de células viáveis das triplicatas experimentais e os resultados de CC50 como $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4.5: Viabilidade celular do TTO em macrófagos e índice de seletividade

CC50	
RAW	1226.5 $\mu\text{g/mL}$
Selectivity Index (SI)	
<i>L. amazonensis</i>	2.13
<i>L. braziliensis</i>	1,63

4.3 Conclusões

Os estudos reológicos realizados dos sistemas de alginato/CNC/quitosana e alginato/CNC/colágeno permitiram analisar suas propriedades reológicas e definir uma tinta ótima para impressão 3D baseada em extrusão de *scaffolds* multicamadas. É de extrema importância realizar uma avaliação da capacidade de impressão para estabelecer os parâmetros do processo e garantir uma boa qualidade de impressão. As concentrações de quitosana e CNC têm influência significativa nas propriedades reológicas e capacidade de impressão das tintas evidenciando como nanocompósitos podem melhorar as propriedades reológicas para o processo de impressão 3D. As caracterizações química e térmica revelaram a incorporação do TTO nos géis de alginato/CNC/colágeno e a caracterização morfológica permitiu analisar a dispersão do CNC nos géis dos 2 sistemas. Finalmente, testes in vitro permitiram avaliar a atividade leishmanicida do TTO puro e incorporado nos *scaffolds* de algina/CNC/colágeno em parasitas de *L. amazonensis* e *braziliensis* como potencial tratamento tópico para leishmaniose cutânea. Os resultados demonstraram boa atividade leishmanicida do TTO, entretanto maiores concentrações o TTO revelaram ser tóxicos para outras células da pele. Com isso, é evidente que os estudos reológicos e da capacidade de impressão são de extrema importância na seleção de materiais com boa capacidade de impressão e o TTO demonstrou ter boa atividade leishmanicida e aliado com processo de impressão 3D baseado extrusão pode ser promissor no desenvolvimento de um novo tratamento tópico para leishmaniose cutânea.

5 CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

Esse trabalho apresentou aplicações biomédicas para *scaffolds* de hidrogéis nanocompósitos do sistema alginato/CNC impressos tridimensionalmente. Inicialmente avaliou-se a citotoxicidade e viabilidade celular do sistema alginato/CNC. Conforme observado, diferentes concentrações de alginato e CNC demonstraram baixa toxicidade para fibroblastos do tipo NIH3T3, um tipo celular encontrado na pele. Além disso, maiores concentrações de alginato, CNC e o sistema alginato/CNC, demonstraram uma proliferação celular. Testes reológicos demonstraram que a incorporação das células nos géis de alginato/CNC não afetaram significativamente as propriedades reológicas para o processo de impressão 3D baseado em extrusão. Micrografias confocais de fluorescências mostraram células viáveis e aderidas nos *scaffolds* após a semeadura e bioimpressão da biotinta. Esses resultados confirmam a vasta aplicação do alginato e do CNC em aplicações biomédicas devido as suas boas propriedades biológicas e mostram que o sistema de hidrogel nanocomposto por alginato/CNC tem grande potencial na aplicação na engenharia tecidual.

Quitosana e colágeno foram adicionados ao sistema alginato/CNC e estudos reológicos e da capacidade de impressão foram conduzidos para se encontrar uma tinta ótima de impressão visando a impressão de *scaffolds* multicamadas e incorporação do óleo essencial de melaleuca (TTO) para o desenvolvimento de um tratamento tópico para leishmaniose cutânea. Diferentes concentrações de quitosana e CNC foram avaliadas e em seguida. O comportamento pseudoplástico, a iniciação do fluxo, a rápida recuperação da viscosidade após uma alta taxa de cisalhamento e o comportamento do tipo sólido garantem que a tinta seja capaz de ser dispensada e posteriormente garantir a fidelidade do objeto impresso. Este conjunto de propriedades reológicas analisadas em conjunto com a impressão de *scaffolds* em diferentes pressões de extrusão permitiram avaliar a capacidade de impressão. Além disso, foi relatado que a pressão de extrusão influencia na capacidade de impressão. Tintas ótimas para os sistemas alginato/CNC/quitosana e alginato/CNC/colágeno foram alcançadas, e as caracterizações química e térmica confirmaram a incorporação do TTO nos géis de alginato/CNC/colágeno. Além disso, a caracterização morfológica mostrou a dispersão do CNC nos géis estudados. Testes in vitro demonstraram a boa atividade leishmanicida do TTO para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* onde uma concentração de EC50 foi encontrada e o índice de seletividade do

TTO foi mais ativo contra os parasitas do que tóxico para macrófagos. A tecnologia de impressão 3D baseada em extrusão aliada com os hidrogéis nanocompósitos e a atividade leishmanicida do TTO demonstraram ter grande potencial para o desenvolvimento de um tratamento tópico para leishmaniose cutânea.

Este trabalho mostrou que a caracterização reológica e estudos de capacidade de impressão são ferramentas muito importantes no desenvolvimento de tintas em processos de impressão 3D por extrusão e testes *in vitro* demonstraram que o sistema de hidrogel nanocomposto por alginato/CNC é um candidato promissor para aplicações biomédicas como engenharia tecidual e no tratamento de feridas.

Os trabalhos futuros podem ser orientados para:

- Avaliar o dano celular induzido através do processo de bioimpressão baseado em extrusão variando os parâmetros de processos como velocidade de impressão, tipo de bico de extrusão e diferentes tipos e densidades celulares.
- Avaliar a influência da reticulação interna dos géis de alginato/CNC na viabilidade celular.
- Realizar estudos microbiológicos dos géis de alginato/CNC/quitosana.
- Realizar o estudo da liberação controlada do óleo essencial de melaleuca em *scaffolds* de alginato/CNC/colágeno.
- Avaliar a citotoxicidade e viabilidade celular do óleo essencial de melaleuca para fibroblastos.
- Infecção *in vitro* para avaliar atividade leishmanicida do óleo essencial de melaleuca contra amastigotas intracelulares.
- Avaliação da atividade leishmanicida do óleo essencial de melaleuca *in vivo* em modelo murino com aplicação tópica.
- Realizar a impressão 3D dos *scaffolds* multicamadas.

Referências

- Abid, S., Hussain, T., Nazir, A., Zahir, A., Ramakrishna, S., Hameed, M., & Khenoussi, N. (2019). Enhanced antibacterial activity of PEO-chitosan nanofibers with potential application in burn infection management. *International journal of biological macromolecules*, *135*, 1222-1236.
- Adib, A. A., Sheikhi, A., Shahhosseini, M., Simeunović, A., Wu, S., Castro, C., . . . Hoelzle, D. (2020). Direct-write 3D printing and characterization of a GelMA-based biomaterial for intracorporeal tissue engineering. *Biofabrication*, *12*(4), 045006.
- Advincula, R. C., Dizon, J. R. C., Caldoná, E. B., Viers, R. A., Siacor, F. D. C., Maalihan, R. D., & Espera, A. H. (2021). On the progress of 3D-printed hydrogels for tissue engineering. *MRS communications*, *11*, 539-553.
- Aguilar-de-Leyva, Á., Linares, V., Casas, M., & Caraballo, I. (2020). 3D printed drug delivery systems based on natural products. *Pharmaceutics*, *12*(7), 620.
- Ahmad, B., Islam, A., Khan, A., Khan, M. A., ul Haq, I., Jafri, L., . . . Ullah, N. (2019). Comprehensive investigations on anti-leishmanial potentials of *Euphorbia wallichii* root extract and its effects on membrane permeability and apoptosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *64*, 138-145.
- Alammar, A., Kois, J. C., Revilla-León, M., & Att, W. (2022). Additive manufacturing technologies: current status and future perspectives. *Journal of Prosthodontics*, *31*(S1), 4-12.
- Alexandrino-Junior, F., Silva, K. G. d. H. e., Freire, M. C. L. C., Lione, V. d. O. F., Cardoso, E. A., Marcelino, H. R., . . . Egito, E. S. T. d. (2019). A functional wound dressing as a potential treatment for cutaneous leishmaniasis. *Pharmaceutics*, *11*(5), 200.
- Amorim, P., d'Ávila, M., Anand, R., Moldenaers, P., Van Puyvelde, P., & Bloemen, V. (2021). Insights on shear rheology of inks for extrusion-based 3D bioprinting. *Bioprinting*, *22*, e00129.
- Antunes, B. S. L. (2022). Desenvolvimento e caracterização de gel bioativo à base de fibroína da seda/pldla/sinvastatina para impressão 3D.
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, *13*(19), 3256.
- Arruda, D. C., Miguel, D. C., Yokoyama-Yasunaka, J. K., Katzin, A. M., & Uliana, S. R. (2009). Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *63*(9), 643-649.
- Assmann, C. E., Cadoná, F. C., Bonadiman, B. d. S. R., Dornelles, E. B., Trevisan, G., & da Cruz, I. B. M. (2018). Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *103*, 1253-1261.
- Athukoralalage, S. S., Balu, R., Dutta, N. K., & Roy Choudhury, N. (2019). 3D bioprinted nanocellulose-based hydrogels for tissue engineering applications: A brief review. *Polymers*, *11*(5), 898.
- Badhe, R. V., Chatterjee, A., Bijukumar, D., & Mathew, M. T. (2023). Current advancements in bio-ink technology for cartilage and bone tissue engineering. *Bone*, *171*, 116746.

- Badhe, R. V., & Nipate, S. S. (2020). Cellulosic materials as bioinks for 3D printing applications. In *Advanced 3D-Printed Systems and Nanosystems for Drug Delivery and Tissue Engineering* (pp. 109-137). Elsevier.
- Bahmani, M., Saki, K., Ezatpour, B., Shahsavari, S., Eftekhari, Z., Jelodari, M., . . . Sepahvand, R. (2015). Leishmaniosis phytotherapy: Review of plants used in Iranian traditional medicine on leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(9), 695-701.
- Barral, A., Petersen, E., Sacks, D., & Neva, F. (1983). Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 32(2), 277-285.
- Beldon, P. (2010). Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 28(9), 409-412.
- Bergonzi, C., Bianchera, A., Remaggi, G., Ossiprandi, M. C., Bettini, R., & Elvirri, L. (2023). 3D Printed Chitosan/Alginate Hydrogels for the Controlled Release of Silver Sulfadiazine in Wound Healing Applications: Design, Characterization and Antimicrobial Activity. *Micromachines*, 14(1), 137.
- Bezabh, S. A., Tesfaye, W., Christenson, J. K., Carson, C. F., & Thomas, J. (2022). Antiparasitic activity of tea tree oil (TTO) and its components against medically important ectoparasites: A systematic review. *Pharmaceutics*, 14(8), 1587.
- Bhattacharai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 83-99.
- Bianchi, M., & Carnevale, G. (2022). Innovative nanomaterials for biomedical applications. In (Vol. 12, pp. 1561): MDPI.
- Bom, S., Ribeiro, R., Ribeiro, H. M., Santos, C., & Marto, J. (2022). On the progress of hydrogel-based 3D printing: Correlating rheological properties with printing behaviour. *International Journal of Pharmaceutics*, 121506.
- Bozec, L., & Odlyha, M. (2011). Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. *Biophysical journal*, 101(1), 228-236.
- Bozkurt, Y., & Karayel, E. (2021). 3D printing technology; methods, biomedical applications, future opportunities and trends. *Journal of Materials Research and Technology*, 14, 1430-1450.
- Browne, M. P., Redondo, E., & Pumera, M. (2020). 3D printing for electrochemical energy applications. *Chemical reviews*, 120(5), 2783-2810.
- Cai, Y., Chang, S. Y., Gan, S. W., Ma, S., Lu, W. F., & Yen, C.-C. (2022). Nanocomposite bioinks for 3D bioprinting. *Acta Biomaterialia*.
- Capela, R., Moreira, R., & Lopes, F. (2019). An overview of drug resistance in protozoal diseases. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5748.
- Carvalho, P. d. F. S. (2019). Preparação e caracterização de géis de alginato, quitosana e nanoceluloses para aplicações biomédicas.
- Casalle, N., Grifoni, L. d. B. P., Mendes, A. C. B., Delort, S., & Massucato, E. M. S. (2020). Mucocutaneous leishmaniasis with rare manifestation in the nasal mucosa and cartilage bone septal. *Case Reports in Infectious Diseases*, 2020.
- Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., & Boccafoschi, F. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30, 1-10.
- Chen, G., Xu, Y., Kwok, P. C. L., & Kang, L. (2020). Pharmaceutical applications of 3D printing. *Additive Manufacturing*, 34, 101209.
- Chen, Z., Li, Z., Li, J., Liu, C., Lao, C., Fu, Y., . . . He, Y. (2019). 3D printing of ceramics: A review. *Journal of the European Ceramic Society*, 39(4), 661-687.

- Chimene, D., Kaunas, R., & Gaharwar, A. K. (2020). Hydrogel bioink reinforcement for additive manufacturing: a focused review of emerging strategies. *Advanced materials*, 32(1), 1902026.
- Chouhan, D., Dey, N., Bhardwaj, N., & Mandal, B. B. (2019). Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials*, 216, 119267.
- Cleetus, C. M., Alvarez Primo, F., Fregoso, G., Lalitha Raveendran, N., Noveron, J. C., Spencer, C. T., . . . Joddar, B. (2020). Alginate hydrogels with embedded ZnO nanoparticles for wound healing therapy. *International journal of nanomedicine*, 5097-5111.
- Cooke, M. E., & Rosenzweig, D. H. (2021). The rheology of direct and suspended extrusion bioprinting. *APL bioengineering*, 5(1), 011502.
- Cui, F.-x., Xue, C.-h., Li, Z.-j., Zhang, Y.-q., Dong, P., Fu, X.-y., & Gao, X. (2007). Characterization and subunit composition of collagen from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Chemistry*, 100(3), 1120-1125.
- da Fonsêca, J. H. L., & d'Ávila, M. A. (2021). Rheological behavior of carboxymethylcellulose and cellulose nanocrystal aqueous dispersions. *Rheologica Acta*, 60, 497-509.
- da Silva, C. E. d. L., Oyama, J., Ferreira, F. B. P., de Paula Lalucci-Silva, M. P., Lordani, T. V. A., da Silva, R. C. d. L., . . . Lonardoní, M. V. C. (2020). Effect of essential oils on *Leishmania amazonensis*: A systematic review. *Parasitology*, 147(13), 1392-1407.
- Daguano, J. K., Giora, F. C., Santos, K. F., Pereira, A. B., Souza, M. T., Dávila, J. L., . . . Silva, J. V. (2022). Shear-thinning sacrificial ink for fabrication of Biosilicate® osteoconductive scaffolds by material extrusion 3D printing. *Materials Chemistry and Physics*, 287, 126286.
- Das, D., Prakash, P., Rout, P. K., & Bhaladhare, S. (2021). Synthesis and Characterization of Superabsorbent Cellulose-Based Hydrogel for Agriculture Application. *Starch-Stärke*, 73(1-2), 1900284.
- Das, S. S., Hussain, K., Singh, S., Hussain, A., Faruk, A., & Tebyetekerwa, M. (2019). Laponite-based nanomaterials for biomedical applications: a review. *Current Pharmaceutical Design*, 25(4), 424-443.
- Dave, P. N., & Gor, A. (2018). Natural polysaccharide-based hydrogels and nanomaterials: Recent trends and their applications. *Handbook of nanomaterials for industrial applications*, 36-66.
- De France, K. J., Hoare, T., & Cranston, E. D. (2017). Review of hydrogels and aerogels containing nanocellulose. *Chemistry of Materials*, 29(11), 4609-4631.
- de Moraes, A. R. D. P., Tavares, G. D., Rocha, F. J. S., de Paula, E., & Giorgio, S. (2018). Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba-and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. *Experimental parasitology*, 187, 12-21.
- Deng, W., Tang, Y., Mao, J., Zhou, Y., Chen, T., & Zhu, X. (2021). Cellulose nanofibril as a crosslinker to reinforce the sodium alginate/chitosan hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 189, 890-899.
- Denton, H., McGREGOR, J. C., & Coombs, G. H. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochemical journal*, 381(2), 405-412.
- Domingues, R. M., Silva, M., Gershovich, P., Betta, S., Babo, P., Caridade, S. G., . . . Gomes, M. E. (2015). Development of injectable hyaluronic acid/cellulose

- nanocrystals bionanocomposite hydrogels for tissue engineering applications. *Bioconjugate chemistry*, 26(8), 1571-1581.
- Du, H., Liu, W., Zhang, M., Si, C., Zhang, X., & Li, B. (2019). Cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils based hydrogels for biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 209, 130-144.
- Dávila, J. L., Manzini, B. M., d'Ávila, M. A., & da Silva, J. V. L. (2022). Open-source syringe extrusion head for shear-thinning materials 3D printing. *Rapid Prototyping Journal*, 28(8), 1452-1461.
- Dávila, J. L., Manzini, B. M., da Fonsêca, J. H. L., Corzo, I. J. M., Neto, P. I., de Lima Montalvão, S. A., . . . da Silva, J. V. L. (2022). A parameterized g-code compiler for scaffolds 3D bioprinting. *Bioprinting*, 27, e00222.
- Ee, L. Y., & Li, S. F. Y. (2021). Recent advances in 3D printing of nanocellulose: structure, preparation, and application prospects. *Nanoscale Advances*, 3(5), 1167-1208.
- Farokhi, M., Jonidi Shariatzadeh, F., Solouk, A., & Mirzadeh, H. (2020). Alginate based scaffolds for cartilage tissue engineering: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 69(4), 230-247.
- Fu, Z., Naghieh, S., Xu, C., Wang, C., Sun, W., & Chen, X. (2021). Printability in extrusion bioprinting. *Biofabrication*, 13(3), 033001.
- Fuentes-Caparrós, A. M., Canales-Galarza, Z., Barrow, M., Dietrich, B., Lauger, J., Nemeth, M., . . . Adams, D. J. (2021). Mechanical characterization of multilayered hydrogels: A rheological study for 3D-printed systems. *Biomacromolecules*, 22(4), 1625-1638.
- Gao, T., Gillispie, G. J., Copus, J. S., Pr, A. K., Seol, Y.-J., Atala, A., . . . Lee, S. J. (2018). Optimization of gelatin–alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. *Biofabrication*, 10(3), 034106.
- Gaspar, P. E., Silva, J., de Carvalho, R., Amaral, C., Barud, H., & Amaral, A. (2021). Hyaluronic Acid/Laponite Clay Nanocomposites-Based Hydrogels for 3D Bioprinting Applications. *The FASEB Journal*, 35.
- Ge, Y., & Ge, M. (2015). Sustained broad-spectrum antimicrobial and haemostatic chitosan-based film with immersed tea tree oil droplets. *Fibers and Polymers*, 16, 308-318.
- Geanaliu-Nicolae, R.-E., & Andronescu, E. (2020). Blended natural support materials—collagen based hydrogels used in biomedicine. *Materials*, 13(24), 5641.
- Ghadimi, S. N., Sharifi, N., & Osanloo, M. (2020). The leishmanicidal activity of essential oils: a systematic review. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 9(4), 300-308.
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Kolahreez, D., Ramakrishna, S., & Williams, D. (2019). Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, 45-50.
- GhavamiNejad, A., Ashammakhi, N., Wu, X. Y., & Khademhosseini, A. (2020). Crosslinking strategies for 3D bioprinting of polymeric hydrogels. *Small*, 16(35), 2002931.
- Ghosh, B., Bhattacharya, D., & Mukhopadhyay, M. (2022). A hydrogel sheet mask with tea tree essential oil entrapment and targeted dose delivery capability. *Materials Today: Proceedings*, 57, 77-83.
- Gonzalez, J. S., Ludueña, L. N., Ponce, A., & Alvarez, V. A. (2014). Poly (vinyl alcohol)/cellulose nanowhiskers nanocomposite hydrogels for potential wound dressings. *Materials Science and Engineering: C*, 34, 54-61.

- Goonoo, N., Laetitia Huët, M. A., Chummun, I., Karuri, N., Badu, K., Gimié, F., . . . Bhaw-Luximon, A. (2022). Nanomedicine-based strategies to improve treatment of cutaneous leishmaniasis. *Royal Society Open Science*, *9*(6), 220058.
- Groll, J., Burdick, J. A., Cho, D.-W., Derby, B., Gelinsky, M., Heilshorn, S. C., . . . Nakayama, K. (2018). A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication*, *11*(1), 013001.
- Guo, Z., Dong, L., Xia, J., Mi, S., & Sun, W. (2021). 3D printing unique nanoclay-incorporated double-network hydrogels for construction of complex tissue engineering scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*, *10*(11), 2100036.
- Gupta, A., Simmons, W., Schueneman, G. T., Hylton, D., & Mintz, E. A. (2017). Rheological and thermo-mechanical properties of poly (lactic acid)/lignin-coated cellulose nanocrystal composites. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *5*(2), 1711-1720.
- Guvendiren, M., & Serpooshan, V. (2020). *3D Printing for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. MDPI.
- Göhl, J., Markstedt, K., Mark, A., Håkansson, K., Gatenholm, P., & Edelvik, F. (2018). Simulations of 3D bioprinting: predicting bioprintability of nanofibrillar inks. *Biofabrication*, *10*(3), 034105.
- Habib, A., & Khoda, B. (2019). Development of clay based novel hybrid bio-ink for 3D bio-printing process. *Journal of Manufacturing Processes*, *38*, 76-87.
- Haldar, D., & Purkait, M. K. (2020). Micro and nanocrystalline cellulose derivatives of lignocellulosic biomass: A review on synthesis, applications and advancements. *Carbohydrate polymers*, *250*, 116937.
- Hamed, H., Moradi, S., Hudson, S. M., & Tonelli, A. E. (2018). Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate polymers*, *199*, 445-460.
- Hami, A. M. (2022). A Study of the inhibitory effect of Terpinen-4-ol on Amastigote Forms of *Leishmania tropica* within Macrophages of Mouse in vitro. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN 1683-3597 E-ISSN 2521-3512)*, *31*(2), 233-236.
- Hao, Y., Zhao, W., Zhang, H., Zheng, W., & Zhou, Q. (2022). Carboxymethyl chitosan-based hydrogels containing fibroblast growth factors for triggering diabetic wound healing. *Carbohydrate Polymers*, *287*, 119336.
- He, X., & Lu, Q. (2022). Design and fabrication strategies of cellulose nanocrystal-based hydrogel and its highlighted application using 3D printing: A review. *Carbohydrate Polymers*, 120351.
- Hegab, H., Khanna, N., Monib, N., & Salem, A. (2023). Design for sustainable additive manufacturing: a review. *Sustainable Materials and Technologies*, e00576.
- Hu, T., & Lo, A. C. (2021). Collagen–Alginate Composite Hydrogel: Application in Tissue Engineering and Biomedical Sciences. *Polymers*, *13*(11), 1852.
- Hu, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, S., & Wang, J. (2019). Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomaterials science*, *7*(3), 843-855.
- Huang, H., Belwal, T., Aalim, H., Li, L., Lin, X., Liu, S., . . . Luo, Z. (2019). Protein-polysaccharide complex coated W/O/W emulsion as secondary microcapsule for hydrophilic arbutin and hydrophobic coumaric acid. *Food chemistry*, *300*, 125171.
- Huang, S., Hong, X., Zhao, M., Liu, N., Liu, H., Zhao, J., . . . Zhu, P. (2022). Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Bioengineering & Translational Medicine*, *7*(3), e10315.

- Huang, W., Wang, Y., Huang, Z., Wang, X., Chen, L., Zhang, Y., & Zhang, L. (2018). On-demand dissolvable self-healing hydrogel based on carboxymethyl chitosan and cellulose nanocrystal for deep partial thickness burn wound healing. *ACS applied materials & interfaces*, *10*(48), 41076-41088.
- Hudecki, A., Kiryczyński, G., & Łos, M. J. (2019). Biomaterials, definition, overview. In *Stem cells and biomaterials for regenerative medicine* (pp. 85-98). Elsevier.
- Hull, C. (1986). Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. US 4575330 A, Google Patents. In.
- Hussain, Z., Thu, H. E., Shuid, A. N., Katas, H., & Hussain, F. (2018). Recent advances in polymer-based wound dressings for the treatment of diabetic foot ulcer: an overview of state-of-the-art. *Current drug targets*, *19*(5), 527-550.
- Iurciuc, C.-E., Atanase, L. I., & Popa, M. PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF CARBOXYMETHYL CELLULOSE. *CARBOXYMETHYL CELLULOSE*, *73*.
- Jafari, M., Nourbakhsh, M. S., Salati, A., & Farrokhi, A. S. (2022). Synthesis and Characterization of Paramomycin-loaded CoFe₂O₄/Polyethylene Glycol–Poly (Lactic-co-glycolic Acid) Core-Shell Spheres for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, *61*(3), 425-438.
- Jain, P., Kathuria, H., & Dubey, N. (2022). Advances in 3D bioprinting of tissues/organs for regenerative medicine and in-vitro models. *Biomaterials*, *287*, 121639.
- Jang, T.-S., Jung, H.-D., Pan, H. M., Han, W. T., Chen, S., & Song, J. (2018). 3D printing of hydrogel composite systems: Recent advances in technology for tissue engineering. *International Journal of Bioprinting*, *4*(1).
- Jiang, T., Munguia-Lopez, J. G., Flores-Torres, S., Kort-Mascort, J., & Kinsella, J. M. (2019). Extrusion bioprinting of soft materials: An emerging technique for biological model fabrication. *Applied Physics Reviews*, *6*(1), 011310.
- Junior, E. A. P., Davila, J. L., & d'Avila, M. A. (2019). Rheological studies on nanocrystalline cellulose/alginate suspensions. *Journal of Molecular Liquids*, *277*, 418-423.
- Júnior, Z. S. S., Botta, S. B., Ana, P. A., França, C. M., Fernandes, K. P. S., Mesquita-Ferrari, R. A., . . . Bussadori, S. K. (2015). Effect of papain-based gel on type I collagen-spectroscopy applied for microstructural analysis. *Scientific reports*, *5*(1), 1-7.
- Kaye, P. M., Cruz, I., Picado, A., Van Bocxlaer, K., & Croft, S. L. (2020). Leishmaniasis immunopathology—impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. *Seminars in immunopathology*,
- Kačarević, Ž. P., Rider, P. M., Alkildani, S., Retnasingh, S., Smeets, R., Jung, O., . . . Barbeck, M. (2018). An introduction to 3D bioprinting: possibilities, challenges and future aspects. *Materials*, *11*(11), 2199.
- Krishna, D. V., & Sankar, M. R. (2023). Extrusion based bioprinting of alginate based multicomponent hydrogels for tissue regeneration applications: State of the art. *Materials Today Communications*, 105696.
- Kumar, R., & Kumar, R. (2020). 3D printing of food materials: A state of art review and future applications. *Materials Today: Proceedings*, *33*, 1463-1467.
- Lam, N. S., Long, X., Su, X.-z., & Lu, F. (2020). Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and its monoterpene constituents in treating protozoan and helminthic infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *130*, 110624.
- Lavoine, N., Givord, C., Tabary, N., Desloges, I., Martel, B., & Bras, J. (2014). Elaboration of a new antibacterial bio-nano-material for food-packaging by

- synergistic action of cyclodextrin and microfibrillated cellulose. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 330-340.
- Le, T. B., Beaufay, C., Bonneau, N., Mingot-Leclercq, M.-P., & Quetin-Leclercq, J. (2018). Anti-protozoal activity of essential oils and their constituents against Leishmania, Plasmodium and Trypanosoma. *Phytochimie*, 1, 1-33.
- Lewis, P. L., Green, R. M., & Shah, R. N. (2018). 3D-printed gelatin scaffolds of differing pore geometry modulate hepatocyte function and gene expression. *Acta biomaterialia*, 69, 63-70.
- Li, J., Wu, C., Chu, P. K., & Gelinsky, M. (2020). 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 140, 100543.
- Li, N., Guo, R., & Zhang, Z. J. (2021). Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 630488.
- Li, Y., Dong, X., Yao, L., Wang, Y., Wang, L., Jiang, Z., & Qiu, D. (2023). Preparation and characterization of nanocomposite hydrogels based on self-assembling collagen and cellulose nanocrystals. *Polymers*, 15(5), 1308.
- Lindman, B., Medronho, B., Alves, L., Norgren, M., & Nordenskiöld, L. (2021). Hydrophobic interactions control the self-assembly of DNA and cellulose. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 54, e3.
- Liu, H., Zhou, H., Lan, H., & Liu, T. (2017). Organ regeneration: Integration application of cell encapsulation and 3D bioprinting. *Virtual and Physical Prototyping*, 12(4), 279-289.
- Maines, E. M., Porwal, M. K., Ellison, C. J., & Reineke, T. M. (2021). Sustainable advances in SLA/DLP 3D printing materials and processes. *Green Chemistry*, 23(18), 6863-6897.
- Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J., . . . Hutmacher, D. W. (2013). 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced materials*, 25(36), 5011-5028.
- Mallakpour, S., Azadi, E., & Hussain, C. M. (2021). State-of-the-art of 3D printing technology of alginate-based hydrogels—An emerging technique for industrial applications. *Advances in colloid and interface science*, 293, 102436.
- Marques, C., Diogo, G., Pina, S., Oliveira, J. M., Silva, T., & Reis, R. (2019). Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: A comprehensive review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30, 1-12.
- Martinez, D. W., Espino, M. T., Cascolan, H. M., Crisostomo, J. L., & Dizon, J. R. C. (2022). A Comprehensive Review on the Application of 3D Printing in the Aerospace Industry. *Key Engineering Materials*, 913, 27-34.
- Matai, I., Kaur, G., Seyedsalehi, A., McClinton, A., & Laurencin, C. T. (2020). Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*, 226, 119536.
- Melo, M. T. d. (2019). *Preparo, caracterização e aplicação em engenharia de tecidos de suportes de alginato/quitosana, associados a processos fotodinâmicos para fotobioestimulação* [Universidade de São Paulo].
- Mikus, J., Harkenthal, M., Steverding, D., & Reichling, J. (2000). In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on Leishmania major and Trypanosoma brucei. *Planta Medica*, 66(04), 366-368.
- Mironov, V. (2003). Printing technology to produce living tissue. In (Vol. 3, pp. 701-704): Taylor & Francis.

- Mironov, V., Markwald, R. R., & Forgacs, G. (2003). ORGAN PRINTING: SELF-ASSEMBLING CELL AGGREGATES AS "BIOINK". *Science and Medicine*, 9(2), 69-71.
- Mokni, M. (2019). Cutaneous leishmaniasis. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*,
- Morrison, F. A. (2001). Understanding rheology. (*No Title*).
- Mu, X., Agostinacchio, F., Xiang, N., Pei, Y., Khan, Y., Guo, C., . . . Kaplan, D. L. (2021). Recent advances in 3D printing with protein-based inks. *Progress in polymer science*, 115, 101375.
- Munoz-Perez, E., Perez-Valle, A., Igartua, M., Santos-Vizcaino, E., & Hernandez, R. M. (2023). High resolution and fidelity 3D printing of Laponite and alginate ink hydrogels for tunable biomedical applications. *Biomaterials Advances*, 149, 213414.
- Murali, A., Lokhande, G., Deo, K. A., Brokesh, A., & Gaharwar, A. K. (2021). Emerging 2D nanomaterials for biomedical applications. *Materials Today*, 50, 276-302.
- Naghieh, S., & Chen, X. (2021). Printability—A key issue in extrusion-based bioprinting. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(5), 564-579.
- Naghieh, S., Karamooz-Ravari, M. R., Sarker, M., Karki, E., & Chen, X. (2018). Influence of crosslinking on the mechanical behavior of 3D printed alginate scaffolds: Experimental and numerical approaches. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 80, 111-118.
- Naseri, N., Deepa, B., Mathew, A. P., Oksman, K., & Girandon, L. (2016). Nanocellulose-based interpenetrating polymer network (IPN) hydrogels for cartilage applications. *Biomacromolecules*, 17(11), 3714-3723.
- Naveed, M., Phil, L., Sohail, M., Hasnat, M., Baig, M. M. F. A., Ihsan, A. U., . . . Akabar, M. (2019). Chitosan oligosaccharide (COS): An overview. *International journal of biological macromolecules*, 129, 827-843.
- Nazir, A., Gokcekaya, O., Billah, K. M. M., Ertugrul, O., Jiang, J., Sun, J., & Hussain, S. (2023). Multi-material additive manufacturing: A systematic review of design, properties, applications, challenges, and 3D printing of materials and cellular metamaterials. *Materials & Design*, 111661.
- Ndlovu, S. P., Ngece, K., Alven, S., & Aderibigbe, B. A. (2021). Gelatin-based hybrid scaffolds: promising wound dressings. *Polymers*, 13(17), 2959.
- Neves, M. I., Moroni, L., & Barrias, C. C. (2020). Modulating alginate hydrogels for improved biological performance as cellular 3D microenvironments. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 665.
- Ng, W. L., Chua, C. K., & Shen, Y.-F. (2019). Print me an organ! Why we are not there yet. *Progress in Polymer Science*, 97, 101145.
- Nocera, A. D., Comín, R., Salvatierra, N. A., & Cid, M. P. (2018). Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. *Biomedical Microdevices*, 20, 1-13.
- Nurhudan, A. I., Supriadi, S., Whulanza, Y., & Saragih, A. S. (2021). Additive manufacturing of metallic based on extrusion process: A review. *Journal of Manufacturing Processes*, 66, 228-237.
- O'Donoghue, J., O'sullivan, S., Beausang, E., Panchal, J., O'Shaughnessy, M., & O'connor, T. (1997). Calcium alginate dressings promote healing of split skin graft donor sites. *Acta Chirurgiae Plasticae*, 39(2), 53-55.
- Oliveira, S. S., Marques, C. S., de Sousa, D. P., Andrade, L. N., Fricks, A. T., Jain, S., . . . Severino, P. (2021). Analysis of the mechanisms of action of isopentenyl caffate against Leishmania. *Biochimie*, 189, 158-167.

- Ooi, S. Y., Ahmad, I., & Amin, M. C. I. M. (2016). Cellulose nanocrystals extracted from rice husks as a reinforcing material in gelatin hydrogels for use in controlled drug delivery systems. *Industrial Crops and Products*, *93*, 227-234.
- Osidak, E. O., Kozhukhov, V. I., Osidak, M. S., & Domogatsky, S. P. (2020). Collagen as bioink for bioprinting: A comprehensive review. *International journal of bioprinting*, *6*(3).
- Ozbolat, I. T., & Hospodiuk, M. (2016). Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, *76*, 321-343.
- O'Connell, C., Ren, J., Pope, L., Li, Y., Mohandas, A., Blanchard, R., . . . Onofrillo, C. (2020). Characterizing bioinks for extrusion bioprinting: printability and rheology. *3D Bioprinting: Principles and Protocols*, 111-133.
- PAHO, P. (2022). Guideline for the Treatment of Leishmaniasis in the Americas. In: PAHO.
- Palaganas, N. B., Mangadlao, J. D., de Leon, A. C. C., Palaganas, J. O., Pangilinan, K. D., Lee, Y. J., & Advincula, R. C. (2017). 3D printing of photocurable cellulose nanocrystal composite for fabrication of complex architectures via stereolithography. *ACS applied materials & interfaces*, *9*(39), 34314-34324.
- Panayi, N. C. (2023). 3D printing of in office custom-made brackets: Concept, Design, Production and Evidence. *Seminars in Orthodontics*,
- Park, S., Shou, W., Makatura, L., Matusik, W., & Fu, K. K. (2022). 3D printing of polymer composites: Materials, processes, and applications. *Matter*, *5*(1), 43-76.
- Park, W., Shin, H., Choi, B., Rhim, W.-K., Na, K., & Han, D. K. (2020). Advanced hybrid nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*, *114*, 100686.
- Patel, S., Srivastava, S., Singh, M. R., & Singh, D. (2019). Mechanistic insight into diabetic wounds: Pathogenesis, molecular targets and treatment strategies to pace wound healing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *112*, 108615.
- Petta, D., D'amora, U., Ambrosio, L., Grijpma, D., Eglin, D., & D'este, M. (2020). Hyaluronic acid as a bioink for extrusion-based 3D printing. *Biofabrication*, *12*(3), 032001.
- Piao, Y., You, H., Xu, T., Bei, H.-P., Piwko, I. Z., Kwan, Y. Y., & Zhao, X. (2021). Biomedical applications of gelatin methacryloyl hydrogels. *Engineered Regeneration*, *2*, 47-56.
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., . . . Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(12), e0006052.
- Pourjavadi, A., Doroudian, M., Bagherifard, M., & Bahmanpour, M. (2020). Magnetic and light-responsive nanogels based on chitosan functionalized with Au nanoparticles and poly (N-isopropylacrylamide) as a remotely triggered drug carrier. *New Journal of Chemistry*, *44*(40), 17302-17312.
- Pérez, M., Carou, D., Rubio, E. M., & Teti, R. (2020). Current advances in additive manufacturing. *Procedia Cirp*, *88*, 439-444.
- Quan, H., Zhang, T., Xu, H., Luo, S., Nie, J., & Zhu, X. (2020). Photo-curing 3D printing technique and its challenges. *Bioactive materials*, *5*(1), 110-115.
- Rajabi, M., McConnell, M., Cabral, J., & Ali, M. A. (2021). Chitosan hydrogels in 3D printing for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, *260*, 117768.
- Rastogi, P., & Kandasubramanian, B. (2019). Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication*, *11*(4), 042001.

- Rezvani Ghomi, E., Nourbakhsh, N., Akbari Kenari, M., Zare, M., & Ramakrishna, S. (2021). Collagen-based biomaterials for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(12), 1986-1999.
- Rinaudc, M., Pavlov, G., & Desbrieres, J. (1999). Solubilization of chitosan in strong acid medium. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 5(3), 267-276.
- Rosa, L. B., Aires, R. L., Oliveira, L. S., Fontes, J. V., Miguel, D. C., & Abbehausen, C. (2021). A “Golden Age” for the discovery of new antileishmanial agents: Current status of leishmanicidal gold complexes and prospective targets beyond the trypanothione system. *ChemMedChem*, 16(11), 1682-1696.
- Ryan, K. R., Down, M. P., & Banks, C. E. (2021). Future of additive manufacturing: Overview of 4D and 3D printed smart and advanced materials and their applications. *Chemical Engineering Journal*, 403, 126162.
- Rymarczyk, J. (2020). Technologies, opportunities and challenges of the industrial revolution 4.0: theoretical considerations. *Entrepreneurial business and economics review*, 8(1), 185-198.
- Sacco, P., Furlani, F., De Marzo, G., Marsich, E., Paoletti, S., & Donati, I. (2018). Concepts for developing physical gels of chitosan and of chitosan derivatives. *Gels*, 4(3), 67.
- Sachyani Keneth, E., Kamyshny, A., Totaro, M., Beccai, L., & Magdassi, S. (2021). 3D printing materials for soft robotics. *Advanced Materials*, 33(19), 2003387.
- Sahranavard, M., Zamanian, A., Ghorbani, F., & Shahrezaee, M. H. (2020). A critical review on three dimensional-printed chitosan hydrogels for development of tissue engineering. *Bioprinting*, 17, e00063.
- Salomé Machado, A., Martins, V. d. C. A., & Plepis, A. M. d. G. (2002). Thermal and rheological behavior of collagen. Chitosan blends. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 67, 491-498.
- Santana, W., de Oliveira, S. S., Ramos, M. H., Santos, A. L., Dolabella, S. S., Souto, E. B., . . . Jain, S. (2021). Exploring Innovative Leishmaniasis Treatment: Drug Targets from Pre-Clinical to Clinical Findings. *Chemistry & Biodiversity*, 18(9), e2100336.
- Santos, S. S., de Araujo, R. V., Giarolla, J., El Seoud, O., & Ferreira, E. I. (2020). Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. *International journal of antimicrobial agents*, 55(4), 105906.
- Santra, T. S., & Mohan, L. (2021). *Nanomaterials and their biomedical applications*. Springer.
- Schwab, A., Levato, R., D’Este, M., Piluso, S., Eglin, D., & Malda, J. (2020). Printability and shape fidelity of bioinks in 3D bioprinting. *Chemical reviews*, 120(19), 11028-11055.
- Sen, C. K. (2019). Human wounds and its burden: an updated compendium of estimates. In (Vol. 8, pp. 39-48): Mary Ann Liebert, Inc., publishers 140 Huguenot Street, 3rd Floor New . . .
- Seoane-Viaño, I., Januskaite, P., Alvarez-Lorenzo, C., Basit, A. W., & Goyanes, A. (2021). Semi-solid extrusion 3D printing in drug delivery and biomedicine: Personalised solutions for healthcare challenges. *Journal of Controlled Release*, 332, 367-389.
- Severino, P., Santana, W., Lisboa, E. S., Santos, V. L. d., Lima, E. T. d. S., Cardoso, J. C., . . . Souto, E. B. (2022). Cutaneous/Mucocutaneous Leishmaniasis Treatment

- for Wound Healing: Classical versus New Treatment Approaches. *Microbiology Research*, 13(4), 836-852.
- Shahbazi, M., & Jäger, H. (2020). Current status in the utilization of biobased polymers for 3D printing process: a systematic review of the materials, processes, and challenges. *ACS Applied Bio Materials*, 4(1), 325-369.
- Shaheen, T. I., Montaser, A., & Li, S. (2019). Effect of cellulose nanocrystals on scaffolds comprising chitosan, alginate and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 121, 814-821.
- Shakeel, M., Kiani, M. H., Sarwar, H. S., Akhtar, S., Rauf, A., Ibrahim, I. M., . . . Díez-Pascual, A. M. (2023). Emulgel-loaded mannosylated thiolated chitosan-coated silver nanoparticles for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 227, 1293-1304.
- Sharma, M., Aguado, R., Murtinho, D., Valente, A. J., De Sousa, A. P. M., & Ferreira, P. J. (2020). A review on cationic starch and nanocellulose as paper coating components. *International journal of biological macromolecules*, 162, 578-598.
- Sharma, P. R., Sharma, S. K., Lindström, T., & Hsiao, B. S. (2020). Nanocellulose-enabled membranes for water purification: perspectives. *Advanced Sustainable Systems*, 4(5), 1900114.
- Siqueira, P., Siqueira, É., De Lima, A. E., Siqueira, G., Pinzón-Garcia, A. D., Lopes, A. P., . . . Botaro, V. R. (2019). Three-dimensional stable alginate-nanocellulose gels for biomedical applications: Towards tunable mechanical properties and cell growing. *Nanomaterials*, 9(1), 78.
- Smandri, A., Nordin, A., Hwei, N. M., Chin, K.-Y., Abd Aziz, I., & Fauzi, M. B. (2020). Natural 3D-printed bioinks for skin regeneration and wound healing: A systematic review. *Polymers*, 12(8), 1782.
- Soeiro, V. S., Silva-Carvalho, R., Martins, D., Parpot, P., Grotto, D., Chaud, M. V., . . . Jozala, A. F. (2021). Alginate-amphotericin B nanocomplexes covered by nanocrystals from bacterial cellulose: Physico-chemical characterization and in vitro toxicity. *Scientific Reports*, 11(1), 1-8.
- Sood, A., Dev, A., Das, S. S., Kim, H. J., Kumar, A., Thakur, V. K., & Han, S. S. (2023). Curcumin-loaded alginate hydrogels for cancer therapy and wound healing applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123283.
- Souto, E. B., Dias-Ferreira, J., Craveiro, S. A., Severino, P., Sanchez-Lopez, E., Garcia, M. L., . . . Mahant, S. (2019). Therapeutic interventions for countering leishmaniasis and chagas's disease: from traditional sources to nanotechnological systems. *Pathogens*, 8(3), 119.
- Sundar, G., Joseph, J., John, A., & Abraham, A. (2021). Natural collagen bioscaffolds for skin tissue engineering strategies in burns: a critical review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(9), 593-604.
- Supramaniam, J., Adnan, R., Kaus, N. H. M., & Bushra, R. (2018). Magnetic nanocellulose alginate hydrogel beads as potential drug delivery system. *International journal of biological macromolecules*, 118, 640-648.
- Szefer, E., Leszczyńska, A., Hebda, E., & Pielichowski, K. (2021). The application of cellulose nanocrystals modified with succinic anhydride under the microwave irradiation for preparation of polylactic acid nanocomposites. *Journal of Renewable Materials*, 9(6), 1127-1142.
- Sánchez-Fernández, J. A., Presbítero-Espinosa, G., Peña-Parás, L., Pizaña, E. I. R., Galván, K. P. V., Vopálenský, M., . . . Elizalde-Herrera, L. E. (2021).

- Characterization of Sodium Alginate Hydrogels Reinforced with Nanoparticles of Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Polymers*, 13(17), 2927.
- Tabriz, A. G., & Douroumis, D. (2022). Recent advances in 3D printing for wound healing: A systematic review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 103564.
- Tang, Y., Yang, S., Zhang, N., & Zhang, J. (2014). Preparation and characterization of nanocrystalline cellulose via low-intensity ultrasonic-assisted sulfuric acid hydrolysis. *Cellulose*, 21, 335-346.
- Tapia, C., Escobar, Z., Costa, E., Sapag-Hagar, J., Valenzuela, F., Basualto, C., . . . Yazdani-Pedram, M. (2004). Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan–alginate and chitosan–carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 65-75.
- Thakar, C. M., Parkhe, S. S., Jain, A., Phasinam, K., Murugesan, G., & Ventayen, R. J. M. (2022). 3d Printing: Basic principles and applications. *Materials Today: Proceedings*, 51, 842-849.
- Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *Journal of Parasitic Diseases*, 44, 253-272.
- Townsend, J. M., Beck, E. C., Gehrke, S. H., Berkland, C. J., & Detamore, M. S. (2019). 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*, 91, 126-140.
- Tuazon, B. J., Custodio, N. A. V., Basuel, R. B., Delos Reyes, L. A., & Dizon, J. R. C. (2022). 3D Printing Technology and Materials for Automotive Application: A Mini-Review. *Key Engineering Materials*, 913, 3-16.
- Tümer, E. H., & Erbil, H. Y. (2021). Extrusion-based 3d printing applications of pla composites: A review. *Coatings*, 11(4), 390.
- Ulag, S., Kalkandelen, C., Oktar, F. N., Uzun, M., Sahin, Y. M., Karademir, B., . . . Gunduz, O. (2019). 3D printing artificial blood vessel constructs using PCL/chitosan/hydrogel biocomposites. *ChemistrySelect*, 4(8), 2387-2391.
- Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., & Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 11(11), 2786.
- Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Kanikireddy, V., Toro, C., & Sadiku, E. R. (2020). Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. *Carbohydrate polymers*, 236, 116025.
- Varma, M. V., Kandasubramanian, B., & Ibrahim, S. M. (2020). 3D printed scaffolds for biomedical applications. *Materials Chemistry and Physics*, 255, 123642.
- Vineeth, S., Gadhav, R. V., & Gadekar, P. T. (2019). Nanocellulose applications in wood adhesives. *Open Journal of Polymer Chemistry*, 9(4), 63-75.
- Voo, W.-P., Lee, B.-B., Idris, A., Islam, A., Tey, B.-T., & Chan, E.-S. (2015). Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile. *RSC Advances*, 5(46), 36687-36695.
- Wagner, W. R., Sakiyama-Elbert, S. E., Zhang, G., & Yaszemski, M. J. (2020). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic Press.
- Wang, C., Bai, J., Tian, P., Xie, R., Duan, Z., Lv, Q., & Tao, Y. (2021). The application status of nanoscale cellulose-based hydrogels in tissue engineering and regenerative biomedicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 732513.

- Wang, J., Liu, Y., Fan, Z., Wang, W., Wang, B., & Guo, Z. (2019). Ink-based 3D printing technologies for graphene-based materials: a review. *Advanced composites and hybrid materials*, 2, 1-33.
- Wang, K., Nune, K., & Misra, R. (2016). The functional response of alginate-gelatin-nanocrystalline cellulose injectable hydrogels toward delivery of cells and bioactive molecules. *Acta biomaterialia*, 36, 143-151.
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F.-J., & Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends in plant science*, 21(8), 699-712.
- Wang, T., Yi, W., Zhang, Y., Wu, H., Fan, H., Zhao, J., & Wang, S. (2023). Sodium alginate hydrogel containing platelet-rich plasma for wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 222, 113096.
- Williams, D. F. (1999). *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press.
- Wróblewska-Krepsztul, J., Rydzkowski, T., Michalska-Požoga, I., & Thakur, V. K. (2019). Biopolymers for biomedical and pharmaceutical applications: Recent advances and overview of alginate electrospinning. *Nanomaterials*, 9(3), 404.
- Xing, L., Sun, J., Tan, H., Yuan, G., Li, J., Jia, Y., . . . Ling, Z. (2019). Covalently polysaccharide-based alginate/chitosan hydrogel embedded alginate microspheres for BSA encapsulation and soft tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 127, 340-348.
- Yadid, M., Oved, H., Silberman, E., & Dvir, T. (2022). Bioengineering approaches to treat the failing heart: From cell biology to 3D printing. *Nature Reviews Cardiology*, 19(2), 83-99.
- Yan, H., Huang, D., Chen, X., Liu, H., Feng, Y., Zhao, Z., . . . Lin, Q. (2018). A novel and homogeneous scaffold material: preparation and evaluation of alginate/bacterial cellulose nanocrystals/collagen composite hydrogel for tissue engineering. *Polymer Bulletin*, 75, 985-1000.
- Yang, J., Xu, F., & Han, C.-R. (2017). Metal ion mediated cellulose nanofibrils transient network in covalently cross-linked hydrogels: mechanistic insight into morphology and dynamics. *Biomacromolecules*, 18(3), 1019-1028.
- Zamboulis, A., Michailidou, G., Koumentakou, I., & Bikiaris, D. N. (2022). Polysaccharide 3D printing for drug delivery applications. *Pharmaceutics*, 14(1), 145.
- Zandi, N., Sani, E. S., Mostafavi, E., Ibrahim, D. M., Saleh, B., Shokrgozar, M. A., . . . Annabi, N. (2021). Nanoengineered shear-thinning and bioprintable hydrogel as a versatile platform for biomedical applications. *Biomaterials*, 267, 120476.
- Zhang, H., Huang, L., Tan, M., Zhao, S., Liu, H., Lu, Z., . . . Liang, Z. (2022). Overview of 3d-printed silica glass. *Micromachines*, 13(1), 81.
- Zhang, J., Wehrle, E., Rubert, M., & Müller, R. (2021). 3D Bioprinting of human tissues: Biofabrication, bioinks, and bioreactors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3971.
- Zhang, L. G., Leong, K., & Fisher, J. P. (2022). *3D bioprinting and nanotechnology in tissue engineering and regenerative medicine*. academic press.
- Zhang, X., Liu, Y., Luo, C., Zhai, C., Li, Z., Zhang, Y., . . . Fan, W. (2021). Crosslinker-free silk/decellularized extracellular matrix porous bioink for 3D bioprinting-based cartilage tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111388.
- Zhang, X. N., Zheng, Q., & Wu, Z. L. (2022). Recent advances in 3D printing of tough hydrogels: A review. *Composites Part B: Engineering*, 109895.

- Zhang, Y., Liu, Y., Li, R., Ren, X., & Huang, T. S. (2019). Preparation and characterization of antimicrobial films based on nanocrystalline cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, *136*(8), 47101.
- Zhang, Z., Jin, Y., Yin, J., Xu, C., Xiong, R., Christensen, K., . . . Huang, Y. (2018). Evaluation of bioink printability for bioprinting applications. *Applied Physics Reviews*, *5*(4), 041304.
- Zhao, H., Liu, M., Zhang, Y., Yin, J., & Pei, R. (2020). Nanocomposite hydrogels for tissue engineering applications. *Nanoscale*, *12*(28), 14976-14995.
- Zhao, X., Wang, X., & Lou, T. (2021). Preparation of fibrous chitosan/sodium alginate composite foams for the adsorption of cationic and anionic dyes. *Journal of Hazardous Materials*, *403*, 124054.
- Zhu, J., Wu, P., Chao, Y., Yu, J., Zhu, W., Liu, Z., & Xu, C. (2022). Recent advances in 3D printing for catalytic applications. *Chemical Engineering Journal*, *433*, 134341.
- Zou, F., Sun, X., & Wang, X. (2019). Elastic, hydrophilic and biodegradable poly (1, 8-octanediol-co-citric acid)/polylactic acid nanofibrous membranes for potential wound dressing applications. *Polymer Degradation and Stability*, *166*, 163-173.