



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

LUCAS HENRIQUE VELOSO DE SANTANA

**PRODUÇÃO DE IMPRESSORA 3D E BIOMATERIAL À BASE DE POLÍMEROS
NATURAIS PARA A IMPRESSÃO DE ARCABOUÇOS CELULARES**

Recife
2023

LUCAS HENRIQUE VELOSO DE SANTANA

**PRODUÇÃO DE IMPRESSORA 3D E BIOMATERIAL À BASE DE POLÍMEROS
NATURAIS PARA A IMPRESSÃO DE ARCABOUÇOS CELULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara.

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Sampaio de Andrade Lima.

Recife

2023

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

S232p

Santana, Lucas Henrique Veloso de.

Produção de impressora 3D e biomaterial à base de polímeros naturais para a impressão de arcabouços celulares / Lucas Henrique Veloso de Santana. – 2023.
119 f.: il., fig., tab. e siglas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara.

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Sampaio de Andrade Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, 2023.

Inclui Referências e Apêndices.

1. Engenharia Biomédica. 2. Biomaterial. 3. Impressão 3D. 4. Arcabouço celular. I. Yara, Ricardo (Orientador). II. Lima, Claudia Sampaio de Andrade (Coorientadora). III. Título.

UFPE

610.26 CDD (22. ed.)

BCTG/2024-79

LUCAS HENRIQUE VELOSO DE SANTANA

**PRODUÇÃO DE IMPRESSORA 3D E BIOMATERIAL À BASE DE POLÍMEROS
NATURAIS PARA A IMPRESSÃO DE ARCABOUÇOS CELULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Engenharia Biomédica. Área de concentração: Bioengenharia.

Aprovada em: 05/10/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Yara (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Cristine Martins Gomes de Gusmão (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fernando Jose Ribeiro Sales (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico o presente trabalho aos meus pais e a minha noiva por todo o apoio recebido durante o curso do mestrado e a todos os envolvidos na formação da minha educação e ao corpo responsável pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Ricardo Yara pela oportunidade e por ter trilhado essa jornada comigo. À todo o corpo do Laboratório de Biofísica Química, em especial à Prof. Dr^a. Claudia S. de A. Lima por me aceitarem eu seu laboratório e por todo o apoio prestado. Aos meus colegas de laboratório, em especial Alexandre, Paulo, Carol, Bruna, Diogo, Bruna e Beatriz. À Coordenação do curso de graduação em Engenharia Civil do Instituto Federal de Pernambuco na pessoa de seu coordenador, prof. Dr. Ângelo Peixoto da Costa.

À todo o corpo do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

O alginato é um biomaterial com diversas aplicações científicas e industriais devido às suas propriedades e seu baixo custo de aquisição. Biomateriais à base de alginato são amplamente utilizados na indústria alimentícia, em sistemas de liberação controlada de medicamentos e na engenharia de tecidos. O colágeno é o composto mais abundante nos tecidos cartilagosos e pode ser encontrado na pele, tendões, ligamentos e ossos. A agarose é um polissacarídeo biocompatível com aplicações principalmente nas áreas farmacêutica, alimentícia e biotecnológica. Arcabouços celulares como meio para adesão e proliferação celular com a finalidade de mimetizar tecidos vivos são aplicados rotineiramente na engenharia de tecidos. Metodologias de impressão 3D se popularizaram na última década. Tal tecnologia amplia as possibilidades de aplicação do alginato na engenharia de tecidos. Precisão, automação e velocidade de prototipagem são pontos chave desta metodologia de produção. O presente trabalho se propõe a desenvolver impressora 3D e biomaterial à base de polímeros naturais para a impressão 3D de arcabouços celulares.

Palavras-chave: biomaterial; impressão 3D; arcabouço celular.

ABSTRACT

Alginate is a biomaterial with a plethora of scientific and industrial applications due to its properties and low acquisition costs. Alginate-based biomaterials are widely used on the food industry, controlled drug release systems and tissue engineering. Collagen is the most abundant compound in cartilaginous tissues and can be found in the skin, tendons, ligaments and bones. Agarose is a biocompatible polysaccharide with applications mainly in the pharmaceutical, food and biotechnology areas. The use of scaffolds as a means for cell adhesion and proliferation in order to mimic living tissue is recurrent in tissue engineering. 3D printing methodologies have become popular in the last decade. This technology expands the possibilities for applying alginate in tissue engineering. Accuracy, automation and fast prototyping speed are key points in the manufacture methodology. This work aims to develop a 3D printer and a natural polymer-based biomaterial suited for printing scaffolds.

Keywords: biomaterial; 3D printing; scaffold.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura química do alginato (blocos G, M e MG)	22
Figura 2 -	Hidrogel de alginato preparado através da reticulação iônica	26
Figura 3 -	Estrutura das fibras de colágeno	29
Fluxograma 1-	Obtenção de fibra de colágeno, colágeno hidrolisado e colágeno parcialmente hidrolisado	31
Figura 4 -	Monômero de agarose	32
Figura 5 -	Métodos de fabricação	34
Figura 6 -	Modelo CAD	36
Figura 7 -	Modelo exemplificativo de uma impressora por FDM	38
Figura 8 -	Estrutura interna de peça impressa por FDM	38
Figura 9 -	Processo de impressão <i>bottom-up</i>	39
Figura 10 -	Processo de impressão <i>top-down</i>	40
Figura 11 -	Impressão por SLS	41
Figura 12 -	Impressão por jato de material	42
Figura 13 -	Placa Arduino Mega 2560, <i>shield Ramps 1.4</i> e <i>drivers A4988</i>	47
Figura 14 -	Projeto CAD da impressora 3D	47
Figura 15 -	Modelo CAD criado para impressão	50
Figura 16 -	Interface gráfica do Slic3r	51
Figura 17 -	Interface gráfica do Pronterface	51
Figura 18 -	(a) biomaterial com maior concentração de alginato. (b) biomaterial com menor concentração de alginato	54
Figura 19 -	Primeiros testes de impressão	55
Figura 20 -	(a) Arcabouço impresso com o biomaterial que apresenta maiores quantidades de alginato, gelatina e glicerol. (b) Trajetórias definidas para a impressão.	56
Figura 21 -	Ponteira de micropipeta utilizada como bico extrusor da impressora	57
Figura 22 -	(a) Seringa de biomaterial com bolhas em seu interior. (b) Seringa com pressão aplicada. (c) Sistema de extrusão sem	58

	a presença de bolhas	
Figura 23 -	(a) Delimitação da área de impressão e deposição da primeira camada. (b) Deposição completa das camadas do arcabouço. (c) Arcabouço imerso em solução de cloreto de Cálcio. (d) Arcabouço completamente impresso	59
Figura 24 -	Impressão realizada com maior velocidade de impressão	60
Figura 25 -	Gráfico do espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do alginato de sódio (pó).	61
Figura 26 -	Gráfico do espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier da gelatina.	61
Figura 27 -	Gráfico do espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier da agarose.	62
Figura 28 -	Gráfico do espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do glicerol.	62
Figura 29 -	Gráficos de espectro de absorção na região do infravermelho com transformada dos: (a) biomaterial produzido, (b) seção externa do arcabouço impresso, (c) seção interna do arcabouço impresso.	63
Figura 30 -	Gráfico das médias e dos desvios padrão para os dados de FTIR do grupamento 1	64
Figura 31 -	Aspecto final após pré-tratamento dos espectros FTIR do grupamento 1	65
Figura 32 -	Gráfico de dispersão para os dados de FTIR do grupamento 1	66
Figura 33 -	Gráfico da ferramenta FreeViz considerando 16 PC's e utilizando a ferramenta de otimização para os dados de FTIR do grupamento 1	66
Figura 34 -	Gráfico das médias e dos desvios padrão para os dados de FTIR do grupamento 2.	67
Figura 35 -	Gráfico da ferramenta FreeViz considerando 13 PC's e utilizando a ferramenta de otimização para os dados de FTIR do grupamento 2	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Lista de materiais utilizados na construção da impressora 3D	48
Tabela 2 –	Experimento de formulação do biomaterial	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3DP	3DMark 2011 SE Project File
AAD	Aihidrazida de ácido adípico
ABS	Acrilonitrila butadieno estireno
CAD	Computer Aided Design
CNC	Máquinas controladas numericamente por computador
DIY	Do It Yourself
DLP	Processamento de Luz Direta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FT-IR	Espesctroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier
FDM	Fused Deposition Modeling
FFF	Fabricação por Filamento Fundido
OBJ	Object File Wavefront 3D
PAG	Poli (aldeído guluronato)
PAH	Poli (acrilamida-co-hidrazida)
PEG	Polietilenoglicol
PLA	poliácido láctico
SLA	Estereolitografia
SLS	Sinterização Seletiva a Laser
STL	Standard Triangle Language

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
°C	grau celsius
mg	miligrama
cm	centímetro
mm	milímetro
g	grama
mL	mililitro
μL	microlitro
W	watt
V	volt
A	ampére
Pa.S	pascal segundo
pH	potencial hidrogeniônico
Mg ²⁺	cátion divalente de magnésio
Mn ²⁺	cátion divalente de manganês
Ca ²⁺	cátion divalente de cálcio
Sr ²⁺	cátion divalente de estrôncio
Ba ²⁺	cátion divalente de bário
Cu ²⁺	cátion divalente de cobre
Pb ²⁺	cátion divalente de chumbo
CaCl ₂	cloreto de cálcio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	ENGENHARIA DE TECIDOS	18
2.2	HIDROGÉIS	19
2.3	ALGINATO	20
2.3.1	Características do Alginato	23
2.3.1.1	Solubilidade	23
2.3.1.2	Peso Molecular e Viscosidade	23
2.3.1.3	Sensibilidade ao pH	24
2.3.1.4	Mucoadesão	24
2.3.1.5	Biocompatibilidade	24
2.3.2	Métodos de Reticulação para o Alginato	25
2.3.2.1	Reticulação Iônica	25
2.3.2.2	Reticulação Covalente	26
2.3.2.3	Reticulação Térmica	27
2.3.2.4	Reticulação Celular	28
2.4	COLÁGENO	28
2.4.1	Gelatina	30
2.5	AGAROSE	32
2.6	IMPRESSÃO 3D	33
2.6.1	Processo de Impressão 3D	35
2.6.1.1	Produção do modelo 3D	35
2.6.1.2	Criação e manipulação de arquivo STL	36
2.6.1.3	Impressão	37
2.6.1.3.1	<i>Extrusão de material</i>	<i>37</i>
2.6.1.3.2	<i>Fotopolimerização em Cuba</i>	<i>39</i>
2.6.1.3.3	<i>Fusão em Leito de Pó</i>	<i>41</i>
2.6.1.3.4	<i>Jato de Material</i>	<i>42</i>

2.6.1.4	Remoção da Impressão	43
2.6.1.5	Pós-Processamento	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	PROJETO E MONTAGEM DA IMPRESSORA 3D	44
3.1.1	Definição dos Sistemas Eletromecânicos	44
3.1.2	Definição dos Materiais Empregados	45
3.1.3	Desenvolvimento da impressora 3D	46
3.2	DESENVOLVIMENTO DO BIOMATEIRAL PARA IMPRESSÃO	49
3.3	criação de modelo para impressão e controle computacional da impressora 3D	50
3.4	TESTE DE IMPRESSÃO DAS AMOSTRAS	52
3.5	ESPECTROSCOPIA FTIR	52
3.5.1	Análise computacional comparativa por FTIR associada a PCA	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1	TESTE DE IMPRESSÃO DAS AMOSTRAS	54
4.1.1	Produção e impressão dos arcabouços celulares	54
4.1.2	Desenvolvimento do Novo Biomaterial e Novos Testes de Impressão	56
4.2	FTIR	60
4.2.1	Análise dos espectros FTIR	60
4.2.2	Análise computacional	64
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICE A – PROJETO DETALHADO DA IMPRESSORA 3D	77
	APÊNDICE B – ARTIGO PRODUZIDO DURANTE O PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO	103

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar de pesquisa. É uma área da medicina regenerativa com amplo potencial de aplicação clínica. É um ramo de estudo focado na restauração, manutenção e melhoramento da função de tecidos defeituosos, seja pelo desenvolvimento de substitutos biológicos ou pela reconstrução dos tecidos. Seus avanços envolvem uma infinidade de disciplinas, incluindo a biologia celular, a ciência de biomateriais, imagem e caracterização de superfícies e interações entre tecidos vivos e materiais (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). Sua rotina consiste no desenvolvimento e manipulação em laboratório de moléculas, células, tecidos e órgãos com a finalidade de utilizá-los como suporte para crescimento celular ou como substitutos para regiões lesionadas do corpo (SILVA *et al.*, 2015; ABDELWAHED *et al.*, 2006).

O desenvolvimento e fabricação de arcabouços celulares é foco importante para a pesquisa na engenharia de tecidos. Biomateriais são amplamente utilizados na formulação de arcabouços celulares, devido à sua capacidade de interagir com sistemas vivos. Atualmente, na engenharia de tecidos, o desenvolvimento de biomateriais está voltado para a mimetização das funções da matriz extracelular dos tecidos corpóreos tendo em vista a importância destas propriedades na regulação das atividades celulares (WILLIAMS, 2009).

Dentre os biomateriais utilizados nestas aplicações, o alginato é uma opção popular devido à sua boa biocompatibilidade, várias opções para realização do processo de reticulação, baixo preço e facilidade de uso para a criação de estruturas tridimensionais (OZBOLAT e HOSPODIUK, 2016). O alginato é capaz de produzir hidrogéis quando na presença de cátions bivalentes. As propriedades destes hidrogéis pode ser manipulada de acordo com a composição do alginato e da concentração dos íons bivalentes associados às suas cadeias (PARENTEAU-BAREIL, GAUVIN e BERTHOD, 2010). Entretanto, sua inabilidade em interagir com as células exige a associação com outros compostos para a exploração de suas aplicações biomédicas (AHMED e SOUDARARAJAN, 2018).

O colágeno é a proteína dominante do tecido conjuntivo, encontrado em várias formas nos tecidos de muitas espécies de organismos multicelulares (SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006; DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010). Devido ao papel crítico que exerce na matriz extracelular, permitindo a organização

estrutural de compartimentos celulares e servindo como estrutura para adesão celular e proliferação de fatores biológicos, o colágeno é um material muito atraente para a engenharia de tecidos (FRANTZ, STEWART e WEAVER, 2010). Porém, suas propriedades mecânicas pobres e instabilidade exigem o uso de hidrogéis como suporte para o colágeno (HOSPODIUK *et al.*, 2017).

A agarose é um polissacarídeo natural conhecido pela sua capacidade de gerar gel através de processo termoreversível (NORMAND *et al.*, 2000). Por possuir propriedades mecânicas semelhantes às dos tecidos moles, géis de agarose são estudados em potenciais aplicações como arcabouços celulares para tecidos neurais e cartilaginosos (JAIN *et al.*, 2006; GRUBER *et al.*, 2006). Porém, a agarose apresenta baixas adesão e proliferação celular (GRUBER *et al.*, 1997). Atualmente, a agarose é amplamente estudada em vários ramos de pesquisa como alimentos, eletroforese e engenharia de tecidos.

Impressão tridimensional (Impressão 3D), também conhecida como manufatura aditiva, é uma metodologia de fabricação de estruturas com base na deposição de material camada por camada. Nos anos recentes, o desenvolvimento e popularização dos computadores pessoais e sistemas embarcados a preços acessíveis gerou uma rápida popularização dos métodos de impressão 3D (CHUA, LEONG e AN, 2020), abrindo amplas possibilidades nos estudos relativos à engenharia de tecidos, principalmente no que concerne às formas e à complexidade (WONG e HERNANDEZ, 2012). A impressão 3D baseada na extrusão de material é uma das metodologias de impressão mais comuns. Esse método possui como principais vantagens sua ampla adoção, facilidade de uso, precisão e diversidade de métodos para solidificação, além de não requerer uso de solventes ou colas (PLACONE e ENGLER, 2018; TRAN *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de uma metodologia de baixo custo para a impressão de arcabouços celulares com uso de biotinta híbrida de alginato, colágeno e agarose seria capaz de ampliar as possibilidades para a pesquisa e desenvolvimento de soluções biomédicas. Dado que o alginato possui controlabilidade no que diz respeito às suas propriedades mecânicas e seu processo de reticulação, o que o torna extremamente versátil para aplicações de impressão 3D, e tendo em vista sua deficiência com relação à interação celular, o colágeno e a agarose podem ser complementares ao alginato, suplantando as deficiências deste. A combinação

desses biomateriais possui grande potencial de sucesso na fabricação de arcabouços celulares estáveis e biocompatíveis.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O presente trabalho se propõe a desenvolver impressora 3D e biomaterial à base de alginato, gelatina e agarose para a produção de arcabouços celulares.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Desenvolver impressora 3D adaptada à impressão de biomaterial baseado em alginato, agarose e colágeno;
- b) Desenvolver biomaterial à base de alginato, gelatina e agarose para impressão 3D;
- c) Desenvolver metodologia de impressão compatível com o biomaterial;
- d) Caracterizar o arcabouço celular e suas matérias-primas sob o ponto de vista espectroscópico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

A Engenharia de Tecidos é um campo multidisciplinar de pesquisa. É uma área da medicina regenerativa com amplo potencial de aplicação clínica. É um ramo de estudo focado na restauração, manutenção e melhoramento da função de tecidos defeituosos, seja pelo desenvolvimento de substitutos biológicos ou pela reconstrução dos tecidos. Seus avanços envolvem uma infinidade de disciplinas, incluindo biologia celular, ciência de biomateriais, imagem e caracterização de superfícies e interações entre células e materiais (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011).

As principais estratégias de ação adotadas pela engenharia de tecidos podem ser classificadas em três grupos: (i) implantação de células isoladas ou substitutos celulares no organismo. (ii) entrega de substâncias indutoras, como fatores de crescimento, ao tecido e; (iii) sementeamento do células sobre ou dentro de diferentes matrizes.

Os arcabouços celulares podem ser definidos como estruturas tridimensionais porosas baseadas em biomateriais, projetadas de maneira a: (i) promover a adesão celular e deposição da matriz extracelular; (ii) permitir a difusão de nutrientes, gases e fatores responsáveis pela regulação das funções celulares; (iii) possuir biodegradação em taxa compatível com regeneração do tecido ou proliferação celular, e; (iv) provocar grau mínimo de inflamação ou toxicidade às células (LANGER e TIRREL, 2004). O desenvolvimento e fabricação de arcabouços celulares é foco importante para engenharia de tecidos. Os arcabouços celulares fornecem um meio onde as células podem aderir e proliferar, e proporcionam ainda, estabilidade estrutural em processos regenerativos (STRATTON *et al.*, 2016).

Na engenharia de tecidos, o uso dos arcabouços celulares baseados em biomateriais é recorrente (LANGER, 1993). Biomaterial pode ser definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizadas em aplicações biomédicas e que interagem como sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgão ou funções do corpo, sendo amplamente utilizados na formulação de arcabouços celulares, devido à sua capacidade de interagir com sistemas vivos (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015).

Estes materiais são amplamente utilizados na formulação de arcabouços celulares devido à sua capacidade de interagir com sistemas vivos. Atualmente, na engenharia de tecidos, o desenvolvimento de biomateriais está voltado para a mimetização das funções da matriz extracelular dos tecidos corpóreos, tendo em vista a importância destas propriedades na regulação das atividades celulares (WILLIAMS, 2009).

A fabricação de arcabouços celulares através do uso de polímeros resulta em construtos com características como resistência, taxa de degradação, porosidade e microestrutura, bem como forma e tamanho, melhor controláveis e de melhor reprodutibilidade (FUCHS, NASSERI e VACANTI, 2001). A escolha do material utilizado na construção destes arcabouços celulares é fator determinante. Em aplicações biomédicas, os critérios para seleção de materiais são baseados na química do material, peso molecular, solubilidade, forma e estrutura, hidrofiliicidade/hidrofobicidade, absorção de água e mecanismo de erosão (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). O material escolhido também deve possuir resistência mecânica para suportar sua forma e estrutura, assim como deve gerar as condições necessárias para proliferação das células em sua estrutura (LANGER e TIRRELL, 2004).

2.2 HIDROGÉIS

Os hidrogéis podem ser definidos como polímeros detentores de estruturas de redes hidrofílicas, passíveis de serem reticuladas tridimensionalmente, permitindo que o material absorva grandes quantidades de água com eficiência (KRAMER, MACEDO e MOURA, 2020). Tendo em vista suas características, os hidrogéis apresentam várias aplicações, principalmente nas áreas médica, farmacêutica e suas subáreas.

Podem ser obtidos a partir de diversas fontes primárias, como alginato, celulose, colágeno, gelatina, fibroína, pectína e quitosana (ALVES, 2021). Polímeros naturais são utilizados na produção de hidrogéis para aplicações como arcabouços celulares devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Várias proteínas são utilizadas na produção de hidrogéis para produção de arcabouços celulares. Dentre esses, o colágeno, a proteína mais abundante nos mamíferos é muito popular. Produto derivado do colágeno formada a partir da quebra das fibras deste,

a gelatina também é muito popular para aplicações na engenharia de tecidos. A gelatina é um material menos imunogênico quando comparada com seu precursor, sendo capaz de gerar melhor adesão, migração e proliferação celular.

Polissacarídeos são outros dos principais polímeros utilizados para a produção de hidrogéis na engenharia de tecidos. Uma grande variedade de polissacarídeos como o ácido hialurônico, heparina, quitosana e alginato são muito populares na engenharia de tecidos devido à sua boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e excelentes propriedades para a formação de gel. É comum que os polissacarídeos sejam combinados com proteínas para a produção de hidrogéis compósitos (ZHU e MARCHANT, 2011).

Além desses, o ácido desoxirribonucleico (DNA), tem recebido atenção crescente como um material promissor na fabricação de hidrogéis devido à sua habilidade de formar cadeias previsíveis através da sua capacidade de auto-organização através de ligações eletrostáticas, possibilidade de reticulação química e ligação enzimática.

Alguns hidrogéis são capazes de responderem à certos estímulos através de mudanças reversíveis em sua forma e volume, intumescendo ou desintumescendo. Por esse motivo, esses hidrogéis são conhecidos como hidrogéis inteligentes (TAKAHASHI, 2014). Alguns polímeros, como o poli(ácido etilacrílico) e o poli(ácido propilacrílico) são sensíveis à diferentes valores de pH. A medida que o valor do pH é reduzido, as cadeias poliméricas se afastam. Este comportamento torna esses polímeros muito úteis para a fabricação de sistemas de liberação controlada de medicamentos (STAYTON E HOFFMAN, 2008). Outros hidrogéis são capazes de gerar resposta semelhante em resposta à mudanças de temperatura. Poli(N-isopropil acrilamida) e polietilenoglicol são exemplos de polímeros que apresentam esse tipo de comportamento (HUANG *et al.*, 2019).

2.3 ALGINATO

O alginato é um polissacarídeo de ocorrência natural, produzido por algas marrons do gênero *Phaeophyceae* e bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter*, amplamente conhecido e com diversas aplicações nos ramos alimentício, biomédico, farmacêutico e bioindustrial (HARDING *et al.*, 2017). Com o decorrer dos anos, o alginato encontrou diversas aplicações bem sucedidas

nas indústrias alimentícia e de bebidas como agente gelificante e estabilizador coloidal. O alginato também possui propriedades que permitiram sua utilização como matriz para o encapsulamento e/ou entrega de uma variedade de proteínas e células, dentre estas: (i) meio aquoso relativamente inerte dentro de sua matriz; (ii) capacidade de realização de encapsulamento em temperatura amena sem a necessidade de uso de solventes; (iii) capacidade de produção de gel com alta porosidade; (iv) controle da porosidade do gel de maneira simples; (v) biodegradação do biomaterial quando em condições fisiológicas normais (GOMBOTZ e WEE, 1998).

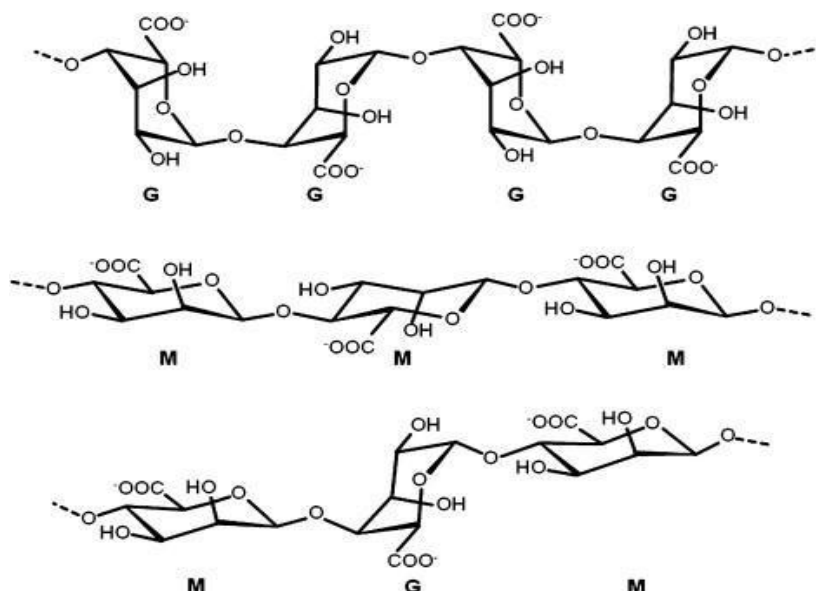
O alginato é comumente utilizado como agente gelificante e como agente controlador em sistemas de liberação controlada de medicamentos (HASNAIN e NAYAK, 2019). É considerado um biomaterial popular devido à sua obtenção fácil através de fontes convenientes, à sua não toxicidade, sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (SILVA *et al.*, 2015; ABDELWAHED *et al.*, 2006). Na forma de hidrogel, os alginatos são tipicamente utilizados em aplicações biomédicas, na engenharia de tecidos e na cicatrização de feridas. Seus hidrogéis geralmente são biocompatíveis e possuem semelhança estrutural com a matriz extracelular de tecidos vivos (VACANTI e LANGER, 1999; SAKIYAMA-ELBERT e HUBBEL, 2001). São tipicamente obtidos através da reticulação por meios químicos ou físicos (SINGH e LI, 2020).

E. C. C. Stanford, químico inglês, descobriu os alginatos em 1883 enquanto trabalhava para melhorar as necessidades dietéticas de iodo das algas que crescem ao longo da costa escocesa. Ele explorou os subprodutos metabólicos das algas marinhas e suas utilidades (STANFORD, 1883). Dentre os subprodutos estudados, Stanford isolou um material mucilaginoso com o carbonato de sódio a 2% e uso de solução acidificante para realização da precipitação do material, que foi denominado “Algin” (MORADALI, GHODS e REHM, 2018).

A produção comercial do alginato é inteiramente baseada na extração de algas atualmente. *Laminaria digitata*, *Macrocystis pyrifera* e *Ascophyllum nodosum* são comumente utilizados para a extração de alginato. Escócia, Irlanda, Noruega, França, China, Japão e Coreia são os principais países que realizam a extração do alginato a partir da *L. digitata*, que também é consumida na culinária japonesa. *M. pyrifera* é colhida na costa noroeste da América do norte, enquanto a *A. nodosum* é colhida na Escócia e na Irlanda (BACK e WOODWARD, 1954). Sua produção

comercial a partir das algas envolve três etapas: remoção de contra-íons, solubilização e precipitação. Na primeira etapa, os contra-íons são removidos através do uso de ácido clorídrico (HCl). Na segunda etapa o alginato é solubilizado após a sua neutralização com o uso de carbonato de sódio ou hidróxido de sódio. Por fim, o alginato é precipitado com o uso de álcool, cloreto de cálcio (CaCl_2) ou HCl. O alginato é então moído após a realização das três etapas descritas. Os alginatos obtidos através deste processo contém impurezas citotóxicas, que acabam por limitar seu uso nas aplicações biomédicas. Essas impurezas podem ser removidas pelo uso da eletroforese de fluxo ou por meio de extração química (KLÖCK *et al.*, 1994).

Figura 1 – Estrutura química do alginato (blocos G, M e MG)



Fonte: LEE e MOONEY (2014, p. 12).

O alginato é formado por dois monômeros com unidades repetitivas, nominalmente (1-4)- β -D-ácido manurônico (M) e o α -L-ácido gulurônico (G). Biopolímeros de alginato podem capturar, em sua estrutura, água e outras moléculas por forças capilares, permitindo também a difusão desses através de suas cadeias. A ocorrência de resíduos M e G, na estrutura do polímero varia de maneira significativa nos diferentes alginatos, gerando cadeias com diferentes ocorrências de blocos G, M e MG, com diferentes comprimentos no decorrer da cadeia (Figura 1). De maneira geral, alginatos produzidos por algas apresentam um alto teor de blocos G em sua estrutura, em contrapartida o alginato produzido pela *P. aeruginosa* não possui blocos G (MORADALI, GHODS E REHM, 2018). Adicionalmente, quando

utilizado em combinação com íons de cálcio, o alginato é capaz de adquirir estrutura e forma rígidas, com boas propriedades mecânicas (PARENTEAU-BAREIL, GAUVIN e BERTHOD, 2010).

No entanto, apesar de suas boas propriedades, para aplicações em engenharia de tecidos, modificações químicas são frequentemente necessárias para promover funções celulares desejáveis, fornecer uma gama maior de propriedades mecânicas e facilitar a liberação controlada de fatores encapsulados (HOSPODIUK *et al.*, 2017).

2.3.1 Características do Alginato

2.3.1.1 Solubilidade

A solubilidade dos diferentes alginatos em água depende diretamente de três parâmetros: pH do solvente, força iônica do meio e presença de íons gelificantes no solvente. Para que alginatos se tornem solúveis, é essencial que o pH esteja acima de certo valor crítico e que os grupos carboxila presentes na cadeia polimérica sejam desprotonados. Os alginatos formam géis quando na presença de íons divalentes, assim, para que haja a sua dissolução o solvente precisa estar livre da presença desses íons (BLACK e WOODWARD, 1954)

2.3.1.2 Peso Molecular e Viscosidade

A viscosidade é uma função do peso molecular do polímero e sua configuração em solução. O aumento do peso molecular pode melhorar as propriedades físicas do gel resultante. Porém, uma solução de alginato com grande peso molecular se torna muito viscosa, efeito geralmente indesejável (LEROUX, GUILAK e SETTON, 1999). A manipulação do peso molecular e sua distribuição podem controlar de forma independente a viscosidade da solução antes da formação do gel e sua rigidez após o processo de gelificação (KONG, LEE e MOONEY, 2002).

Devido à grande diversidade de alginatos, as soluções aquosas de alginato acabam por apresentar viscosidade dentro da faixa de 0,02 - 0,4 PaS em solução de 1% a 20 °C (SACHAN *et al.*, 2009).

2.3.1.3 Sensibilidade ao pH

A presença de grupos carboxila nas cadeias do alginato torna o polímero sensível às variações no pH. Quando o pH do meio é inferior a 3,4 o polímero permanece insolúvel devido à não ionização dos grupos carboxila. No entanto, quando em soluções com pH maior que 4,4, os grupos carboxila são ionizados e a repulsão eletrostática das cargas negativas geram a expansão da cadeia polimérica e o intumescimento da matriz. Esse efeito é maior para valores de pH em torno de 7,4 (AGÜERO *et al.*, 2017). O gel de alginato de sódio, viscoso e solúvel em pH mais alto, é convertido em um gel poroso e insolúvel quando imerso em suco gástrico. Esta propriedade do alginato é muito importante para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de medicamentos, uma vez que a liberação das moléculas encapsuladas nos grânulos do alginato é interrompida quando estes são imersos em suco gástrico.

2.3.1.4 Mucoadesão

A capacidade de aderir a camada de gel mucoso é definida como mucoadesão. Tal propriedade pode decorrer de diferentes interações, como por exemplo, interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (PONCHEL e IRACHE, 1998). A camada de gel mucoso é extremamente hidratada, composta por 95% de água, quase 5% de glicoproteínas e vários outros componentes secundários. O alginato de sódio possui boa mucoadesividade.

2.3.1.5 Biocompatibilidade

Biocompatibilidade é um termo que se refere à habilidade de um material de desempenhar uma função pré-determinada, causando uma resposta apropriada do organismo, em situação específica (WILLIAMS, 1987). Ao tratarmos de objetos que serão transplantados em um organismo, a biocompatibilidade refere-se à habilidade do implante de desempenhar determinada função desejada, com grau desejado de incorporação pelo organismo, sem causar efeitos sistêmicos indesejados (WILLIAMS, 2008).

A biocompatibilidade de materiais é questão fundamental para o uso de polímeros em aplicações biomédicas. O alginato é um composto biocompatível, não imunogênico, não citotóxico e biodegradável por natureza (KUMAR GIRI *et al.*, 1991). Embora a biocompatibilidade do alginato tenha sido extensivamente avaliada *in vitro*, bem como *in vivo*, ainda há debate sobre a influência da composição do alginato nessa propriedade. Por exemplo, foi relatado que alginatos de alto teor de blocos M em sua estrutura são imunogênicos e aproximadamente 10 vezes mais potentes na indução da produção de citocinas em comparação com alginatos com alto teor de blocos G (OTTERLEI *et al.*, 1991), mas outros autores relataram pouca ou nenhuma resposta imune em torno de implantes de alginato (LEROUX, GUILAK e SETTON, 1999). O grau de resposta imune causada pode ser ainda atribuída às impurezas presentes no alginato. Por ser obtido a partir de fontes naturais, várias impurezas, como metais pesados, endotoxinas, proteínas e compostos polifenólicos podem ser encontrados no alginato. Alginatos com alto teor de pureza obtidos através da extração em várias etapas, porém, não induzem reação de corpo estranho significativo quando implantado em animais (ORIVE *et al.*, 2002).

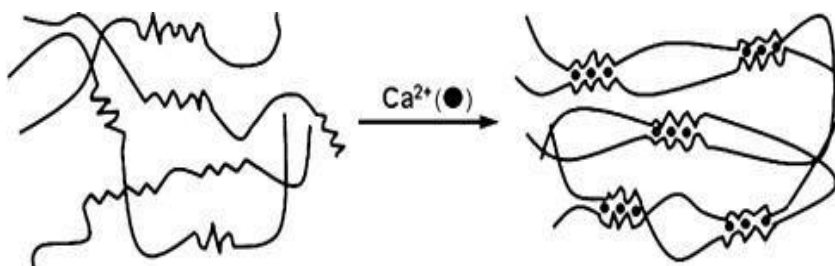
2.3.2 Métodos de Reticulação para o Alginato

2.3.2.1 Reticulação Iônica

O método mais comum para a preparação de hidrogéis a partir de soluções aquosas de alginato é o uso de reticuladores iônicos. Devido à sua estrutura química, o alginato é capaz de formar gel quando na presença de cátions divalentes, pela interação dos blocos de ácido gulurônico presentes em cadeias poliméricas adjacentes com os íons divalentes (Figura 2) (GRANT *et al.*, 1973). A afinidade dos alginatos por íons divalentes é crescente na ordem $Mg^{2+} \ll Mn^{2+} < Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+} < Cu^{2+} < Pb^{2+}$ (HARDING *et al.*, 2017; HASNAIN e NAYAK, 2019). Desses, o Ca^{2+} é comumente utilizado em aplicações biomédicas, tendo em vista que é inato ao metabolismo humano, embora os géis formados com o uso deste cátion não possuam alta resistência (CLARK, 1991). A desvantagem do uso destes géis é sua limitada estabilidade em condições fisiológicas devido à liberação dos cátions

divalentes para o meio externo (SINGH e LI, 2020). O CaCl_2 é frequentemente utilizado como agente reticulante para o alginato nessas aplicações. Entretanto o uso de CaCl_2 desencadeia um processo de gelificação pouco controlado devido à sua alta solubilidade em soluções aquosas. O sulfato de cálcio (CaSO_4) e carbonato de cálcio (CaCO_3), podem ser utilizados para controlar esse problema (CEROW e NELSON, 2006).

Figura 2 – Hidrogel de alginato preparado através da reticulação iônica



Fonte: LEE e YUK (2007, p. 12)

*Apenas os blocos G participam na formação do hidrogel.

A taxa de gelificação é um fator crítico no controle da uniformidade e resistência do gel obtido através do uso de cátions bivalentes para gelificar o alginato. Um processo de gelificação mais lento produz estruturas mais uniformes e com maior integridade mecânica (KUO e MA, 2001). A temperatura de gelificação também influencia a taxa de gelificação e as propriedades mecânicas do gel. Em baixas temperaturas, a reatividade é reduzida e a reticulação se torna mais lenta (AUGUST, KONG e MOONEY, 2006). Além disso, as propriedades mecânicas dos géis de alginato ionicamente podem variar significativamente a depender da presença de mais ou menos blocos G no polímero.

2.3.2.2 Reticulação Covalente

Este método de reticulação tem sido bastante investigado como meio para melhorar as propriedades físicas do gel de alginato em várias aplicações, como na engenharia de tecidos. A reticulação covalente proporciona géis mais estáveis quando em comparação com os géis produzidos pela reticulação iônica. As propriedades mecânicas do gel de alginato podem ser controladas através do uso de diferentes moléculas de reticulação, como polietilenoglicol (PEG) e poliacrilamida-co-

hidrazida.

O uso de moléculas de reticulação multifuncionais para formar hidrogéis fornece uma gama ampla e melhor controle sobre as taxas de degradação e rigidez mecânica quando em comparação com moléculas de reticulação bifuncionais. Como por exemplo, as propriedades físicas e o comportamento de degradação de géis de poli (aldeído guluronato) (PAG) preparados com poli (acrilamida-co-hidrazida) (PAH) como reticulador multifuncional ou dihidrazida de ácido adípico (AAD) como reticulador funcional foram monitoradas *in vitro*. Esses géis apresentaram degradação mais lenta. A maior rigidez mecânica e a degradação prolongada podem ser atribuídos aos vários pontos de fixação do PAH no gel, mesmo na mesma concentração de grupos funcionais globais (LEE, BOUHADIR e MOONEY, 2004).

A fotoreticulação é também uma abordagem alternativa para a gelificação *in situ* que explora a reticulação covalente. Tal reação se apropria da capacidade de algumas moléculas de alterar sua estrutura quando iluminadas por determinadas frequências de luz. O alginato, modificado com metacrilato e reticulado por exposição a um laser, na presença de eosina e trietanolamina, forma hidrogéis claros e flexíveis. Esses géis foram utilizados por SMEDS e GRINSTAFF (2001) para selar uma perfuração de córnea *in vivo*, indicando potencial uso clínico cirúrgico. As reações de fotoreticulação normalmente envolvem o uso de um sensibilizador ou a liberação de ácido, que pode ser prejudicial ao organismo. Uma abordagem alternativa usa polialilamina parcialmente modificada com α -fenoxycinamildieno acetil cloreto, que se dimeriza quando exposto à luz com comprimento de onda 330 nm, e não libera subprodutos tóxicos durante a reação de reticulação (TANAKA e SATO, 1972).

2.3.2.3 Reticulação Térmica

Os hidrogéis termossensíveis são amplamente investigados e possuem muitas aplicações em sistemas de liberação controlada de medicamentos, uma vez que a mudança de temperatura por si só é uma maneira simples e acessível para a produção de hidrogéis. Apesar do descrito, poucos sistemas termossensíveis utilizam alginato, visto que este não é inerentemente termossensível. Para que o alginato torne-se termossensível ele deve ser funcionalizado. A copolimerização de enxerto de N-isopopilacrilamida sobre o alginato combinado com íons de cério

resultou em gel com sensibilidade à temperatura próxima àquela encontrada no corpo humano (LEE e MOONEY, 2012).

2.3.2.4 Reticulação Celular

Quando o alginato é modificado com ligantes de adesão celular, a capacidade das células de se ligarem as cadeias do polímero, mesmo na ausência de agentes químicos reticulantes. Células adicionadas a uma solução de alginato modificada com peptídeo RGD geram uma estrutura de rede reticulada por meio de interações entre receptor e ligante específicas sem o uso de quaisquer moléculas de reticulação adicionais (LEE *et al.*, 2012). Em contraste, células adicionadas às soluções de alginato não modificadas agregam-se e formam uma estrutura não uniforme, devido ao domínio das interações célula-célula nesse sistema. A reticulação celular é reversível, podendo ser quebrada pela aplicação de forças de cisalhamento ao sistema. Após a quebra da estrutura pela aplicação da força, a estrutura é recuperada dentro de alguns minutos. O comportamento descrito é governado pelas interações entre ligante e receptor, caracterizadas por serem fracas e reversíveis. Sistemas deste tipo possuem grande potencialidade na engenharia de tecidos.

2.4 COLÁGENO

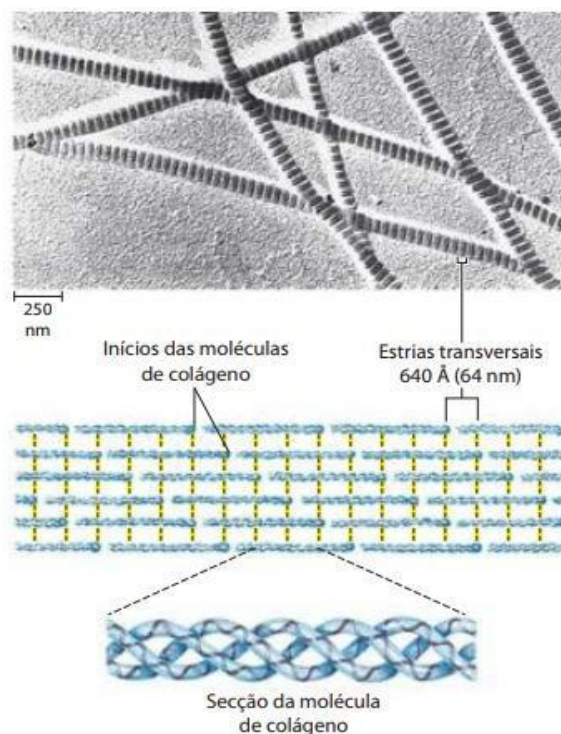
O termo “colágeno” é utilizado para denominar um conjunto de 27 proteínas encontradas nos tecidos conjuntivos do corpo. Em quantidade, é o composto mais abundante nos tecidos cartilaginosos e pode ser encontrado na pele, tendões, ligamentos e ossos (LEHNINGER, NELSON e COX, 2014). Trata-se de um composto fibroso que contém cadeias peptídicas de alanina, glicina, hidroxilisina, hidroxiprolina, lisina e prolina. Suas cadeias são dispostas de forma paralela a um eixo, o que proporciona a resistência e elasticidade características a esse material.

A formação do colágeno ocorre principalmente durante o desenvolvimento do tecido embrionário e no processo de regeneração de tecidos. A molécula de colágeno tem 280 nm de comprimento, com massa molecular de 300,000 Da. Sua estrutura é estabilizada por ligações intermoleculares e ligações de hidrogênio. As moléculas de colágeno se agrupam ao longo de um eixo paralelo para formar as

fibrilas. O conjunto de fibrilas forma as fibras de colágeno, que se organizam em feixes. O colágeno apresenta estrutura molecular relativamente simples e é insolúvel em água, em decorrência da presença de grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos em suas cadeias (LEHNINGER, NELSON e COX, 2014).

O colágeno pode ser obtido a partir de diversas espécies de animais como subproduto dos resíduos da derme e tecido subcutâneo. Esse material é previamente submetido à tratamento químico para a remoção de gordura e eliminação do cálcio. Em seguida o material resultante é então submetido à secagem em estufa a uma temperatura amena (SILVA e PENNA, 2012).

Figura 3 – Estrutura das fibras de colágeno



Fonte: LEHNINGER, NELSON e COX (2014, p. 12)

O colágeno tipo I é o tipo de proteína estrutural mais abundante do corpo humano. No tecido ósseo, o colágeno possui papel importante na resistência dos ossos (INZANA *et al.*, 2014). A matriz de colágeno facilita não apenas a adesão celular, aumenta também a fixação e o crescimento celular. Apesar do exposto, o colágeno apresenta limitações. O colágeno possui gelificação lenta, o que dificulta seu uso em certas aplicações. Suas propriedades mecânicas pobres e sua instabilidade acabam por exigir a adição de outros hidrogéis para aplicações na engenharia de tecidos (HOSPODIUK *et al.*, 2017).

2.4.1 Gelatina

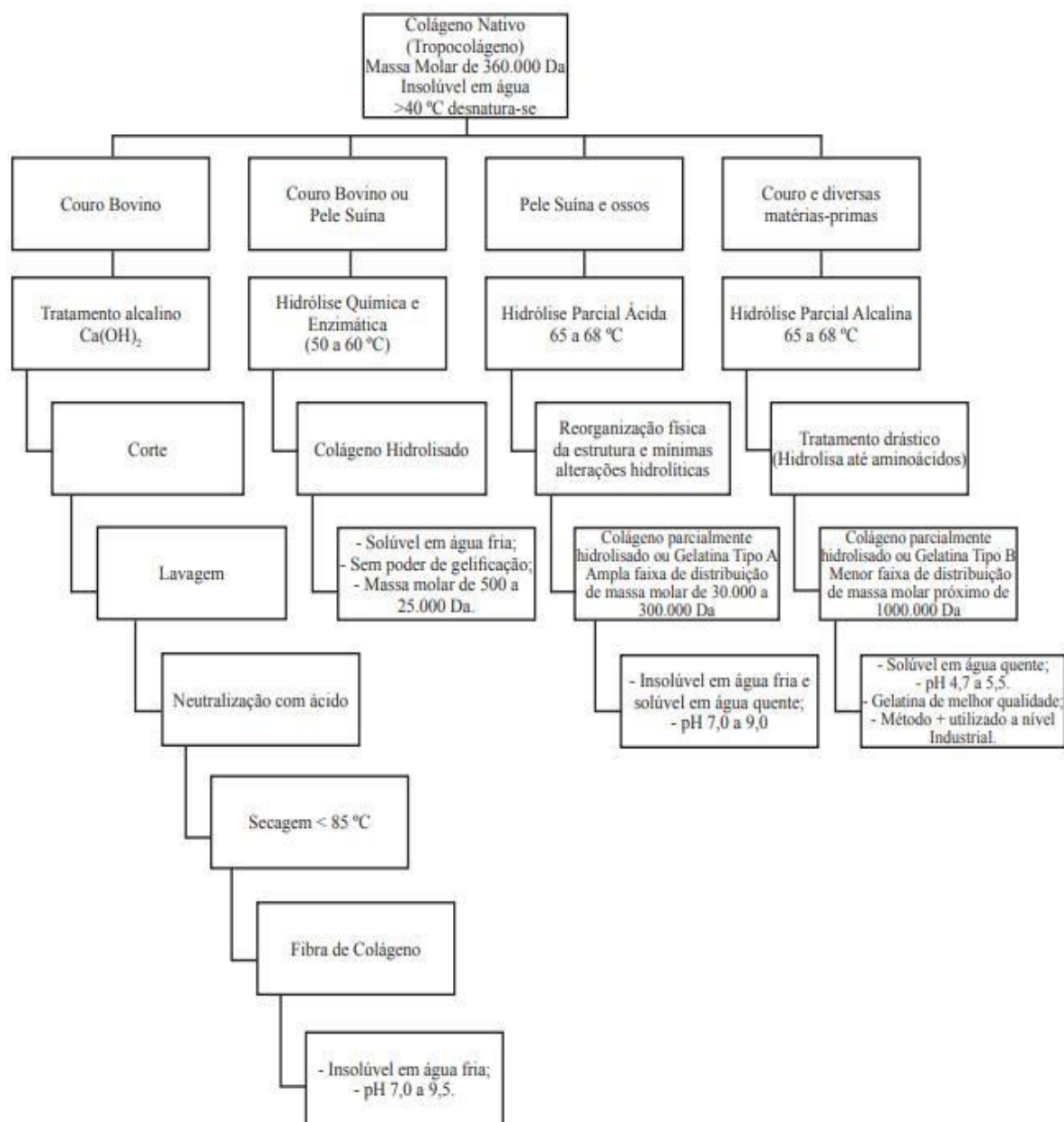
A partir do colágeno tipo I são obtidos o colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina) e o colágeno hidrolisado (Fluxograma 1). A gelatina é uma proteína solúvel em água muito popular e com diversas aplicações industriais. Por ser um produto barato, a gelatina é comumente utilizada como agente de gelificação com mínimo valor nutricional. Quando a gelatina é colocada em água fria absorve 5 a 10 vezes seu próprio peso em água e aumenta seu volume. Quando a mistura é aquecida acima do ponto de fusão, entre 27 e 34 °C, a gelatina se dissolve. Após o resfriamento, as regiões ricas em ácidos imínicos de diferentes cadeias formam uma estrutura helicoidal, estabilizada por ligações de hidrogênio. Através desse processo, a gelatina é capaz de formar géis reversíveis induzidos por temperatura (PRESTES, 2013).

As principais matérias-primas da indústria de colágeno e gelatina são a pele suína, couro bovino e ossos. A gelatina pode ser obtida a partir de dois processos: (i) a hidrólise ácida, que resulta na gelatina Tipo A e; (ii) hidrólise alcalina, onde obtém-se a gelatina Tipo B (DAMORADAN *et al.*, 2018; DEMAN, 1999). As diferenças no processo levam a variações no valor de pH e propriedades e funcionalidade da gelatina obtida (RATANAVARAPORN, *et al.*, 2010).

O método ácido é menos eficaz, porém é o mais adequado à pele suína e ossos. O processo consiste no tratamento da matéria-prima por vinte e quatro horas em ácido sulfúrico em concentrações de 2 a 4%, em temperatura ambiente (SCHRIEBER e GAREIS, 2007). A massa molar dos produtos obtidos é de 70.000 a 90.000 Da. As gelatinas obtidas por meio deste processo mantêm muitas ligações cruzadas e seus géis são mais transparentes e de melhor cor quando comparados àqueles obtidos a partir de couro bovino pelo processo alcalino (OCKERMAN *et al.*, 1994).

O método alcalino, por ser mais eficiente, é o mais empregado comercialmente. O processo consiste no tratamento do material com hidróxido de sódio em concentrações variadas, à temperatura de 20 °C, podendo levar alguns dias a até quatro meses. Pode gerar moléculas ligeiramente ramificadas com massas molares de 10.000 a 60.000 Da.

Fluxograma 1 – Obtenção de fibra de colágeno, colágeno hidrolisado e colágeno parcialmente hidrolisado



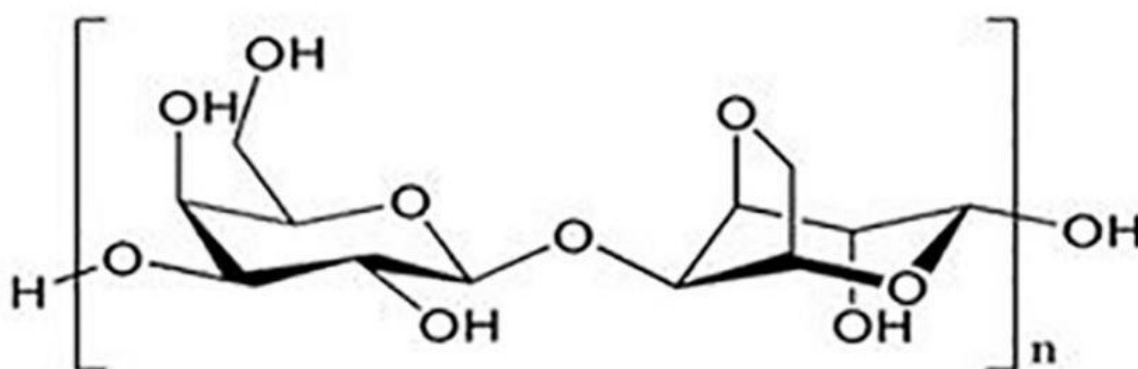
Fonte: Prestes (2013, p. 67).

A gelatina é praticamente insípida e inodora, sólida com aspecto vítreo, com densidade relativa entre 1,3 a 1,4 kg.L⁻¹ (OCKERMAN *et al.*, 1994). As gelatinas o Tipo A possuem ponto isoelétrico em pH entre 7 e 9, e as gelatinas Tipo B em pH entre 4,7 e 5,5. Além disso, a gelatina pode ter caráter anfótero, apresentando características elétricas positivas ou negativas dependendo do pH (SCHRIEBER e GAREIS, 2007).

2.5 AGAROSE

A agarose é um polissacarídeo biocompatível extraído de algas marinhas formado a partir de unidades repetitivas do dissacarídeo agarobiose (Figura 4), que pode ser preparado como um gel termorreversível (STELLWAGEN e STELLWAGEN, 1995). A agarose é industrialmente obtida a partir de algas marinhas das ordens *gracilariales* e *gelidiales* (CANELÓN *et al.*, 2014).

Figura 4 – Monômero de agarose



Fonte: YAZDI *et al.* (2020, p. 524).

Possui aplicações principalmente nas áreas farmacêutica, alimentícia e biotecnológica. É utilizada como meio de separação e purificação na eletroforese em gel, na cromatografia de grânulos de gel, cromatografia de exclusão por tamanho, em produtos de química, hormônios, enzimas, vacinas, dispositivos de liberação controlada de medicamentos e é ainda consumida como alimento (RINAUDO, 2008). O processo de extração da agarose é iniciado com a lavagem da alga para remoção de corpos estranhos. Após a lavagem, a alga é imersa em água e aquecida durante várias horas para que a agarose se dissolva na água. A mistura é filtrada para remover quaisquer resíduos que possam estar presentes. O filtrado é então arrefecido formando um gel, que é partido em pedaços e lavado para a remoção dos sais solúveis. Em seguida, a água é removida do gel por pressão ou pelo congelamento-descongelamento. Após essa etapa, a água restante é removida por secagem em forno de ar quente. O produto é então moído até o tamanho adequado para uso (FERREIRA, 2015). O peso molecular da agarose é de aproximadamente 12.000 Da (ZARRINTAJ *et al.*, 2018).

A agarose, na forma de um pó fino de cor branca, é insolúvel em água fria, porém é solúvel em água quente. Através do resfriamento da solução entre 35-45 °C, um gel estável é obtido graças a ligações de hidrogênio e interação eletrostática entre as cadeias do polímero. O gel obtido é capaz de permanecer sólido até 40 °C, se manter estável sob temperatura de esterilização (120 °C), não apresenta toxicidade e é fisiologicamente inerte. Devido à essas características, a agarose é amplamente utilizada como meio de cultura na microbiologia e aplicações biotecnológicas (RINAUDO, 2008; FERREIRA, 2015). Devido à sua semelhança com a matriz extracelular, o gel formado é capaz de gerar boa adesão celular, ao mesmo tempo que propicia perfusão adequada de oxigênio e nutrientes (SÁNCHEZ-SALCEDO, NIETO e VALLET-REGÍ, 2008).

A biocompatibilidade da agarose torna este material um material muito promissor para aplicações na engenharia de tecidos. Hidrogéis baseados em agarose possuem aplicações bem-sucedidas na regeneração de pele humana e outros órgãos (IRASTORZA-LORENZO *et al.*, 2021).

2.6 IMPRESSÃO 3D

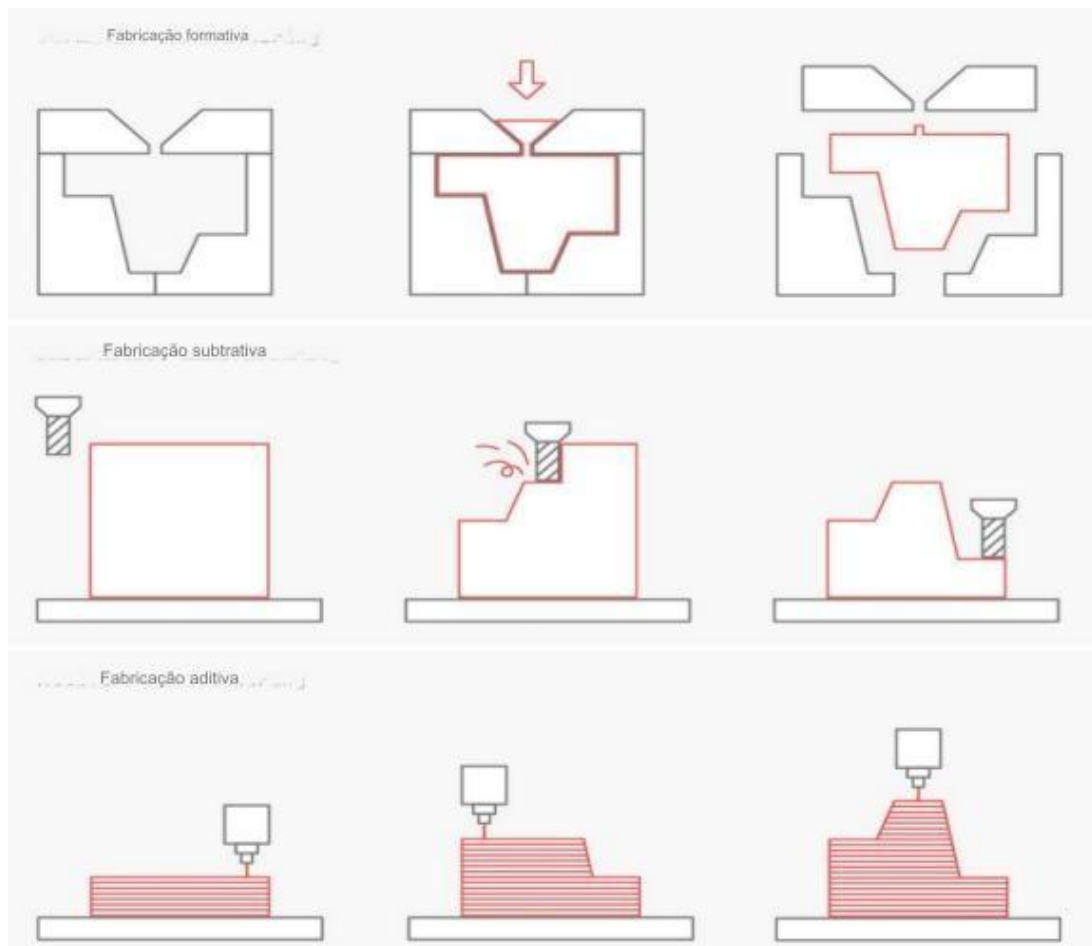
A maioria das técnicas de fabricação pode ser categorizada em três grupos (REDWOOD, SCHFFER e GARRET, 2017): fabricação formativa, fabricação subtrativa e fabricação aditiva (Figura 5).

Na fabricação formativa, tipicamente as peças fabricadas são moldadas no formato desejado com auxílio de calor e pressão. A matéria-prima pode ser derretida e inserida em moldes, prensados ou puxados para que alterem a sua forma. É extremamente popular, porém cada modelo de peça a ser produzida necessita de ferramental específico para sua produção. O ferramental costuma ser caro e complexo de produzir, exigindo investimento inicial considerável. Geralmente é rentável para produção em grandes volumes. São exemplos de métodos de fabricação normativa a moldagem por injeção, a fundição, a estampagem, a formação à vácuo e o forjamento.

O método mais tradicional de fabricação industrial de objetos sólidos consiste na remoção de material de um bloco sólido, com o uso de ferramentas adequadas, até que a forma desejada seja alcançada. Este método de fabricação é conhecido como fabricação subtrativa. É capaz de produzir partes com alto grau de precisão e

com diversos acabamentos. Fresagem, torneamento, perfuração e corte são exemplos de técnicas de fabricação subtrativa. Quanto maior a precisão desejada no projeto maior é a necessidade de sistemas de fabricação assistida por computador, o que adiciona tempo e custo ao processo de fabricação.

Figura 5 – Métodos de fabricação



Fonte: Redwood, Schffer e Garret. (2017, p. 17).

O processo reverso, no qual camadas de material são depositadas até que seja alcançada a forma desejada (processo similar à construção de prédios) é chamado de fabricação aditiva, mais conhecida como impressão 3D. O desenvolvimento e popularização dos computadores pessoais e sistemas embarcados a preços acessíveis tornou possível o desenvolvimento e disseminação dessa tecnologia. Existe uma grande variedade de tecnologias de impressão 3D, cada uma com suas vantagens e suas desvantagens próprias. O desenvolvimento de impressoras 3D cada vez mais acessíveis é uma tendência (CHUA, LEONG e AN, 2020). A impressão 3D pode ser utilizada para fabricação e prototipagem rápida de

componentes, uma vez que a deposição camada a camada permite a fabricação de objetos complexos em menor período de tempo (YAN *et al.*, 2018; GEBHART e HÖTTER, 2016). São capazes também de realizar este procedimento a custos relativamente baixos. Tal característica é bastante útil no campo biomédico, onde produtos personalizados de acordo com a necessidade do paciente podem ser necessários (NGO *et al.*, 2018).

2.6.1 Processo de Impressão 3D

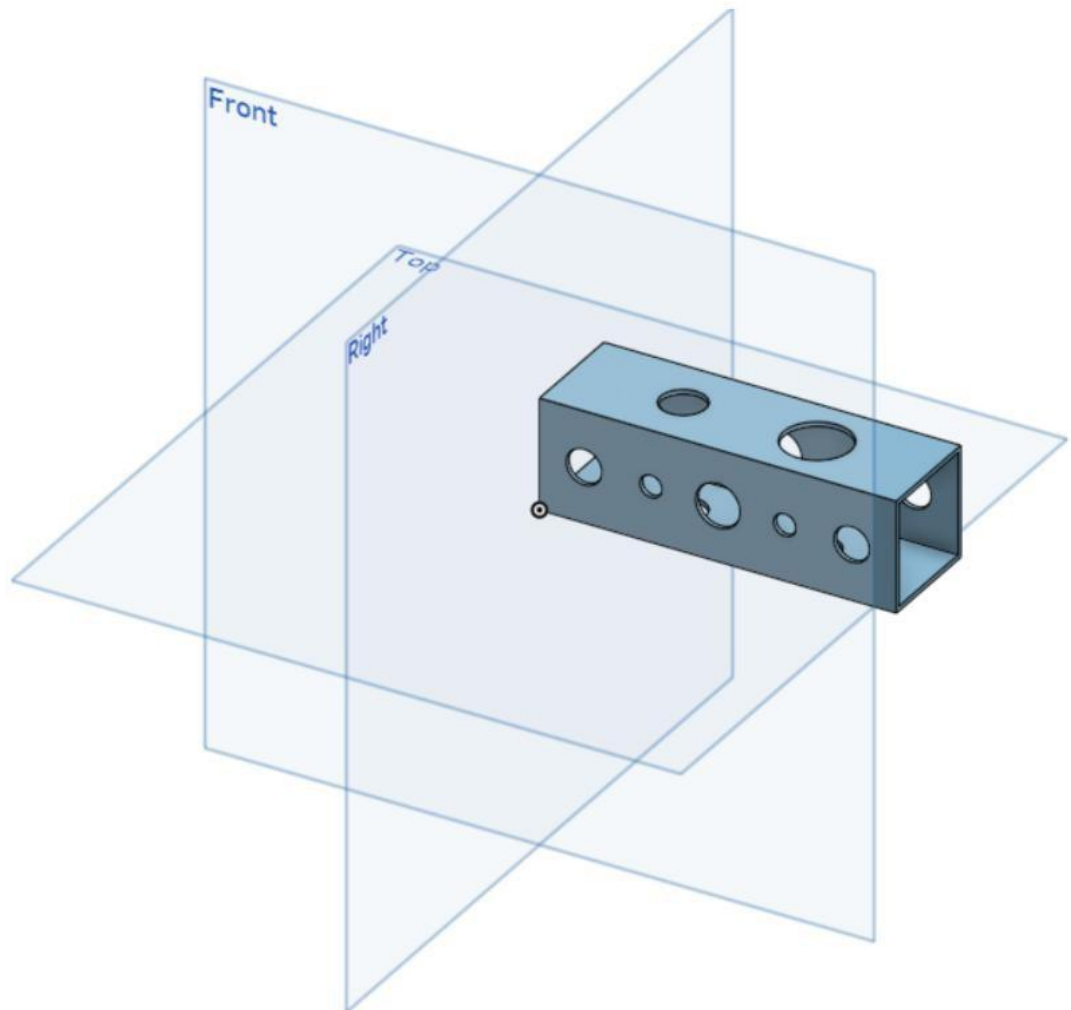
Apesar de existirem diversas metodologias diferentes para a realização da impressão 3D, certas etapas são encontradas em todas as tecnologias (REDWOOD, SCHFFER e GARRET, 2017): (i) produção de um modelo 3D; (ii) criação e manipulação de arquivo STL; (iii) impressão; (iv) remoção da impressão, e; (v) pós-processamento.

2.6.1.1 Produção do modelo 3D

A criação de um modelo tridimensional da peça a ser produzida é o primeiro passo para a realização de uma impressão 3D. O método mais usual para a criação de modelos 3D, não apenas no ramo da impressão 3D mas também em todo o ramo da engenharia, é o Desenho Assistido por Computador (CAD) (Figura 6). Modelos criados a partir de CAD permitem que engenheiros e designers produzam modelos realistas de estruturas e peças. Esses modelos podem ainda ser utilizados para testar digitalmente diversos parâmetros como resistências à tração e torção, resistência à temperaturas e deformação antes da fabricação de qualquer objeto.

Modelos 3D também podem ser criados a partir do uso de engenharia reversa, que consiste no estudo de objetos existentes. Tais modelos podem ser obtidos através de dois processos: mensurando meticulosamente cada aspecto do objeto de interesse e utilizando as medidas tomadas como base para a criação de um modelo CAD, ou pela digitalização do objeto através de técnicas de escaneamento. A engenharia reversa é comumente aplicada para a representação de superfícies complexas e orgânicas assim como na verificação da qualidade de peças produzidas.

Figura 6 – Modelo CAD



Fonte: O Autor (2023).

2.6.1.2 Criação e manipulação de arquivo STL

Para que a impressão possa ser realizada, o modelo CAD deve ser convertido para um formato que a impressora seja capaz de interpretar. De forma padrão são utilizados arquivos do tipo Standard Triangle Language (STL). Arquivos nos formatos Object File Wavefront 3D (OBJ) ou 3DMark 2011 SE Project File (3DP) também podem ser utilizados mas são menos comuns.

Uma vez obtido o arquivo STL a partir do modelo CAD, o arquivo deve ser manipulado através de um software fatiador, responsável pela segmentação das camadas que serão impressas e geração das rotas de impressão. O programa fatiador guarda esta informação na forma de um arquivo G-code, que consiste em uma linguagem numérica de controle usada no controle de máquinas controladas numericamente por computador (CNC) (JURISATO, 2013). Através do software

fatiador o operador é capaz de definir parâmetros, especificar onde serão utilizados suportes, tamanho de cada camada, morfologia interna e orientação do objeto.

2.6.1.3 Impressão

Consiste na impressão 3D propriamente dita, onde o objeto é gerado camada por camada de acordo com os parâmetros definidos nas etapas anteriores. Esse processo irá variar de acordo com a metodologia de impressão utilizada.

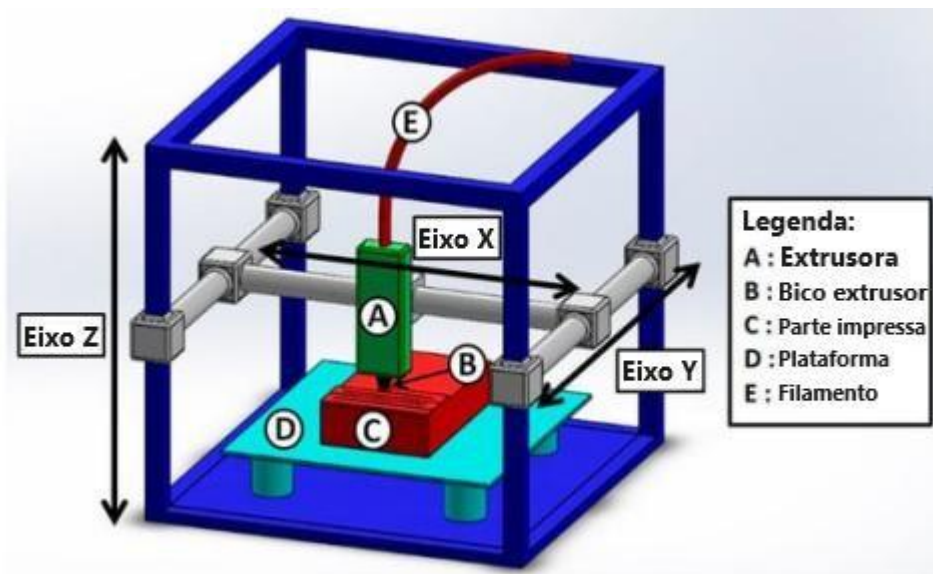
2.6.1.3.1 *Extrusão de material*

Na impressão por extrusão de material, um filamento da matéria-prima é forçado a passar através de um bico extrusor aquecido em temperatura suficiente para fundir o material. A impressora então deposita o material em uma plataforma de acordo com o definido nas etapas anteriores à impressão. O material depositado então resfria naturalmente e solidifica.

A técnica mais comum para a extrusão de material é a Fabricação por Filamento Fundido (FFF), mais comumente conhecida como FDM (Fused Deposition Modeling). A impressão por FDM é mais adequada para a impressão de materiais termoplásticos e ceras, como o políácido láctico (PLA), acrilonitrila butadieno estireno (ABS) e policarbonato (GEBHARDT e HÖTTER, 2016).

Diversos parâmetros podem ser configurados na impressão por FDM: velocidade de impressão, temperatura do bico extrusor, temperatura da mesa de impressão. Porém a definição da peça impressa é definida a partir do diâmetro do bico extrusor e da altura de cada camada depositada. Superfícies regulares e com alto nível de detalhamento exigem que a impressão seja realizada usando-se bico extrusor com menor diâmetro e que as camadas impressas possuam a menor altura possível.

Figura 7 – Modelo exemplificativo de uma impressora por FDM



Fonte: MAZZANTI, MALAGUTTI e MOLLICA (2019, p 2).

Para que a impressão possa ser realizada em menor tempo e para diminuir a quantidade de material utilizado, peças impressas através desta técnica geralmente não são totalmente preenchidas em seu interior. Assim sendo, a razão de preenchimento e a geometria da estrutura interna são diretamente responsáveis pelas características mecânicas das partes produzidas.

Figura 8 – Estrutura interna de peça impressa por FDM.



Fonte: REDWOOD, SCHFFER e GARRET. (2017, p 46)

A impressão por FDM se destaca por seu baixo custo, velocidade, simplicidade e ampla oferta de peças e suprimentos (DE GOES FILHO, 2016).

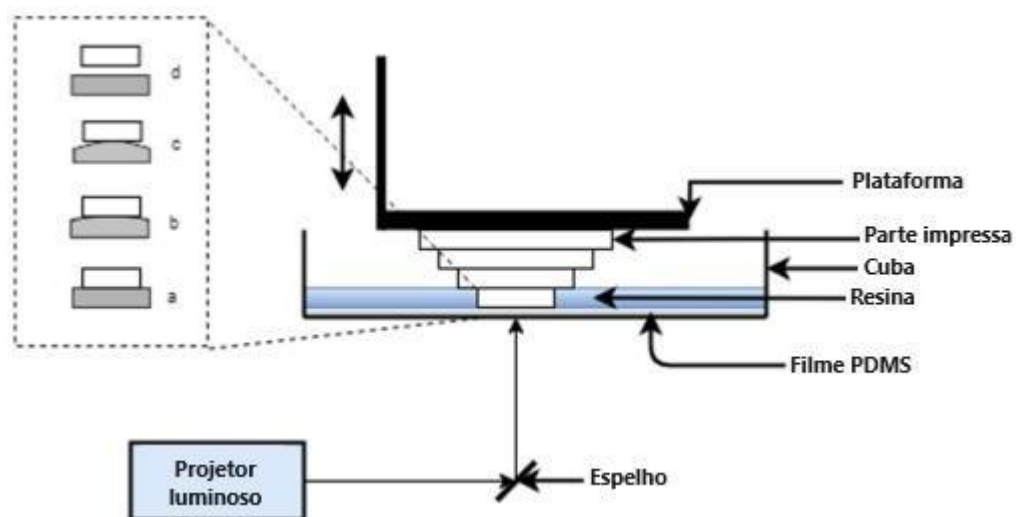
Adicionam-se ainda, à essas características, acessibilidade do ferramental necessário à montagem de um sistema para impressão 3D e pouco espaço físico demandado para montagem e funcionamento da impressora 3D (ZHAO *et al.*, 2016).

2.6.1.3.2 Fotopolimerização em Cuba

Metodologias baseadas nessa tecnologia expõem um polímero líquido fotossensível é exposto a luz com um comprimento de onda específico. Resinas fotossensíveis capazes de serem curadas em uma cuba por um processo de polimerização ativada por luz são utilizadas. A altura da camada e a resolução da fonte de luz governam a acurácia dos sólidos impressos.

Diferentemente das metodologias de impressão por extrusão, impressoras que utilizam fotopolimerização em cuba tipicamente permitem menor alteração nos parâmetros de impressão e muitas impressoras utilizam um conjunto pré-definido de parâmetros de acordo com o material empregado (REDWOOD, SCHFFER e GATTER, 2017).

Figura 9 – Processo de impressão *bottom-up*

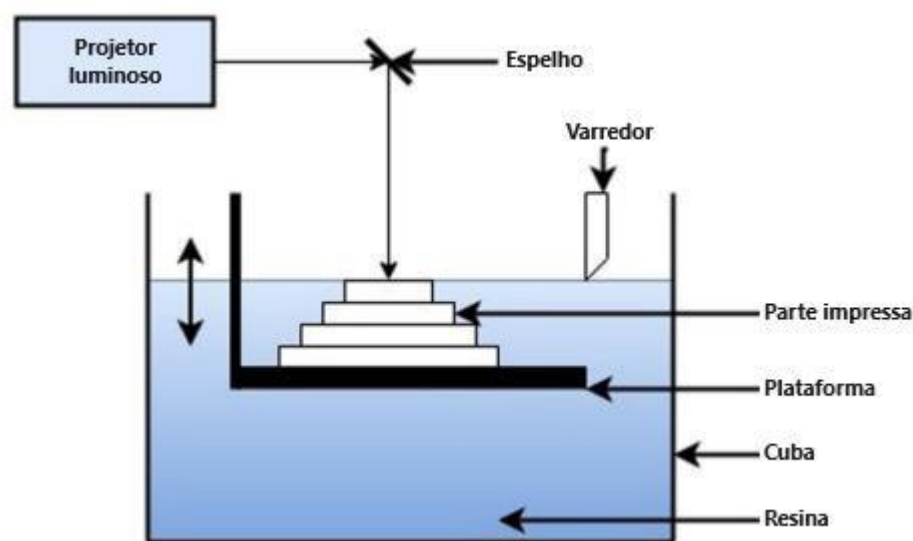


Fonte: KHADILKAR, WANG, RAI (2019, p 2).

Impressoras que fazem uso desta tecnologia podem ainda produzir partes em duas orientações diferentes: de baixo para cima (*bottom-up*) ou de cima para baixo (*top-down*). Em impressoras do tipo *bottom-up* (Figura 9) a fonte luminosa é posicionada na parte de baixo de uma cuba com fundo transparente para o

comprimento de luz utilizado. A plataforma de impressão é posicionada de modo que o espaço entre essa e o fundo da cuba seja igual à altura de uma camada de impressão, a fonte luminosa então realiza a polimerização da camada de resina. O processo é repetido até que a peça tenha sido completamente impressa. Impressoras do tipo bottom-up tendem a ser menores e de apresentar melhor controle de espessura de cada camada impressa, porém requerem a manutenção do fundo transparente e tendem a apresentar mais erros no processo de impressão.

Figura 10 – Processo de impressão *top-down*.



Fonte: KHADILKAR, WANG e RAI. (2019, p 2)

Impressoras do tipo top-down (Figura 10) por sua vez possuem sua fonte luminosa posicionada em sua parte superior. A plataforma de impressão é inicialmente posicionada no topo da cuba de modo que uma fina camada de resina seja formada. A fonte luminosa é acionada e realiza a polimerização da camada. O processo se repete até que a impressão seja finalizada. Impressoras do tipo top-down apresentam menor tempo de impressão quando comparadas com as impressoras do tipo bottom-up e possuem maior confiabilidade, porém são geralmente maiores e possuem menor controle de espessura da camada.

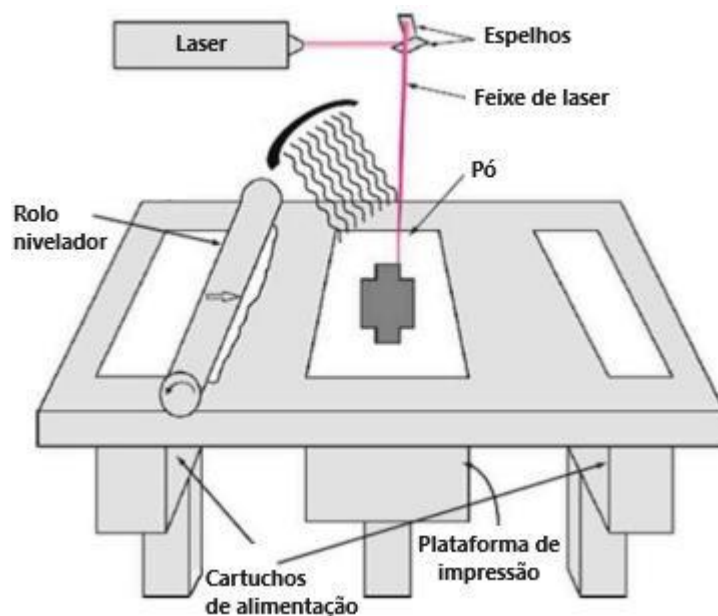
As duas principais metodologias de impressão por fotopolimerização em cuba são a Estereolitografia (SLA) e o Processamento de Luz Direta (DLP). A diferença substancial entre as duas metodologias consiste no tipo de fonte luminosa utilizada: na Estereolitografia utiliza-se um laser de ponto único que varre cada ponto da

camada impressa, polimerizando a resina; na metodologia DLP utiliza-se um projetor digital, capaz de exibir a imagem de cada camada impressa, realizando sua polimerização de maneira homogênea.

A impressão por fotopolimerização em cuba exigem ainda a realização de cura após impressa a peça para uma melhor finalização da superfície da peça e melhoria de suas propriedades mecânicas.

2.6.1.3.3 Fusão em Leito de Pó

Figura 11 – Impressão por SLS.



Fonte: GIBSON. (2015, p 108)

Tecnologias de impressão por fusão em leito de pó, também conhecida como Sinterização Seletiva a Laser (SLS), utilizam uma fonte térmica para induzir a fusão de partículas de determinado material (Figura 11). Um leito fino de pó, frequentemente polímeros ou metais, é espalhado de maneira uniforme sobre a plataforma de impressão. Um laser de alta potência é então direcionado para pontos específicos da camada de pó. O calor gerado pela fonte luminosa faz com que as partículas de pó se fundam ordenadamente, de maneira que formem a geometria da camada em questão. O processo é repetido para cada camada do sólido (REDWOOD, SCHFFER e GATTER, 2017).

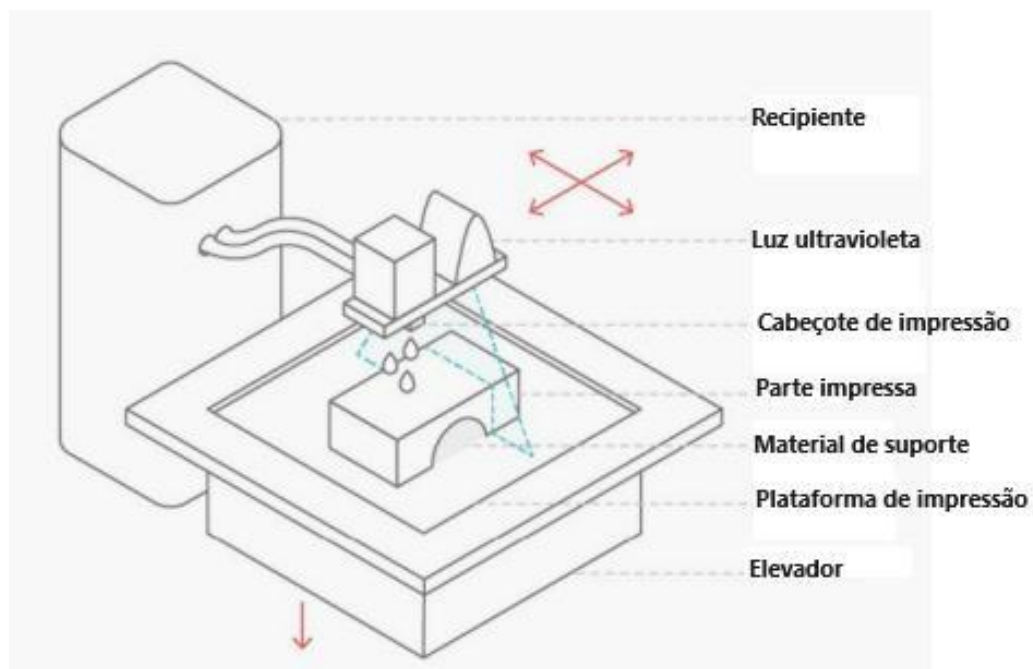
Partes impressas por SLS apresentam alto nível de precisão em suas

dimensões e boas propriedades mecânicas (GIBSON, 2015). As peças impressas acabam apresentando um acabamento granulado em sua superfície, razão pela qual é comum o uso de técnicas de pós-processamento e acabamento.

2.6.1.3.4 Jato de Material

A impressão 3D por jato de material cria objetos tridimensionais através da deposição de materiais líquidos. Um material líquido fotopolimerizável é injetado sob pressão por meio de bicos injetores sobre a plataforma de construção. O material líquido é despejado em gotículas finas e são solidificadas imediatamente após sua deposição. Esse processo se repete até que o objeto seja totalmente construído (Figura 12).

Figura 12 – Impressão por Jato de Material.



Fonte: REDWOOD, SCHFFER e GARRET. (2017, p 130)

Esta metodologia oferece alta resolução, permitindo a criação de peças com alto detalhamento e superfícies suaves. Além disso existe a possibilidade de deposição de diferentes materiais em um único processo de impressão, ampliando as possibilidades de criação de modelos complexos (REDWOOD, SCHFFER e GATTER, 2017).

2.6.1.4 Remoção da Impressão

A remoção da peça produzida por meio de impressão 3D é uma etapa crucial. Após a impressão propriamente dita a peça precisa ser cuidadosamente removida da plataforma de construção.

A depender da metodologia de impressão aplicada é importante permitir que a peça esfrie e solidifique completamente antes de tentar removê-la. A peça também pode estar aderida à plataforma por meio de diferentes mecanismos. Algumas impressoras 3D utilizam uma base adesiva para auxiliar na aderência, outras podem possuir mecanismos magnéticos. O uso de ferramentas adequadas evita a ocorrência de danos à parte impressa (GIBSON, 2015).

2.6.1.5 Pós-Processamento

O pós-processamento em peças produzidas por impressão 3D refere-se às etapas adicionais realizadas após a conclusão da impressão para melhorar sua qualidade, funcionalidade, aparência e precisão da peça.

Se a peça foi impressa com o uso de suportes de sustentação, estes precisam ser removidos. Ferramentas como alicates e pinças podem ser utilizadas. Após a remoção dos suportes é importante realizar a limpeza de resíduos resultantes do processo de impressão. Algumas peças ainda podem exigir pós-processamento adicional, como lixamento, polimento ou cozimento, para obter a aparência ou as características desejadas. O objetivo é aprimorar as propriedades finais da peça e garantir que ela atenda aos padrões de qualidade desejados para sua finalidade (GIBSON, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROJETO E MONTAGEM DA IMPRESSORA 3D

Como ponto de partida para a concepção e projeto da impressora 3D, 3 princípios foram utilizados como base: (i) facilidade de acesso às ferramentas, software, hardware e materiais utilizados; (ii) facilidade de manipulação e usinagem dos materiais utilizados; e (iii) minimização dos custos sem deixar de cuidar para a qualidade final da impressora.

A partir desses princípios, foi iniciado o processo de decisão para o projeto da impressora. Inicialmente os recursos foram gastos para a decisão de quais sistemas eletromecânicos seriam utilizados para controle da impressora. Em segundo momento, os materiais que seriam empregados na construção da impressora 3D foram definidos. Em seguida foi desenvolvido o projeto da impressora e realizada a montagem da impressora. A produção da tinta à base de alginato foi a etapa seguinte no desenvolvimento do trabalho. Por fim, esforço foi posto na compatibilização das características da impressora com o biomaterial baseado em alginato produzido para a impressão.

3.1.1 Definição dos Sistemas Eletromecânicos

Na atualidade, sistemas eletrônicos e máquinas CNC podem ser encontrados em vários ramos industriais nos mais variados tamanhos e aplicações. Vários microcontroladores estão disponíveis no mercado. Além disso, com o desenvolvimento da tecnologia de impressão 3D surgiu também um grande movimento “Faça Você Mesmo” (DIY), onde projetos abertos de impressoras 3D são disponibilizados na Internet e a criatividade e inovação são incentivadas nesse ramo de tecnologia (PETERSEN, KIDD e PEARCE, 2017).

Plataformas programáveis de prototipagem eletrônica de placa única e hardware livre são a base do movimento DIY. No mercado brasileiro são duas as principais plataformas disponíveis para compra: Arduino e RaspberryPi. Dentre estas, a plataforma Arduino é a mais popular, oferecendo um grande número de produtos e apoio, possuindo ainda uma grande comunidade com fácil acesso no país. Além do mencionado, a plataforma Arduino é amplamente utilizada na construção de

impressoras 3D. Assim sendo, optou-se pelo uso da plataforma Arduino no presente projeto.

Dentre as opções de firmware a serem utilizados, o Marlin é um firmware baseado na plataforma Arduino para impressoras 3D. O Marlin é inserido no microcontrolador presente na placa Arduino, sendo responsável pelo gerenciamento em tempo real todas as atividades do hardware. Controle dos motores de passo, drivers de motores e sensores ficam todos sob a jurisdição do firmware (HOQUE *et al*, 2019).

3.1.2 Definição dos Materiais Empregados

No processo de decisão de quais materiais seriam utilizados, algumas questões foram levantadas: (i) o material empregado na estrutura da impressora deve garantir a estabilidade e fixação correta de todos as peças dessa, ao mesmo tempo que deve ser um material de fácil usinagem, com baixo custo; (ii) a conexão entre as peças deve ser sólida e segura permitindo o funcionamento correto das partes móveis do equipamento; (iii) suportes, guias e outras peças de menor tamanho e maior complexidade, que não suportam grandes esforços podem ser fabricadas a partir de material plástico. Para a fabricação do corpo da impressora três materiais foram considerados: (i) madeira; (ii) alumínio e (iii) ferro.

A madeira é um material de fácil aquisição a um baixo preço, a fabricação de peças a partir de madeira também é simples, porém, sua degradação com o tempo é uma questão a ser considerada. Com o tempo, se não forem tomados os cuidados adequados, a madeira pode absorver umidade do ambiente, mudando assim suas proporções e propriedades mecânicas. Existe o risco de que a madeira seja degradada pela ação de fungos.

O alumínio é um metal abundante e de fácil produção, o que o torna acessível e barato. É um metal leve, maleável e de fácil usinagem. Ele pode ser adquirido nas mais diferentes formas. É um metal resistente à oxidação, apresentando assim uma longa vida quando empregado adequadamente. Porém é um material não indicado para uso em aplicações que requerem uma resistência mecânica elevada.

O ferro é um metal amplamente utilizado nas mais diversas indústrias e aplicações devido às suas ótimas propriedades mecânicas e sua boa relação custo x resistência mecânica. Extremamente versátil e de fácil usinagem, o ferro, quando

não é utilizado na forma de liga metálica, é altamente suscetível a sofrer oxidação causada pelo oxigênio atmosférico. Tal característica pode ser mitigada pela aplicação de uma camada de tinta sobre a peça produzida, porém arranhões ou imperfeições que retirem essa camada podem causar oxidação. Outra possibilidade seria a utilização de uma liga metálica de ferro, como o aço inoxidável, todavia, essas ligas acabam apresentando custo expressivamente superior.

Após ponderação, optou-se pelo uso do alumínio para a construção da estrutura da impressora 3D. Para a confecção das conexões entre as peças de alumínio foram utilizadas lâminas de zinco metálico com aproximadamente 2 mm de espessura, obtidas a partir de sobras da linha de produção que seriam descartadas. Para a fabricação de suportes, guias e peças de menores dimensões e maior complexidade, foi escolhido o uso de materiais plásticos como PLA e ABS que poderiam ser produzidos com auxílio de impressão 3D.

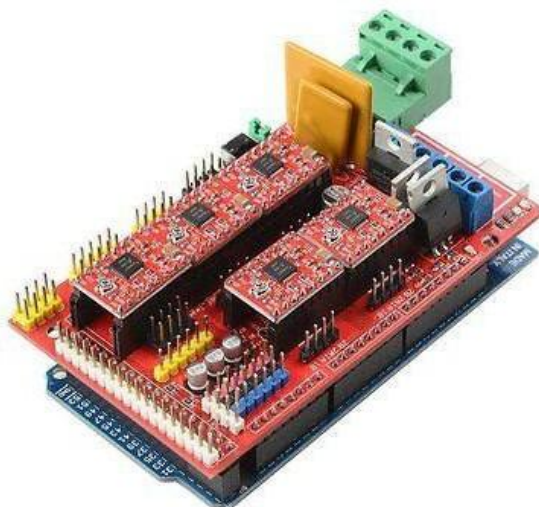
3.1.3 Desenvolvimento da impressora 3D

Definidos os materiais e plataformas que serão utilizadas no projeto, o primeiro passo tomado foi a escolha dos componentes eletrônicos a serem utilizados. Para a atuação mecânica dos eixos da impressora 3D optou-se pelo uso de motores de passo tendo em vista que esse tipo de motor permite maior controle fino na movimentação. Tendo em vista as características do presente trabalho, focado no desenvolvimento da metodologia de impressão e o foco na impressão de arcabouços celulares de menores dimensões, optou-se pelo uso de motores de passo menores e mais baratos para atuação do eixo Z da impressora.

Para controle dos motores optou-se pela placa Arduino Mega 2560 e *drivers* de motor de passo modelo A4988. Para unificação do sistema como um todo, também foi utilizado a placa *shield* para Arduino Modelo Ramps 1.4, que também será responsável pela alimentação elétrica do sistema como um todo (Figura 13). A alimentação elétrica do sistema é provida por uma fonte industrial com 120 W de potência, capaz de oferecer 12 V de tensão elétrica e 10 A de corrente contínua.

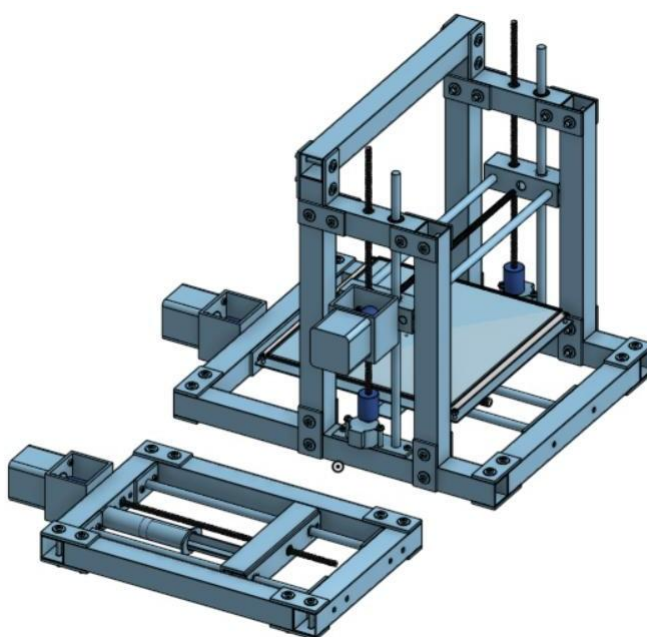
Para a produção da estrutura física da impressora foi escolhido o uso de tubos de alumínio de seção quadrada medindo 25 x 25 mm com 1 mm de espessura. O projeto das peças foi desenvolvido com o auxílio de ferramenta CAD (Figura 14).

Figura 13 – Placa Arduino Mega 2560, *shield Ramps 1.4* e *drivers A4988*.



Fonte: *Everything Pi*. (2023)

Figura 14 – Projeto CAD da impressora 3D.



Fonte: O Autor (2023).

A lista de materiais utilizados para a construção da impressora 3D pode ser encontrada na Tabela 1. O projeto mais detalhado da impressora pode ser encontrados no Apêndice A. Para fabricação das peças foram utilizados os seguintes equipamentos: furadeira de bancada, serra de fita vertical, serra manual, régua de aço inox com escala em cm, esquadro em forma de L, conjunto de chaves

tipo Philips, conjunto de chaves de fenda, conjunto de chaves tipo Allen, alicate universal, alicate de bico e fita isolante. Durante o projeto e fabricação, as peças foram projetadas de modo que a folga entre as peças permitisse o ajuste manual durante a montagem e operação da impressora 3D, mitigando assim erros e falhas no processo de fabricação. Também foi dada preferência à realização de furos passantes para menor tempo e complexidade de usinagem, e para melhor posicionamento das peças e ferramentas no momento da montagem.

Tabela 1 – Lista de materiais utilizados na construção da impressora 3D.

Material	Unidade de Medida	Quantidade
Arduino Mega 2560	Unidade	1
Ramps 1.4	Unidade	1
A4988	Unidade	4
Fonte industrial 120 w	Unidade	1
Kit de jumpers tipo macho-fêmea	Pacote	1
bo de alumínio com seção quadrada 25 x 25 mm (1 mm de espessura)	Metro	4,5
Zinco laminado (2 mm de espessura)	Metro quadrado	0,5
Fuso trapeoidal modelo TR8 com flange	Metro	0,3
3 mm de diâmetro comporça	Metro	0,6
3 mm de diâmetro comporça	Metro	0,3
em aço inox (8 mm de diâmetro)	Metro	2,4
Rolamento linear LM8UU	Unidade	10
Acoplamento flexível 5 x 8 mm	Unidade	4
Acoplamento flexível 5 x 5 mm	Unidade	1
Motor de passo Nema 17 (4,2 kgf.cm)	Unidade	2
Motor de passo Nema 17 (8 kgf.cm)	Unidade	1
Motor de passo 28BYJ-48	Unidade	2
Philips M3 x 35 mm comporça e arruela	Unidade	32
s M3 x 8 mm com porca e arruela	Unidade	44
3 x 8 mm com porca e arruela	Unidade	10
Cabo flexível 2 x 1,5 mm	Metro	2
Tomada 10 a	Unidade	1
Cabo USB padrão B para padrão A	Metro	1,5
Sensor de fim de curso	Unidade	3

Fonte: O Autor (2023).

3.2 DESENVOLVIMENTO DO BIOMATEIRAL PARA IMPRESSÃO

Para a avaliação do impacto que as variações das concentrações das matérias-primas causariam nas características de impressão do biomaterial, diferentes formulações, com diferentes proporções entre seus componentes foram inicialmente testadas. A relação de cada formulação utilizada pode ser encontrada na Tabela 2.

Tabela 2 – Experimento de formulação do biomaterial.

Amostra	Alginato	Gelatina	Agarose	Glicerol	Água Destilada
1	1 g	0,2 g	16 mg	10,08 g	32 mL
2	0,2 g	1 g	16 mg	40,32 g	8 mL
3	1 g	1 g	100 mg	10,08 g	32 mL
4	0,2 g	1 g	16 mg	10,08 g	32 mL
5	0,2 g	0,2 g	100 mg	40,32 g	8 mL
6	0,2 g	0,2 g	16 mg	10,08 g	32 mL
7	0,2 g	1 g	100 mg	40,32 g	8 mL
8	1 g	1 g	16 mg	10,08 g	32 mL
9	1 g	0,2 g	100 mg	40,32 g	8 mL
10	1 g	1 g	16 mg	40,32 g	8 mL
11	1 g	1 g	100 mg	40,32 g	8 mL
12	1 g	0,2 g	100 mg	10,08 g	32 mL
13	0,2 g	0,2 g	16 mg	40,32 g	8 mL
14	0,2 g	0,2 g	100 mg	10,08 g	32 mL
15	0,2 g	1 g	100 mg	10,08 g	32 mL
16	1 g	0,2 g	16 mg	40,32 g	8 mL

Fonte: O Autor (2023).

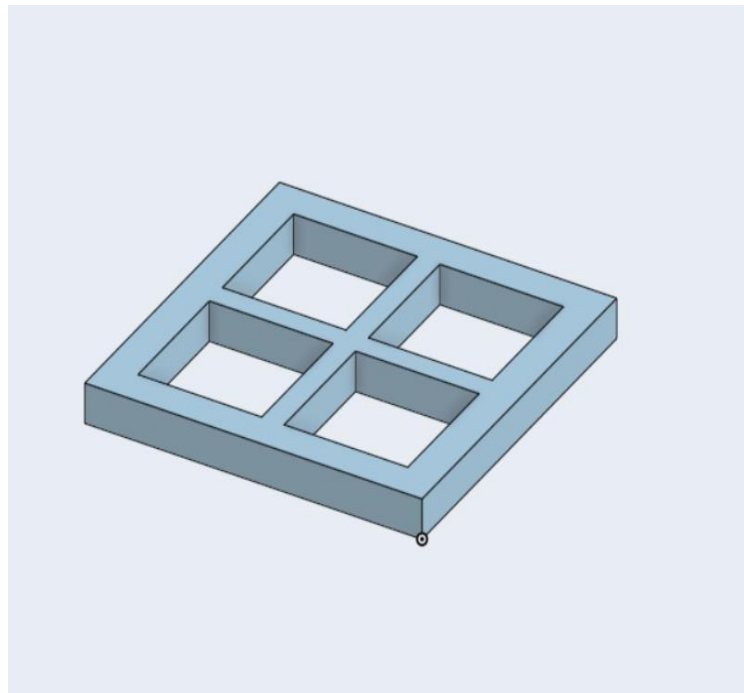
Para cada amostra, o alginato, a gelatina e a agarose foram pesados separadamente e foram depositados em recipiente à parte. Foi realizada a pesagem do glicerol em béquer de tamanho adequado. A água destilada foi então adicionada ao glicerol e a mistura foi realizada por agitador magnético até a homogeneidade. Alcançada a homogeneidade da mistura, foram adicionados os componentes sólidos previamente pesados e postos a parte de maneira progressiva, evitando a formação de grânulos sólidos não dissolvidos no solvente. A mistura foi aquecida nesta etapa auxiliando no processo de dissolução e ativando a gelatina presente na mistura. Após alcançada a homogeneidade na mistura, cada amostra foi armazenada em seringas de 20 mL, que foram armazenadas a temperatura ambiente para que a solução solidificasse.

Em um recipiente à parte foi realizada a preparação da solução gelificante para a ativação do alginato. Foram dissolvidos 1 g de cloreto de cálcio em 100 mL de água destilada.

3.3 CRIAÇÃO DE MODELO PARA IMPRESSÃO E CONTROLE COMPUTACIONAL DA IMPRESSORA 3D

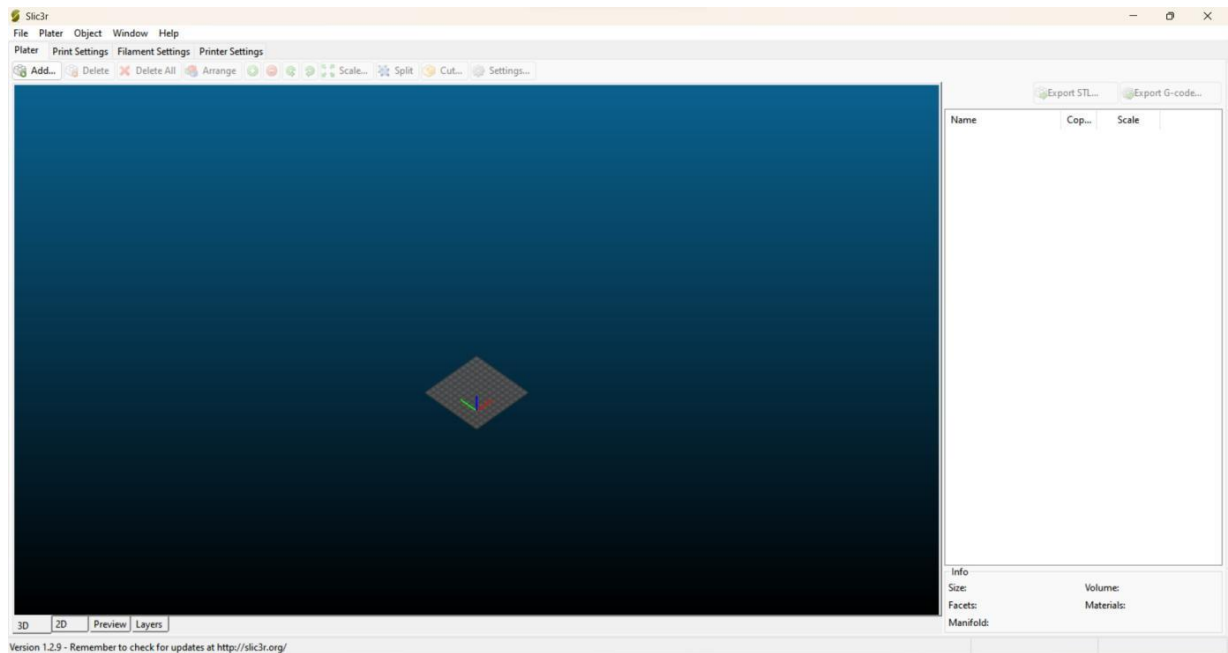
Através do uso de desenho CAD foi produzido modelo de arcabouço a ser impresso (Figura 15), o arquivo correspondente foi armazenado no formato .STL. Posteriormente o arquivo foi tratado por software fatiador e os dados foram armazenados em arquivo .gcode. O software realizado para o fatiamento foi o Slic3r (Figura 16), software de código livre que permite a configuração de uma série de parâmetros de impressão: diâmetro do bico extrusor; diâmetro do filamento; altura das camadas de impressão; tipo e proporção de preenchimento interno. O Slic3r permite ainda a configuração do tamanho e posicionamento do ponto de referência da plataforma de impressão, e o armazenamento de todas essas informações em um arquivo G-code.

Figura 15 – Modelo CAD criado para impressão.



Fonte: O Autor (2023).

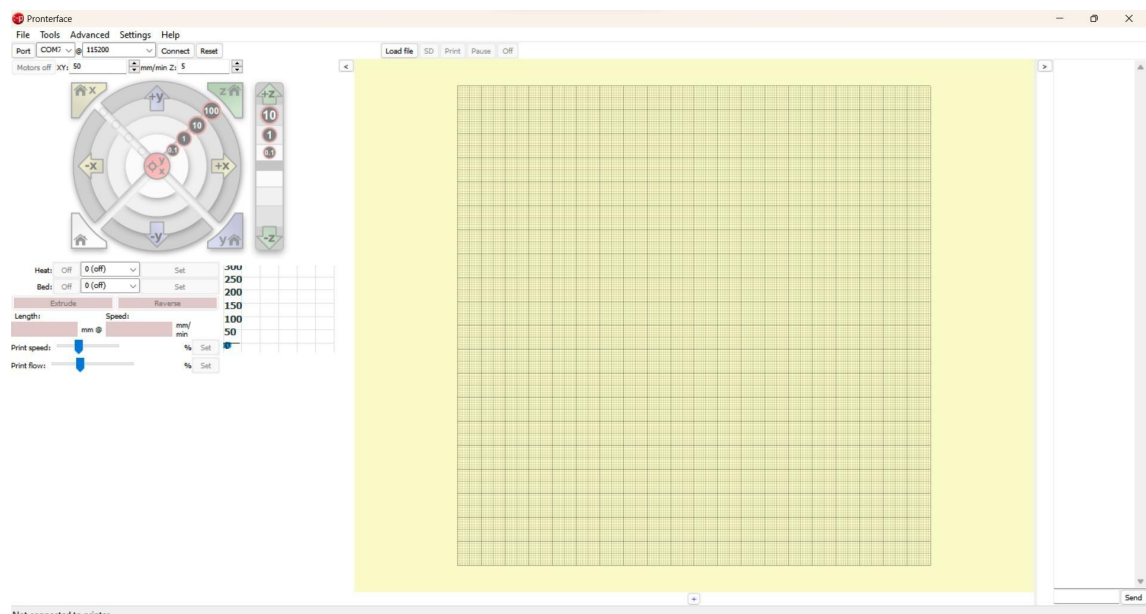
Figura 16 – Interface gráfica do Slic3r.



Fonte: O Autor (2023).

O controle da impressora foi realizado através do software livre Pronterface (Figura 17). Através desse software é possível comandar todas as partes eletromecânicas da impressora, selecionar a porta utilizada e velocidade de conexão com a impressora 3D, podermos visualizar de maneira detalhada o modelo de impressão fatiado além de acompanhar o processo de impressão.

Figura 17 – Interface gráfica do Pronterface.



Fonte: O Autor (2023).

3.4 TESTE DE IMPRESSÃO DAS AMOSTRAS

Para a realização do teste de impressão, propôs-se a seguinte metodologia: seria realizada a extrusão simultânea de duas soluções sobre a plataforma de impressão, sendo a primeira a amostra de biomaterial produzido e a segunda a solução com cloreto de cálcio, de forma que ocorresse a solidificação do biomaterial à base de alginato à medida que fosse depositado na plataforma. O procedimento foi realizado com o auxílio da agulha pertencente a cada seringa e um equipo utilizado para fazer a interconexão entre seringa e agulha.

3.5 ESPECTROSCOPIA FTIR

As amostras de arcabouços impressos foram analisadas por espectroscopia FTIR, utilizando um espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 630FTIR com módulo ATR, utilizando o intervalo de número de onda de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, a fim de identificar os grupos funcionais presentes nas amostras.

3.5.1 Análise computacional comparativa por FTIR associada a PCA

As análises computacionais foram realizadas com os dados espectrais obtidos a partir da formulação de biomaterial que proporcionou as impressões de melhor qualidade antes e depois da gelificação (sendo discriminadas nestas as porções superficiais e interiores do arcabouço impresso) e as matérias-primas utilizadas.

O método empregado para a análise foi aquele desenvolvido por Lima (2020). Inicialmente foram realizados em cada ponto do espectro de leitura uma avaliação do desvio padrão. Todos os pontos com desvio maiores que dez foram retirados da análise multivariada para fins de comparação. Além deste tratamento foram aplicados pré-processamento dos dados a fim de padronizar e reduzir ruídos, permitindo que a informação espectral pudesse ser submetida a análises multivariadas.

Foram aplicados, filtro de Savitzky-Golay, remoção das regiões espectrais com desvios maiores de dez, Gaussin Smoothing e correção da linha de base. Em seguida, os dados processados foram analisados por Análise dos Componentes

Principais (PCA), Gráfico de dispersão e pela ferramenta Freeviz. A determinação dos desvios foi auxiliada pelo software Excel Microsoft e as demais análises exploratórias de dados e o pré-processamento, foram desenvolvidas utilizando a ferramenta Orange Data Mining.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

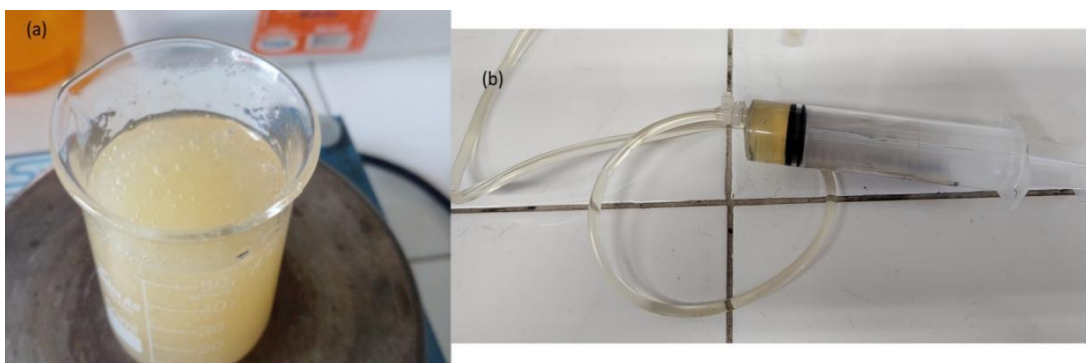
4.1 TESTE DE IMPRESSÃO DAS AMOSTRAS

4.1.1 Produção e impressão dos arcabouços celulares

Após realizado todo o procedimento de preparação dos biomateriais foi possível notar que:

- ❖ As amostras com maiores concentrações de gelatina e glicerol apresentaram aspecto mais viscoso, próximo à consistência de pasta;
- ❖ As amostras com maior quantidade de agarose apresentam coloração esbranquiçada enquanto que as com menor quantidade apresentam aspecto amarelado (Figura 18).

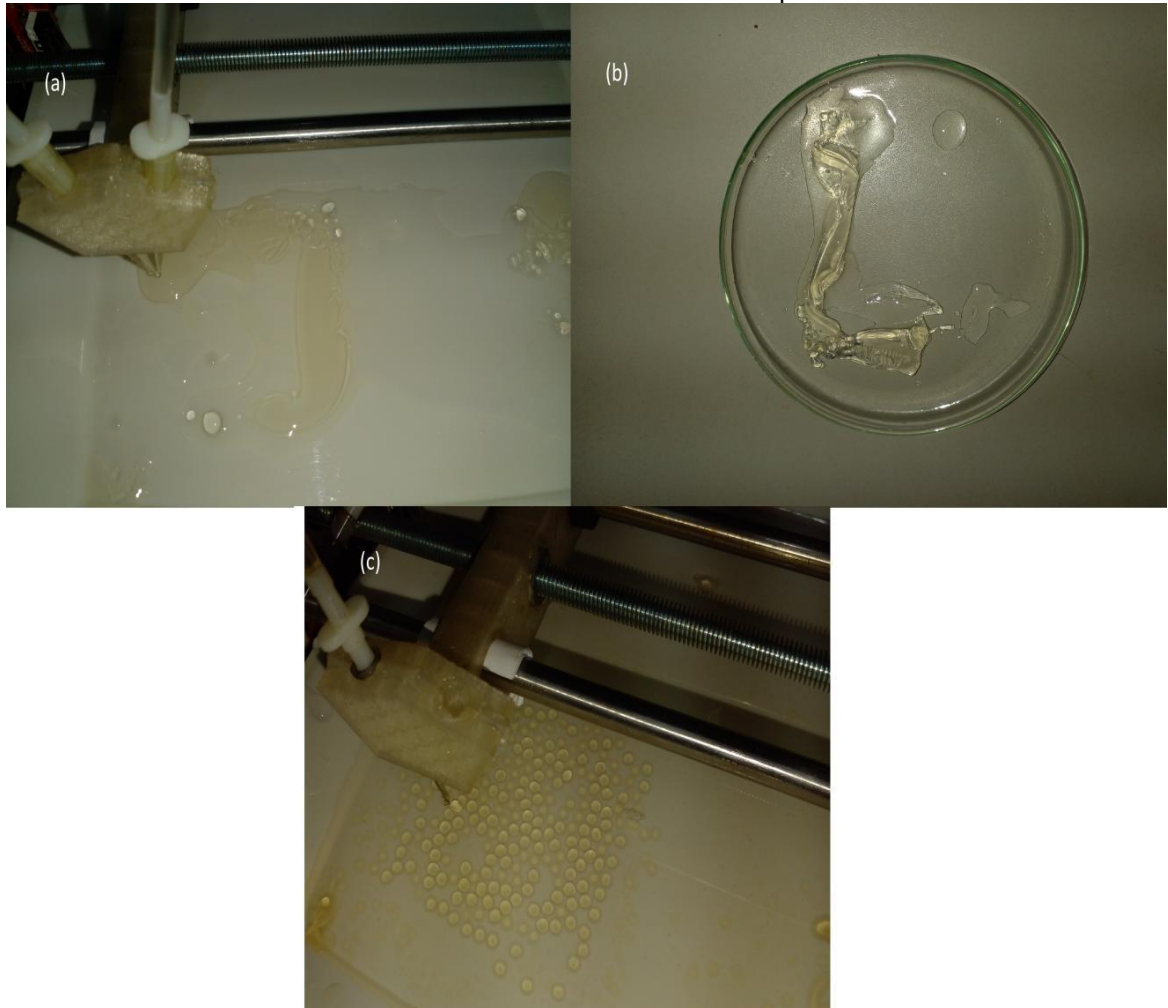
Figura 18 – (a) biomaterial com maior concentração de alginato. (b) biomaterial com menor concentração de alginato.



Fonte: O Autor (2023).

Porém, assim que iniciados os testes observou-se que o processo de reticulação do alginato ocorre de maneira muito veloz, fazendo com que o filamento depositado solidifique sobre a solução de alginato sem aderir à plataforma de impressão. As amostras de consistência mais líquida acabaram formando gotículas de biomaterial que não aderiam à plataforma de impressão nem às gotículas próximas (Figura 19).

Figura 19 – Primeiros testes de impressão. (a) Amostra de biomaterial de consistência pastosa. (b) Amostra de biomaterial de consistência pastosa após retirada da plataforma de impressão. (c) Amostra de biomaterial com consistência líquida.



Fonte: O Autor (2023).

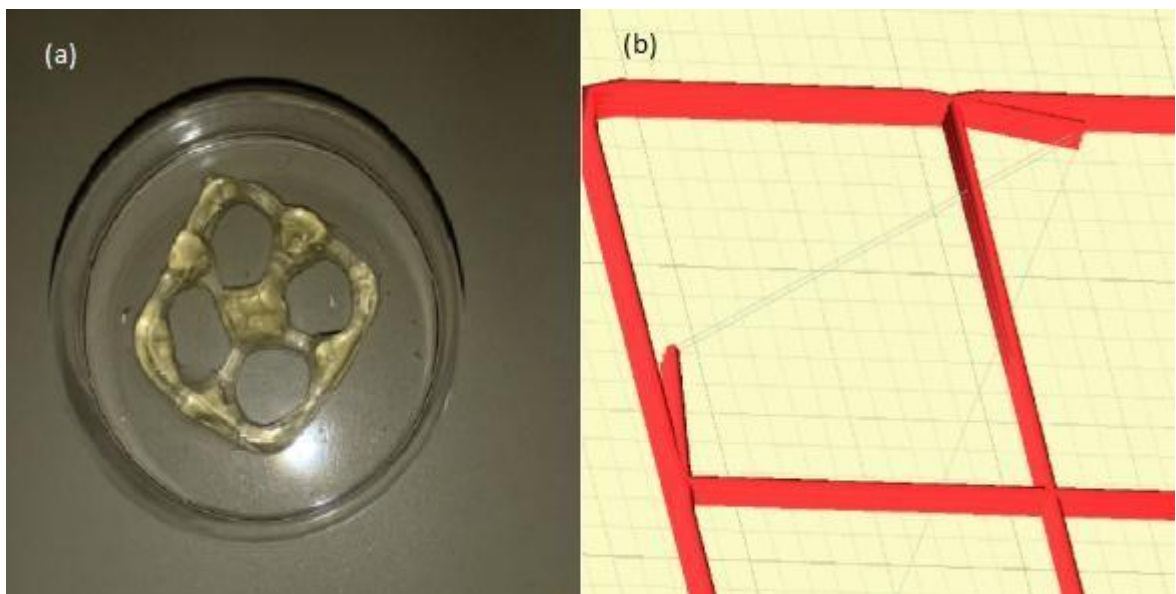
Tendo em vista o ocorrido, optou-se pela continuidade dos testes a partir de outra abordagem, onde o biomaterial seria depositado em um primeiro momento e após finalizado o processo de impressão, seria gotejada a solução de cloreto de cálcio sobre a amostra através de gotejamento simples com pipeta manual. Desta maneira, resultados mais consistentes foram alcançados (Figura 20).

Realizados os testes, o seguinte pôde ser observado:

- ❖ Apenas foi possível imprimir minimamente o sólido proposto com as amostras de consistência mais pastosa;
- ❖ As amostras com maior quantidade de água em sua fórmula perderam maior quantidade de volume com o decorrer do tempo após de realizada impressão;

- ❖ A solução de cloreto de cálcio age de maneira muito veloz sobre o alginato;
- ❖ Os melhores resultados foram alcançados através da impressão das amostras com maiores quantidades de alginato, gelatina e glicerol;
- ❖ Houveram distorções nas interseções entre as linhas de impressão definidas pelo G-code devido à definição das trajetórias.

Figura 20 – (a) Arcabouço impresso com o biomaterial que apresenta maiores quantidades de alginato, gelatina e glicerol. (b) Trajetórias definidas para a impressão.



Fonte: O Autor (2023).

4.1.2 Desenvolvimento do Novo Biomaterial e Novos Testes de Impressão

Após realizados os testes de impressão e de acordo com os resultados obtidos, nova formulação de biomaterial foi proposta, dessa vez visando o alcance de um material que apresente alta viscosidade com aparência de pasta, com maiores quantidades de alginato, gelatina e glicerol. Além disso, optou-se pela adição de fosfato de sódio para redução da velocidade de ação da solução de cloreto de cálcio sobre o alginato, uma vez que o alginato e o fósforo presentes na solução concorreriam para a captura dos íons de cálcio.

O novo biomaterial foi produzido através do seguinte protocolo:

- ❖ Inicialmente foram misturados em um béquer, até homogeneidade, 2 mL de água destilada, 20,16 g de glicerol e 400 mg de cloreto de cálcio;

- ❖ Em um outro recipiente são misturados, até que a homogeneidade seja alcançada, 16 mL de água destilada e 20,16 g de glicerol;
- ❖ São adicionados no segundo recipiente 1 g de alginato, 1 g de gelatina, 100 mg de agarose e 365 mg de fosfato de sódio. O processo de adição deve ser realizado enquanto a amostra é agitada e aquecida, de maneira lenta para assegurar que os componentes sejam devidamente dissolvidos;
- ❖ É adicionada a solução com cloreto de cálcio ao segundo recipiente. A mistura deve ser misturada rapidamente;
- ❖ Por fim, o produto é armazenado em seringas com 20 mL de volume interno. As seringas são armazenadas com auxílio de suportes.

O biomaterial obtido através do procedimento descrito acima possui alta viscosidade e apresentando consistência pastosa. Possui coloração esbranquiçada e apresenta alta adesividade à superfícies. A adição de uma pequena quantidade de cloreto de cálcio antes do processo de impressão auxiliou o alcance de tais características. A alta viscosidade do material, porém, impossibilitou o uso de agulhas para a deposição do material na plataforma de impressão. Para a realização dos novos testes de impressão foi adaptado sistema de extrusão utilizando ponteira para uso em micropipeta de 200 μ l (Figura 21). O diâmetro medido do orifício de extrusão da ponteira foi de aproximadamente 0,4 mm.

Figura 21 – Ponteira de micropipeta utilizada como bico extrusor da impressora.



Fonte: O Autor (2023).

Também foi elaborado novo modelo de arcabouço para a impressão de menores dimensões, para permitir um menor tempo de impressão e menor uso de material. O código G-code foi criado de modo que as rotas de impressão fossem melhores dispostas, diminuindo assim as distorções de impressão observadas anteriormente.

O procedimento de impressão foi realizada de acordo com os mesmos procedimentos que funcionaram anteriormente. Porém, novos pontos puderam ser observados durante o processo de fabricação dos arcabouços. Devido ao processo de mistura realizado na produção do biomaterial, diversas microbolhas foram observadas na estrutura do biomaterial armazenado (Figura 19a). Tendo em vista que tais bolhas poderiam afetar de maneira significativa o processo de impressão, a seringa e o equipo foram posicionados no equipamento e pressão foi aplicada sobre o sistema até que o material começasse a ser dispensado pelo bico extrusor. A partir deste momento, foi posicionado na saída do sistema, tecido formado de microfibras, capazes de impedir a passagem do biomaterial, mas que permitia a passagem do ar (Figura 22b). Após decorridas 24 horas, o sistema se encontrava livre de bolhas (Figura 22c).

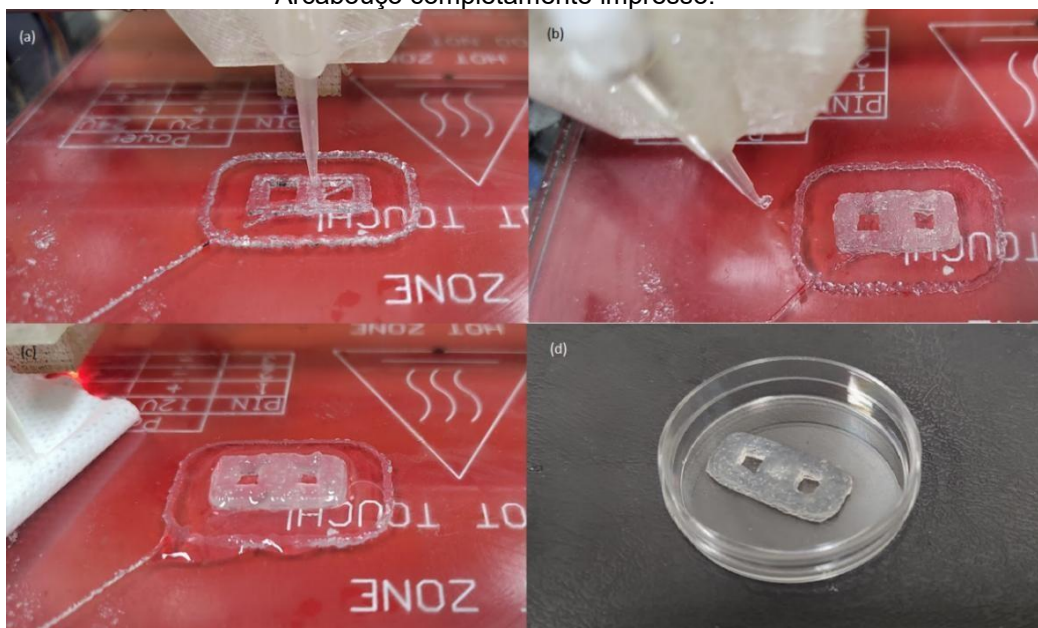
Figura 22 – (a) Seringa de biomaterial com bolhas em seu interior. (b) Seringa com pressão aplicada. (c) Sistema de extrusão sem a presença de bolhas.



Fonte: O Autor (2023).

O novo biomaterial implementado apresentou melhora considerável em sua adesividade à superfície da plataforma de impressão e à superfície dos filamentos já impressos. A precisão na delimitação da área de impressão e a na deposição das linhas foram ampliadas em grande proporção. O arcabouço também apresentou boa estabilidade vertical, indicando que poderiam ter sido alcançadas maiores alturas no processo de impressão. Após a finalização da deposição do biomaterial, este foi imerso em solução de cloreto de cálcio a 1% em água destilada por 5 minutos, para gelificação final do arcabouço (Figura 23). Após finalizadas todas as etapas descritas, o arcabouço foi retirado com o auxílio de uma pinça e armazenado a temperatura ambiente em placa de Petri.

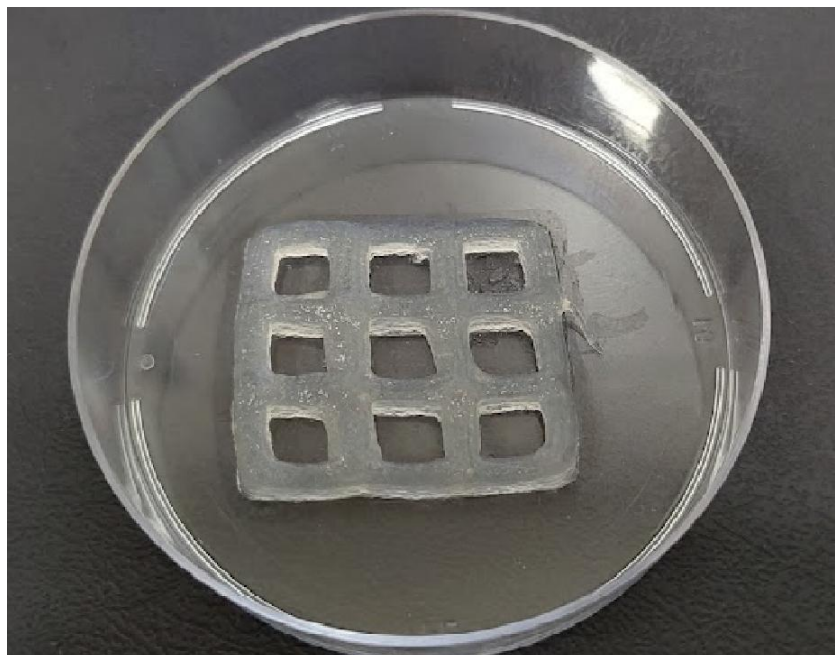
Figura 23 – (a) Delimitação da área de impressão e deposição da primeira camada. (b) Deposição completa das camadas do arcabouço. (c) Arcabouço imerso em solução de cloreto de Cálcio. (d) Arcabouço completamente impresso.



Fonte: O Autor (2023).

Resultados de impressão a partir dessa metodologia demonstraram-se constates. Após repetições, nova arquitetura de arcabouço celular, com maiores dimensões, foi projetada e testada, aprimorando as rotas de deposição planejada e aumentando a velocidade de impressão. Notou-se que houve melhora considerável na precisão. Ainda assim, o arcabouço impresso demonstrou ser estável mecanicamente e de fácil manipulação após impressão (Figura 24).

Figura 24 – Impressão realizada com maior velocidade de impressão.



Fonte: O Autor (2023).

4.2 FTIR

4.2.1 Análise dos espectros FTIR

Com relação as matérias-primas, o alginato de sódio (pó) (Figura 25) apresentou os seguintes máximos: 3287 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial do grupamento hidroxila (O-H), 1608 cm^{-1} atribuídos à (COO⁻) assimétrico, 1440 cm^{-1} que são atribuídos à vibração de deformação (C-OH) e com contribuição assimétrica do grupamento (COO⁻) e 1050 cm^{-1} que são atribuídos à vibração dos grupamentos (C-O) e (C-C) e deformação angular dos (C-O-C) dos anéis dos carboidratos presentes nas estruturas dos polímeros e nos grupamentos laterais (C-OH) e (C-H) (LEAL *et al*, 2007; PAULA *et al*, 2010).

A gelatina (Figura 26) apresentou os seguintes máximos: 3280 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial do grupamento hidroxila (O-H), 1630 cm^{-1} atribuídos à deformação axial da amida (C=O), 1523 cm^{-1} que são atribuídos à vibração de deformação (C-N) e flexão (N-H) da amida II e 1230 cm^{-1} , atribuído ao estiramento C-N e flexão N-H da amida III (LEAL *et al*, 2007; NGUYEN *et al*, 2010).

Figura 25 – Gráfico do espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do alginato de sódio (pó).



Fonte: O Autor (2023).

Figura 26 – Gráfico do espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier da gelatina.



Fonte: O Autor (2023).

A agarose (Figura 27) apresentou os seguintes máximos: 3280 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial do grupamento hidroxila (O-H), 1613 cm^{-1} atribuídos à (COO^-) assimétrico e 1030 cm^{-1} , atribuídos à vibração dos grupamentos (C-O) e (C-C) e deformação angular dos (C-O-C) dos anéis dos carboidratos presentes nas estruturas dos polímeros e nos grupamentos laterais (C-OH) e (C-H) (LEAL *et al*, 2007; PAULA *et al*, 2010).

O glicerol (Figura 28) apresentou os seguintes máximos: 3385 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial de grupamento hidroxila (O-H), 1651 cm^{-1} atribuídos

ao estiramento vibracional na ligação hidroxila com um hidrogênio (H-O-H), 1412 cm^{-1} atribuídos à vibração de deformação (C-OH). Na região de 2963 e 2923 cm^{-1} , são encontradas as bandas de absorção de estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-H (LEAL *et al*, 2007; PAULA *et al*, 2010; PAVIA *et al*, 2010).

Figura 27 – Gráfico do espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier da agarose.



Fonte: O Autor (2023).

Figura 28 – Gráfico do espectro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier do glicerol.

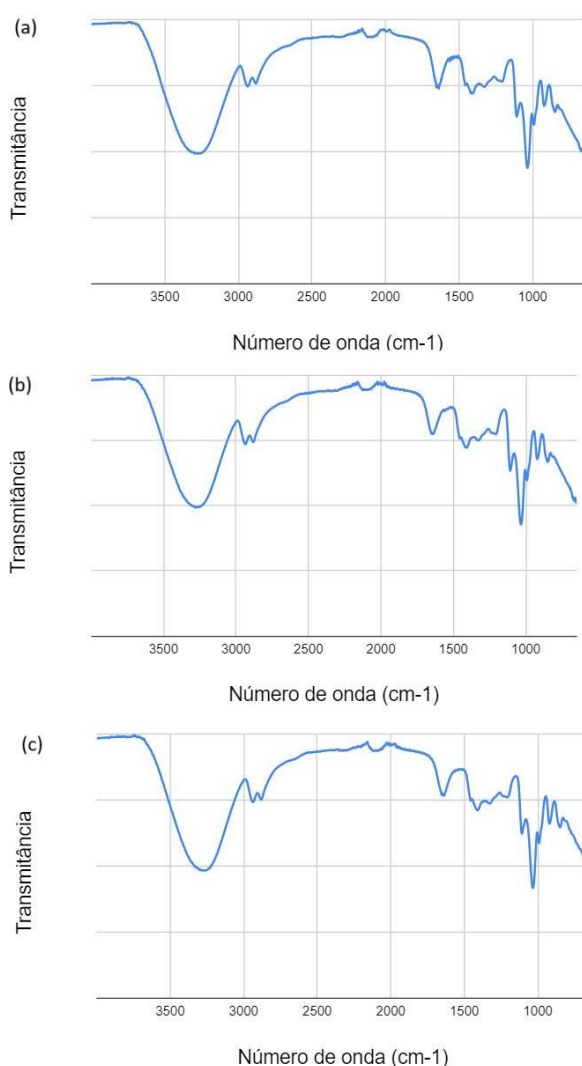


Fonte: O Autor (2023).

Para o biomaterial produzido antes da impressão de arcabouço, a seção externa do arcabouço impresso e a seção interna desse (Figura 29), notou-se a presença dos mesmos máximos: 3240 cm^{-1} que são atribuídos à deformação axial

do grupamento hidroxila (O-H), 2963 e 2923 cm^{-1} , as bandas de absorção de estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-H, 1630 cm^{-1} , atribuído ao estiramento C-N e flexão N-H, e 1040 cm^{-1} que são atribuídos à vibração dos grupamentos (C-O) e (C-C) e deformação angular dos (C-O-C) dos anéis dos carboidratos presentes nas estruturas dos polímeros e nos grupamentos laterais (C-OH) e (C-H).

Figura 29 – Gráficos de espectro de absorção na região do infravermelho com transformada dos: (a) biomaterial produzido, (b) seção externa do arcabouço impresso, (c) seção interna do arcabouço impresso.



Fonte: O Autor (2023).

A imersão em solução de cloreto de cálcio para gelificação do alginato no arcabouço não afeta visivelmente a estrutura do gráfico de transmitância do biomaterial como um todo. É possível observar a presença dos picos de absorção

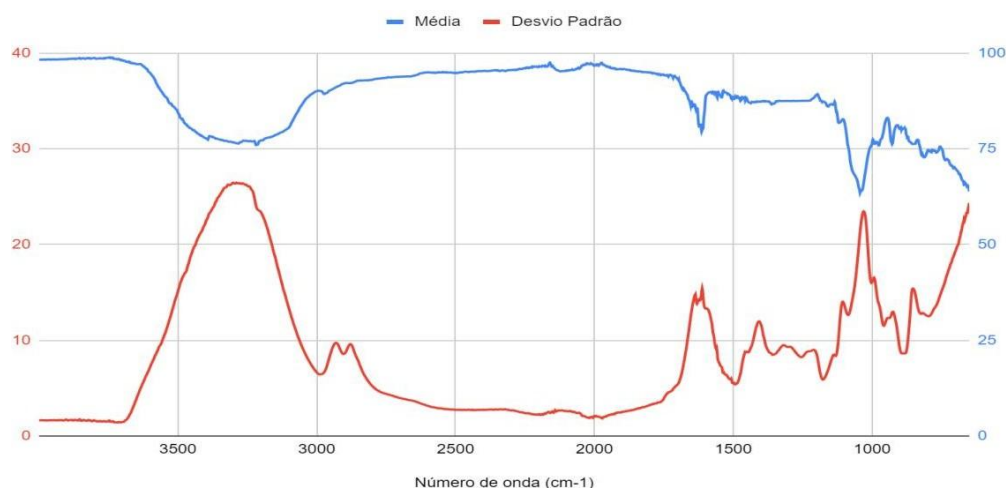
característicos nos mesmos números de onda.

4.2.2 Análise computacional

Os ensaios computacionais utilizando análise multivariada, seguiu o roteiro proposto por Lima (2020) que consiste em analisar inicialmente por estatística descritiva 1798 agrupamentos de dados. Cada agrupamento consiste em um número de onda específico gerado pelo FTIR/ATR.

Neste experimento, dois agrupamentos foram formados. O primeiro consistindo pelo biomaterial e as matérias-primas utilizadas em sua produção. O segundo grupo é formado pelo biomaterial e o biomaterial gelificado, retirado a partir de um arcabouço impresso, de onde foram retiradas para análise sessões internas e externas. A partir destes dados foram calculados os desvios padrões e as médias de todos os agrupamentos gerados, em seguida estes dados foram plotados (Figura 30).

Figura 30 – Gráfico das médias e dos desvios padrão para os dados de FTIR do grupamento 1.



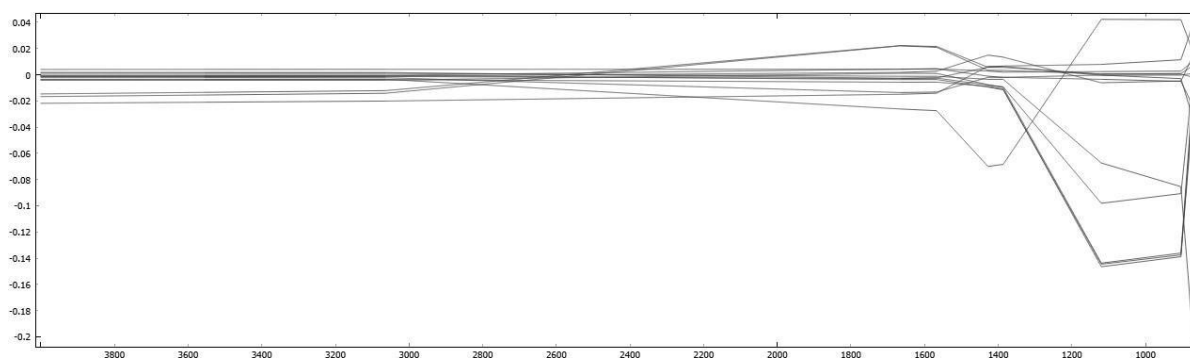
Fonte: O Autor (2023).

A partir de simulações e observações empíricas, Lima (2020) determinou que regiões com valores de desvio-padrão maiores que dez, prejudicavam a análise de PCA. Seguindo esta regra empírica, no primeiro grupamento no foram excluídas durante o processo de filtragem as regiões: 650,42 a 870,333 cm^{-1} ; 905,743 a 1120,065 cm^{-1} ; 1388,433 a 1427,57 cm^{-1} ; 1569,209 a 1664,856 cm^{-1} ; e 3063,872 a 3554,017 cm^{-1} ;

Após a delimitação as regiões excluídas da análise, os dados foram tratados no software Orange, aplicando-se os seguintes filtros:

- ❖ Filtro Savitzky-Golay;
- ❖ Remoção dos intervalos de dados com desvio padrão maior que 10;
- ❖ Suavização Gaussiana;
- ❖ Correção da linha de base nas regiões onde houve remoção dos dados.

Figura 31 – Aspecto final após pré-tratamento dos espectros FTIR do agrupamento 1.

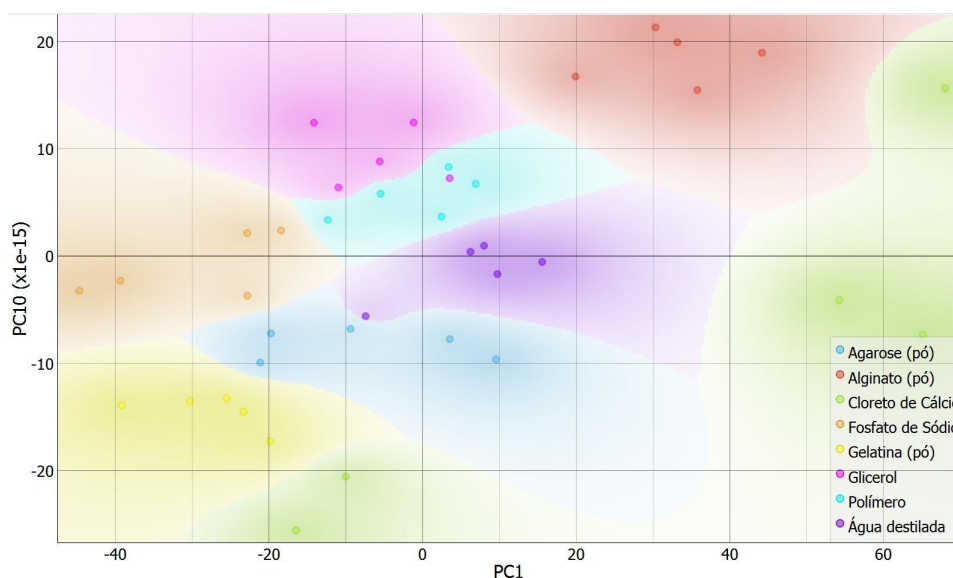


Fonte: O Autor (2023).

Segundo Silva (2005), a análise de componentes principais (PCA) pode ser uma ferramenta quimiométrica importante, pois reduz o número de variáveis envolvidas na modelagem de dados analisados. Neste sentido, os componentes principais possuem um papel importante, pois idealmente tem o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados.

Foi possível identificar por meio do gráfico de dispersão (Figura 32), certa predisposição a formação de agrupamentos entre classes similares, indicados por cores. Análise de dispersão possibilita a obtenção de dados importantes, entretanto as delimitações das bordas nos gráficos entre os dispositivos parecem difusas, podendo acarretar eventuais erros de classificação. Tal situação acontece pois o gráfico de dispersão possibilita somente a análise de dois componentes principais por vez, o que limita a ferramenta já que outros PCs poderiam contribuir de alguma forma na delimitação dos agrupamentos e das bordas.

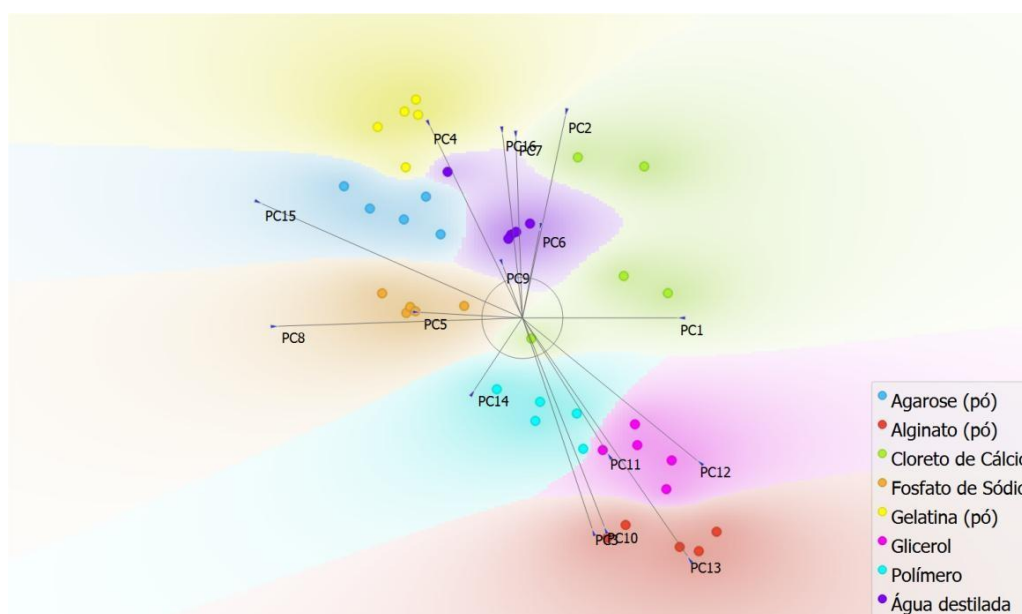
Figura 32 – Gráfico de dispersão para os dados de FTIR do grupamento 1.



Fonte: O Autor (2023).

Por conta dessas limitações foram realizadas também simulações no FreeViz (Figura 33), ferramenta que possibilita a inserção de novos eixos de componentes principais na mesma representação gráfica e adicionalmente possui duas funcionalidades. A primeira otimiza os eixos selecionados e a segunda permite a movimentação (angulação) e dimensionalidade deles.

Figura 33 – Gráfico da ferramenta FreeViz considerando 16 PC's e utilizando a ferramenta de otimização para os dados de FTIR do grupamento 1.



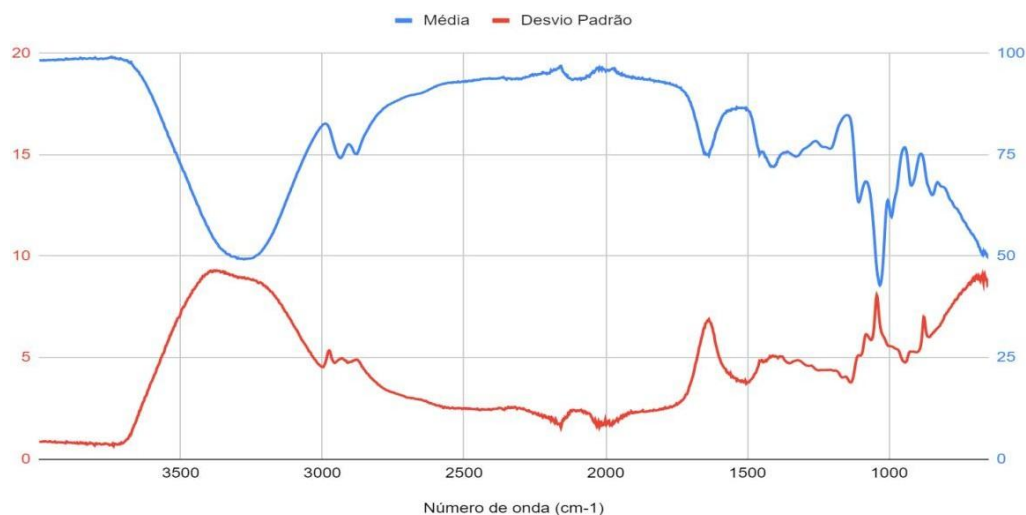
Fonte: O Autor (2023).

A utilização da ferramenta FreeViz possibilitou a formação mais clara dos grupamentos observados no gráfico de dispersão. Neste tipo de visualização os dispositivos ficam dispostos de acordo com a contribuição de cada matéria-prima utilizada. O biomaterial produzido apresentou proximidade com o alginato em pó, o glicerol, o fosfato de sódio e o cloreto de cálcio.

Durante a análise dos dados do segundo grupamento e a partir da análise dos gráficos de médias e desvio padrão (Figura 34), observou-se a inexistência regiões do espectro que apresentavam desvio padrão maior que 10. Sendo assim, os dados foram tratados no software Orange aplicando-se os seguintes filtros:

- ❖ Filtro Savitzky-Golay;
- ❖ Suavização Gaussiana.

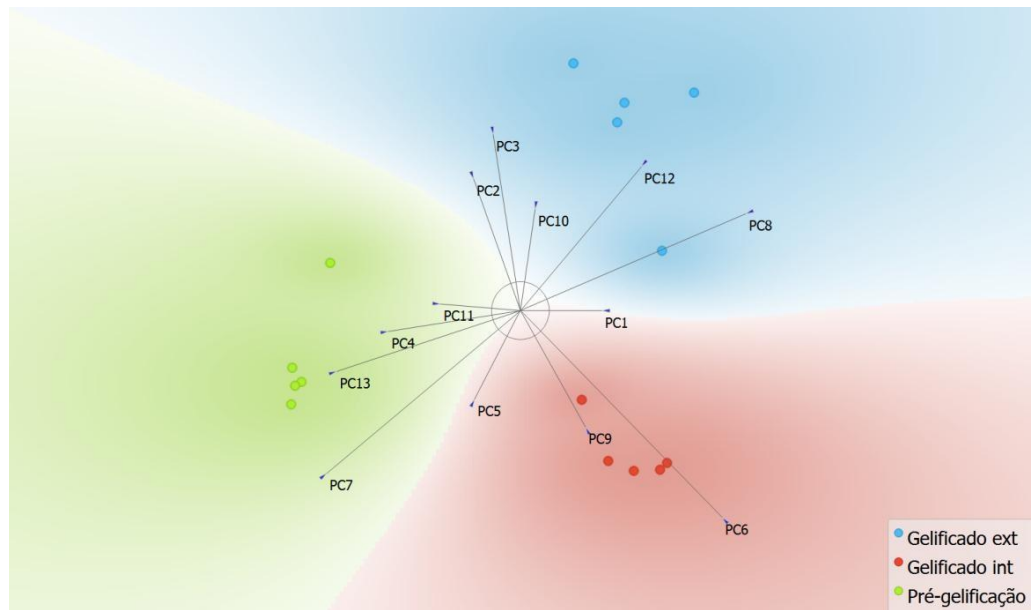
Figura 34 – Gráfico das médias e dos desvios padrão para os dados de FTIR do grupamento 2.



Fonte: O Autor (2023).

No gráfico gerado pela ferramenta FreeViz (Figura 35) para o grupamento 2 é possível constatar a delimitação clara entre o biomaterial produzido antes do processo de gelificação e o biomaterial após realizada a impressão e gelificação. Pode-se notar ainda a delimitação clara entre as amostras retiradas da superfície do arcabouço impresso e as amostras retiradas da região interna do arcabouço. Pode-se inferir assim que o processo de gelificação não ocorre de maneira uniforme por toda a estrutura do arcabouço, de modo que provavelmente esse processo ocorre no sentido da região externa para a região interna.

Figura 35 – Gráfico da ferramenta FreeViz considerando 13 PC's e utilizando a ferramenta de otimização para os dados de FTIR do grupamento 2.



Fonte: O Autor (2023).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O projeto e desenvolvimento da impressora 3D foi alcançado de acordo com as diretrizes propostas. A aplicação de matéria-prima de baixo custo e a adoção de softwares livres proporciona facilidade de implementação. A produção do biomaterial a partir da combinação de alginato, gelatina, agarose e glicerol gerou um material viscoso de fácil impressão a partir da deposição sobre a plataforma de impressão. A gelificação a partir do uso da solução de cloreto de cálcio proporcionou ótima estabilidade dos arcabouços impressos. O material produzido também é de fácil manuseio e utilização. O uso de materiais biocompatíveis em sua formulação aponta para boa compatibilidade para aplicações biomédicas.

O desenvolvimento da metodologia de impressão e a impressão propriamente dita de arcabouços celulares foi possível com a utilização do biomaterial produzido. Os arcabouços impressos a partir da metodologia apresentaram características promissoras, sendo estáveis, de fácil produção e manipulação. Os arcabouços impressos demonstraram ainda, boa fidelidade ao modelo de referência. Tais resultados são promissores, indicando a adequação da metodologia para a produção de arcabouços celulares. Todavia, ainda existe larga margem para a melhoria da fidelidade. Testes para a impressão de arcabouços celulares mais complexos ainda podem revelar limitações da metodologia desenvolvida. Nesse sentido, testes relacionados à estruturas de suporte para impressão seriam centrais para a viabilização da impressão de geometrias mais avançadas.

Os testes espectroscópicos evidenciaram a presença das matérias-primas empregadas na produção do biomaterial. A classificação das amostras das sessões internas e externas dos arcabouços impressos através da análise de PCA indica que a penetração dos cátions de cálcio e a consequente gelificação do biomaterial acontecem de fora para dentro no arcabouço. O estudo desse fenômeno proporcionaria melhor entendimento desse fato e dos impactos que podem ser gerados ao imprimir-se um arcabouço.

A escolha dos materiais e métodos utilizados foi de extrema importância para modelagem da metodologia. Os resultados alcançados indicam que a metodologia aplicada e o biomaterial produzido são promissores, porém, mais estudos são necessários para o refino da tecnologia.

REFERÊNCIAS

- ABDELWAHED, Wassim et al. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688-1713, 2006.
- AGÜERO, Lissette et al. Alginate microparticles as oral colon drug delivery device: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 168, p. 32-43, 2017.
- AHMED, Shakeel; SOUNDARARAJAN, Aisverya (Ed.). **Marine polysaccharides: Advances and multifaceted applications**. CRC Press, 2018.
- ALVES, Lucas Repecka et al. Aplicações de hidrogéis como biomateriais: uma revisão de dissertações e teses brasileiras desde 2017. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, v. 22, n. 2, p. 53-79, 2021.
- AUGST, Alexander D.; KONG, Hyun Joon; MOONEY, David J. Alginate hydrogels as biomaterials. **Macromolecular bioscience**, v. 6, n. 8, p. 623-633, 2006.
- BLACK, W. A. P.; WOODWARD, F. N. Alginates from common British brown marine algae..
- CANELÓN, Dilsia J. et al. Structure of highly substituted agarans from the red seaweeds *Laurencia obtusa* and *Laurencia filiformis*. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 705-713, 2014.
- CHUA, Chee Kai; LEONG, Kah Fai; AN, Jia. Introduction to rapid prototyping of biomaterials. *In: Rapid prototyping of biomaterials*. Woodhead Publishing, 2020. p. 1-15.
- CLARK, Allan H. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Food polymers, gels and colloids*, p. 322-338, 1991.
- COX, M. M.; LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. **Princípios de bioquímica**. Porto Alegre - RS, 2014.
- CROW, B. B.; NELSON, K. D. Release of bovine serum albumin from a hydrogel-cored biodegradable polymer fiber. **Biopolymers**, v. 81, n. 6, p. 419-427, 2006.
- DAMODARAN, PARKIN. KL; FENNEMA, OR *Química de Alimentos de Fennema*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- DE GOES FILHO, PAULO ROBERTO SOARES. *Confecção e avaliação mecânica de implantes ortopédicos produzidos em poli (L-ácido láctico)(PLLA) por impressoras 3D*. 2016.
- DEMAN, John M. et al. **Principles of food chemistry**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 1999.

DHANDAYUTHAPANI, Brahatheeswaran et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. **International journal of polymer science**, v. 2011, 2011.

FERREIRA, Diana Mafalda Oliveira. **Extração de agar de algas vermelhas do género Gracilaria**. 2015. Tese de Doutorado.

FRANTZ, Christian; STEWART, Kathleen M.; WEAVER, Valerie M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of cell science**, v. 123, n. 24, p. 4195-4200, 2010.

FUCHS, Julie R.; NASSERI, Boris A.; VACANTI, Joseph P. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. **The Annals of thoracic surgery**, v. 72, n. 2, p. 577-591, 2001.

GEBHARDT, Andreas; HÖTTER, Jan-Steffen. **Additive manufacturing: 3D printing for prototyping and manufacturing**. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 2016.

GOMBOTZ, Wayne R.; WEE, SiowFong. Protein release from alginate matrices. **Advanced drug delivery reviews**, v. 31, n. 3, p. 267-285, 1998.

GRANT, Gregor T. et al. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS letters**, v. 32, n. 1, p. 195-198, 1973.

GRUBER, Helen E. et al. Human intervertebral disc cells from the annulus: three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF- β 1. *Experimental cell research*, v. 235, n. 1, p. 13-21, 1997.

GRUBER, Helen E. et al. Three-dimensional culture of human disc cells within agarose or a collagen sponge: assessment of proteoglycan production. **Biomaterials**, v. 27, n. 3, p. 371-376, 2006.

HARDING, Stephen E. et al. **An introduction to polysaccharide biotechnology**. CRC Press, 2017.

HASNAIN, Md Saquib; NAYAK, Amit Kumar (Ed.). **Natural polysaccharides in drug delivery and biomedical applications**. Academic Press, 2019.

HOSPODIUK, Monika et al. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 2, p. 217-239, 2017.

HU, Yang et al. Evaluation of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate based ionic liquid systems as a suitable solvent for collagen. **Journal of applied polymer science**, v. 130, n. 4, p. 2245-2256, 2013.

HUANG, Haiqin et al. Thermo-sensitive hydrogels for delivering biotherapeutic molecules: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 7, p. 990-999, 2019.

INZANA, Jason A. et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration. **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 4026-4034, 2014.

IRASTORZA-LORENZO, Ainhua et al. Evaluation of marine agarose biomaterials for tissue engineering applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1923, 2021.

JAIN, Anjana et al. In situ gelling hydrogels for conformal repair of spinal cord defects, and local delivery of BDNF after spinal cord injury. **Biomaterials**, v. 27, n. 3, p. 497-504, 2006.

JURISATO, Augusto Seolin et al. Difusão de tecnologia CAD e CNC como ferramenta básica de criação de produção em pequena escala, acessível à comunidade. In: **Congresso de Extensão Universitária**. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2013. p. 09892.

KHADILKAR, Aditya; WANG, Jun; RAI, Rahul. Deep learning-based stress prediction for bottom-up SLA 3D printing process. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 102, p. 2555-2569, 2019.

KLÖCK, Gerd et al. Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 40, n. 5, p. 638-643, 1994.

KONG, Hyun-Joon; LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Decoupling the dependence of rheological/mechanical properties of hydrogels from solids concentration. *Polymer*, v. 43, n. 23, p. 6239-6246, 2002.

KRAMER, Dany Geraldo; DOS SANTOS MACEDO, Amanda Rayla; DE MOURA, Ana Maria Marinho Andrade. A IMPORTÂNCIA DOS HIDROGÉIS NA PESQUISAS ANTIMICROBIANA: REVISÃO DE LITERATURA. *Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc São Miguel do Oeste*, v. 5, p. e26554-e26554, 2020.

KUMAR GIRI, Tapan et al. Alginate based hydrogel as a potential biopolymeric carrier for drug delivery and cell delivery systems: present status and applications. *Current drug delivery*, v. 9, n. 6, p. 539-555, 2012.

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

LANGER, Robert. JP Vacanti. *Tissue engineering*, p. 920-6, 1993.

LANGER, Robert; TIRRELL, David A. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, v. 428, n. 6982, p. 487-492, 2004.

LEAL, D., MATSUHIRO, B., ROSSIB, M., CARUSOC, F. **FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds** *Carbohydrate Research* 343 (2008) 308–316. 23 Oct 2007.

LEE, Kuen Yong et al. Hydrogel formation via cell crosslinking. *Advanced Materials*, v. 15, n. 21, p. 1828-1832, 2003.

LEE, Kuen Yong; BOUHADIR, Kamal H.; MOONEY, David J. Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules. *Biomaterials*, v. 25, n. 13, p. 2461-2466, 2004.

LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LEE, Kuen Yong; YUK, Soon Hong. Polymeric protein delivery systems. *Progress in polymer science*, v. 32, n. 7, p. 669-697, 2007.

LEHNINGER, Albert; NELSON, David. L.; COX, Michel M. *Princípios de Bioquímica*. 6ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

LEROUX, Michelle A.; GUILAK, Farshid; SETTON, Lori A. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, v. 47, n. 1, p. 46-53, 1999.

LIMA, Bruna CS et al. Caracterização de Micro-organismos por Espectroscopia Vibracional no Infravermelho (FTIR). **Anais do IV Simpósio de Inovação em Engenharia Biomédica-SABIO 2020**, p. 21.

MAZZANTI, Valentina; MALAGUTTI, Lorenzo; MOLLICA, Francesco. FDM 3D printing of polymers containing natural fillers: A review of their mechanical properties. *Polymers*, v. 11, n. 7, p. 1094, 2019.

MCROBERTS, Michael. *Arduino básico*. Novatec Editora, 2018.

MORADALI, M. Fata; GHODS, Shirin; REHM, Bernd HA. Alginate biosynthesis and biotechnological production. In: *Alginates and their biomedical applications*. Springer, Singapore, 2018. p. 1-25.

NGO, Tuan D. et al. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering*, v. 143, p. 172-196, 2018.

NGUYEN, Thi-Hiep et al. Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 3, n. 12, p. 1117, 2010.

NORMAND, Valéry et al. New insight into agarose gel mechanical properties. *Biomacromolecules*, v. 1, n. 4, p. 730-738, 2000.

OCKERMAN, Herbert W. et al. **Industrialización de subproductos de origen animal**. Zaragoza: Acribia, 1994.

ORIVE, G. et al. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, v. 23, n. 18, p. 3825-3831, 2002.

OTTERLEI, Marit et al. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *Journal of immunotherapy: official journal of the Society for Biological Therapy*, v. 10, n. 4, p. 286-291, 1991.

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

PARENTEAU-BAREIL, Rémi; GAUVIN, Robert; BERTHOD, François. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*, v. 3, n. 3, p. 1863-1887, 2010.

PAULA, H C. B., Oliveira, E. F., Abreu, F. O. M. S., Paula, R. C. M., Morais, A. M., Forte, M. M. C., **Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm.** *Polímeros*, vol. 20, nº 2, p. 112-120, 2010

PAVIA, Donald L. et al. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andrea CK; MORAES, Angela M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, p. 957-971, 2015.

PLACONE, Jesse K.; ENGLER, Adam J. Recent advances in extrusion-based 3D printing for biomedical applications. *Advanced healthcare materials*, v. 7, n. 8, p. 1701161, 2018.

PONCHEL, Gilles; IRACHE, Juan-Manuel. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Advanced drug delivery reviews*, v. 34, n. 2-3, p. 191-219, 1998.

PRESTES, Rosa Cristina. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 1, 2013.

RATANAVARAPORN, Juthamas et al. Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type A and B gelatin fiber mats. *International journal of biological macromolecules*, v. 47, n. 4, p. 431-438, 2010.

REDWOOD, Ben; SCHFFER, Filemon; GARRET, Brian. **The 3D printing handbook: technologies, design and applications**. 3D Hubs, 2017.

RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer international**, v. 57, n. 3, p. 397-430, 2008.

RZAEV, Zakir MO; DINCER, Sevil; PIŞKIN, Erhan. Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications. *Progress in Polymer Science*, v. 32, n. 5, p. 534-595, 2007.

SACHAN, Nikhil K. et al. Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. *J Pharm Res*, v. 2, n. 8, p. 1191-1199, 2009.

SAKIYAMA-ELBERT, S. E.; HUBBELL, J. A. Functional biomaterials: design of novel biomaterials. *Annual Review of Materials Research*, v. 31, n. 1, p. 183-201, 2001.

SÁNCHEZ-SALCEDO, S.; NIETO, A.; VALLET-REGÍ, M. Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering. **Chemical engineering journal**, v. 137, n. 1, p. 62-71, 2008.

SCHRIEBER, Reinhard; GAREIS, Herbert. **Gelatine handbook: theory and industrial practice**. John Wiley & Sons, 2007.

SHIMOKOMAKI, Massami et al. Atualidades em ciência e tecnologia de carnes. São Paulo: Varela, p. 18-21, 2006.

SILVA, Estela Fernandes et al. Engenharia tecidual de cartilagem articular com ênfase em odontologia. RFO UPF, v. 20, n. 3, p. 372-379, 2015.

SILVA, João Bosco P. da et al. Aplicação de análise de componentes principais para verificação de atribuições de sinais nos espectros de RMN ^1H : o caso dos 3-*aril* (1, 2, 4)-oxadiazol-5-carboidrazida benzilidenos. Química Nova, v. 28, p. 492-496, 2005.

SILVA, Tatiane Ferreira da; PENNA, Ana Lúcia Barretto. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. Revista do Instituto Adolfo Lutz, p. 530-539, 2012.

SINGH, Akhilesh Vikram; LI, Bang-Jing. Polysaccharides in Advanced Drug Delivery. CRC Press, 2020.

SMEDS, Kimberly A.; GRINSTAFF, Mark W. Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials**, v. 54, n. 1, p. 115-121, 2001.

STANFORD, E. C. C. ON ALGIN, A NEW SUBSTANCE OBTAINED FROM SOME OF THE COMMONER SPECIES OF MARINE ALGAE. American Journal of Pharmacy (1835-1907), p. 617, 1883.

STAYTON, P. S.; HOFFMAN, A. S. "Smart" pH-Responsive Carriers for Intracellular Delivery of Biomolecular Drugs. **Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers**, p. 143-159, 2008.

STELLWAGEN, John; STELLWAGEN, Nancy C. Internal structure of the agarose gel matrix. **The journal of physical chemistry**, v. 99, n. 12, p. 4247-4251, 1995.

STRATTON, Scott et al. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. Bioactive materials, v. 1, n. 2, p. 93-108, 2016.

TAKAHASHI, Suélen Harumi. **Desenvolvimento de hidrogéis inteligentes como meio de liberação controlada de fármaco**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TANAKA, Hideaki; SATO, Yoshimi. Photosensitivity of polyvinylesters of substituted cinnamylideneacetic acids. Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry, v. 10, n. 11, p. 3279-3287, 1972.

TRAN, Thi Nga et al. Cocoa shell waste biofilaments for 3D printing applications. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 302, n. 11, p. 1700219, 2017.

VACANTI, Joseph P.; LANGER, Robert. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **The lancet**, v. 354, p. S32-S34, 1999.

WILLIAMS, David F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.

WILLIAMS, David F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.

WILLIAMS, David Franklyn (Ed.). Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986. Elsevier Science Limited, 1987.

WONG, Kaufui V.; HERNANDEZ, Aldo. A review of additive manufacturing. International scholarly research notices, v. 2012, 2012.

YAN, Qian et al. A review of 3D printing technology for medical applications. Engineering, v. 4, n. 5, p. 729-742, 2018.

YAZDI, Mohsen Khodadadi et al. Agarose-based biomaterials for advanced drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 326, p. 523-543, 2020.

ZARRINTAJ, Payam et al. Agarose-based biomaterials for tissueengineering. **Carbohydrate polymers**, v. 187, p. 66-84, 2018.

ZHAO, Da Xu et al. Study on the preparation of bamboo plastic composite intend for additive manufacturing. In: Key Engineering Materials. Trans Tech Publications Ltd, 2016. p. 250-258.

ZHU, Junmin; MARCHANT, Roger E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert review of medical devices**, v. 8, n. 5, p. 607-626, 2011.

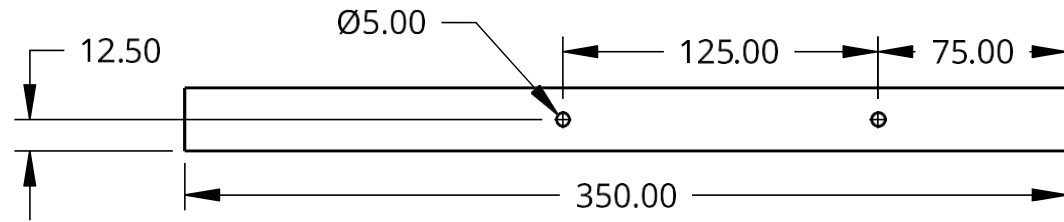
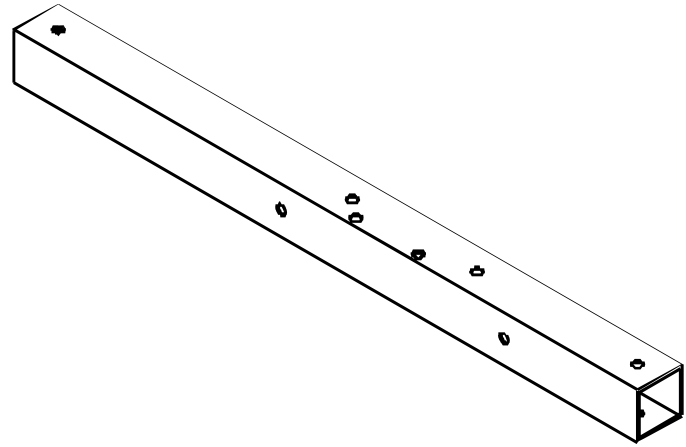
APÊNDICE A – PROJETO DETALHADO DA IMPRESSORA 3D

B

B

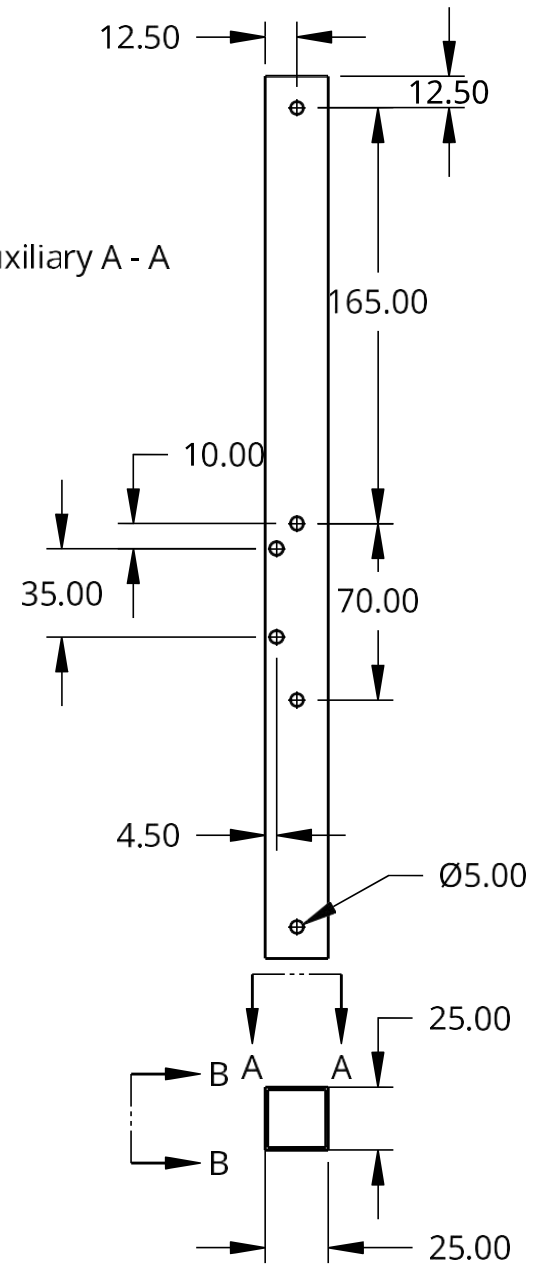
A

A



Auxiliary B - B

Auxiliary A - A

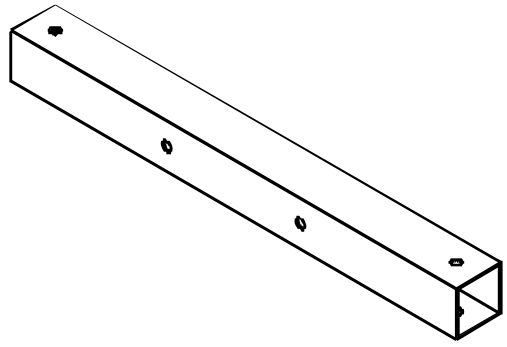


B

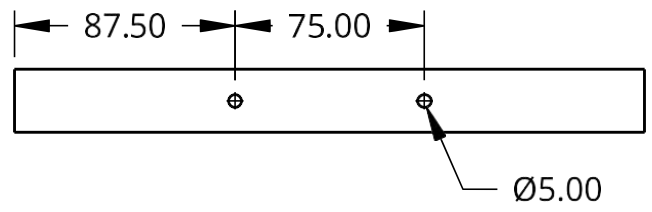
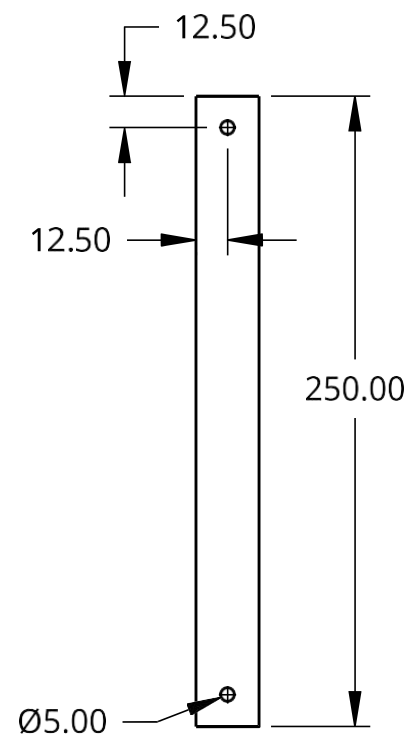
B

A

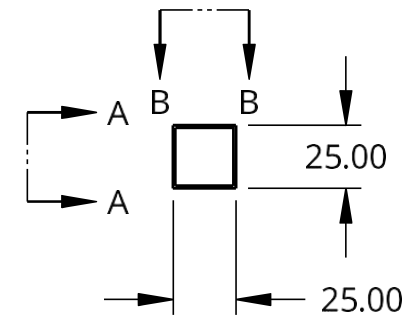
A



Auxiliary B - B



Auxiliary A - A



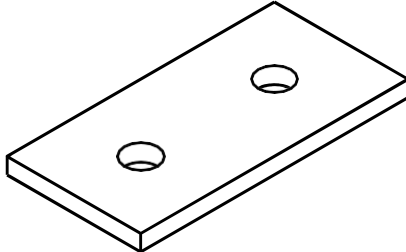
2

1

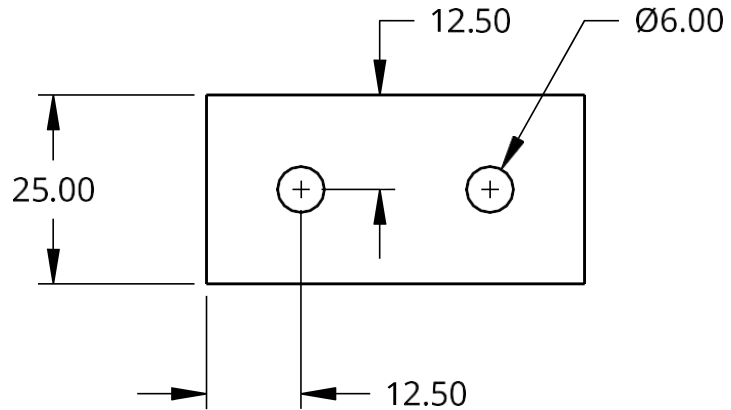
80

B

B

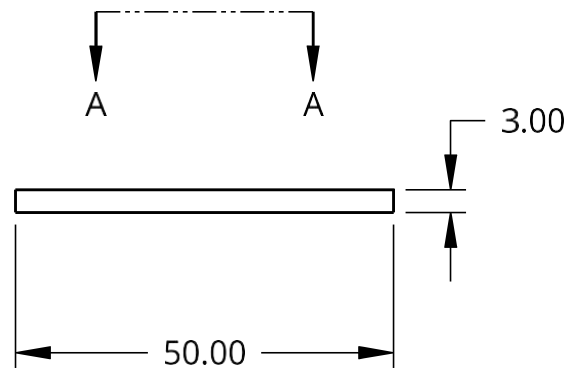


Auxiliary A - A



A

A



2

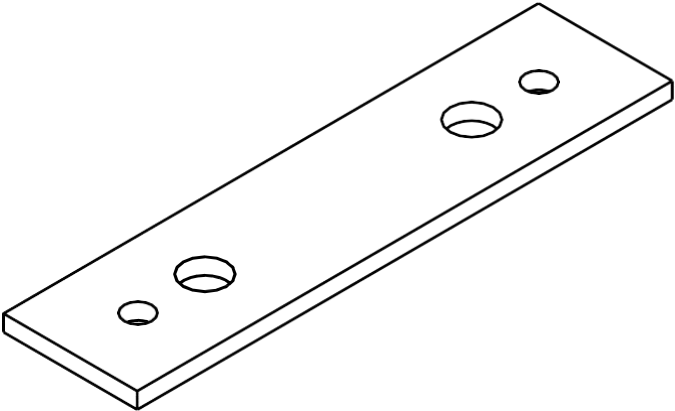
1

B

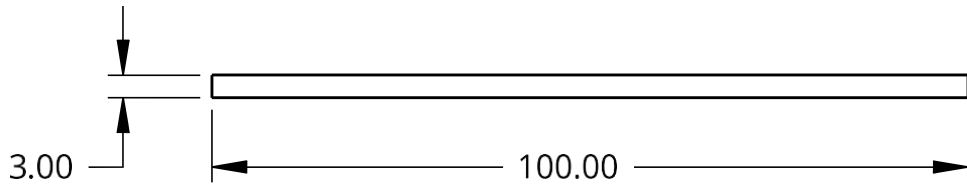
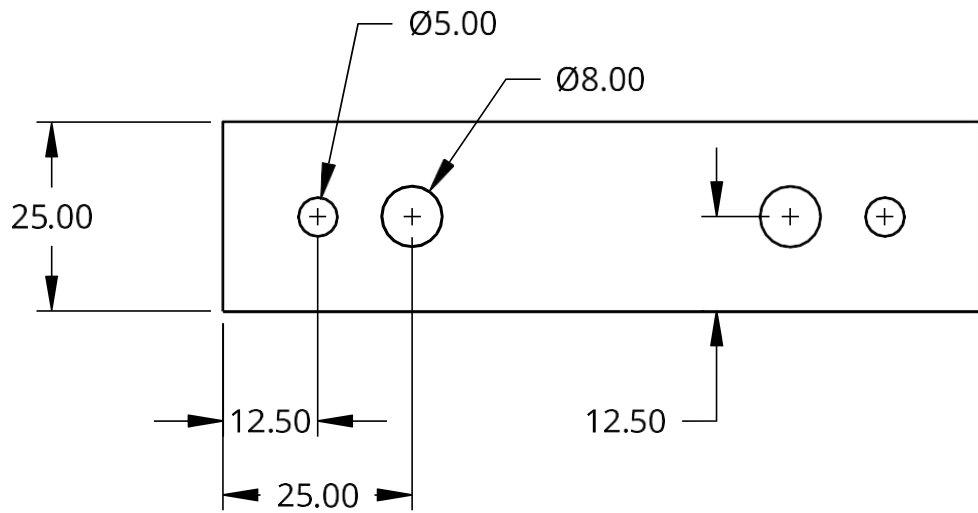
A

B

A



Auxiliary A - A

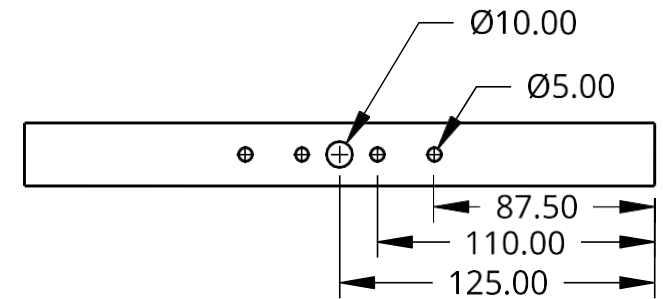
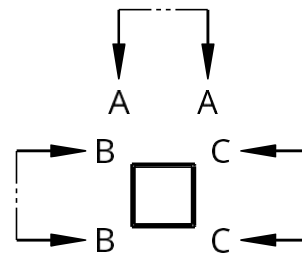
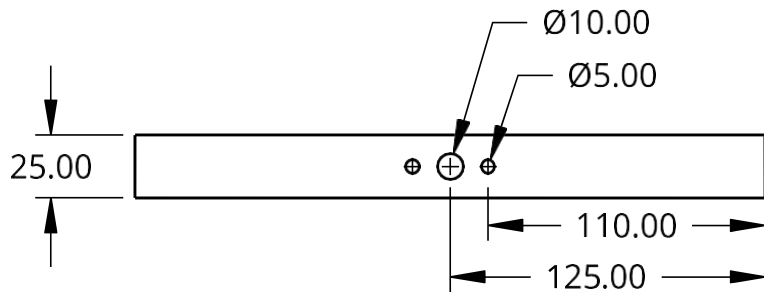
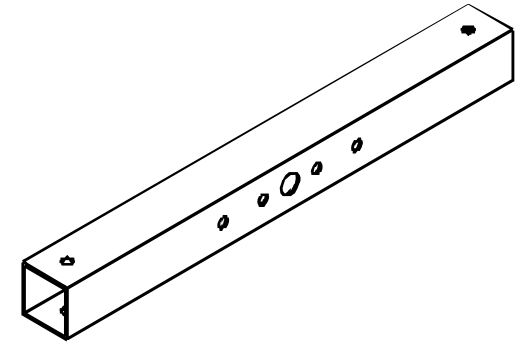
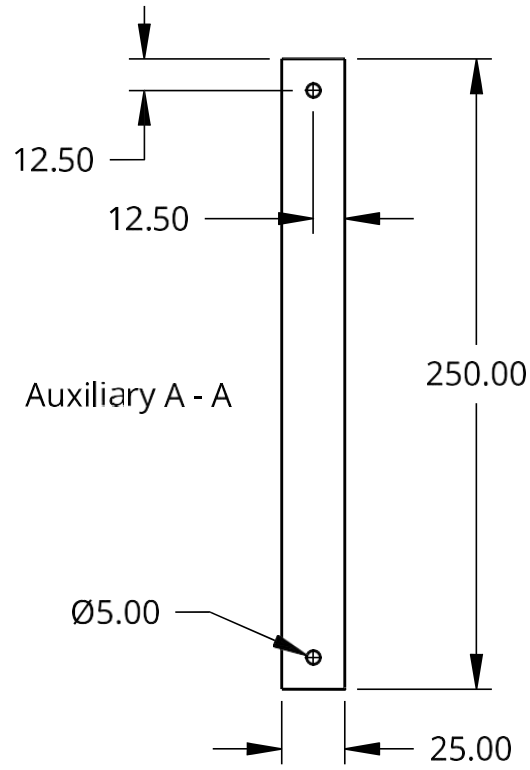
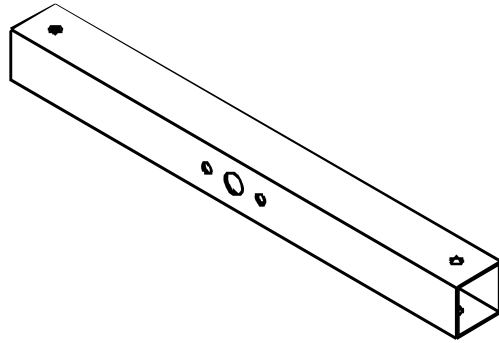


B

B

A

A



Auxiliary B - B

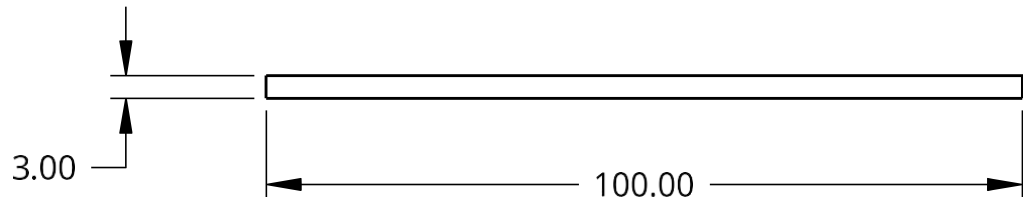
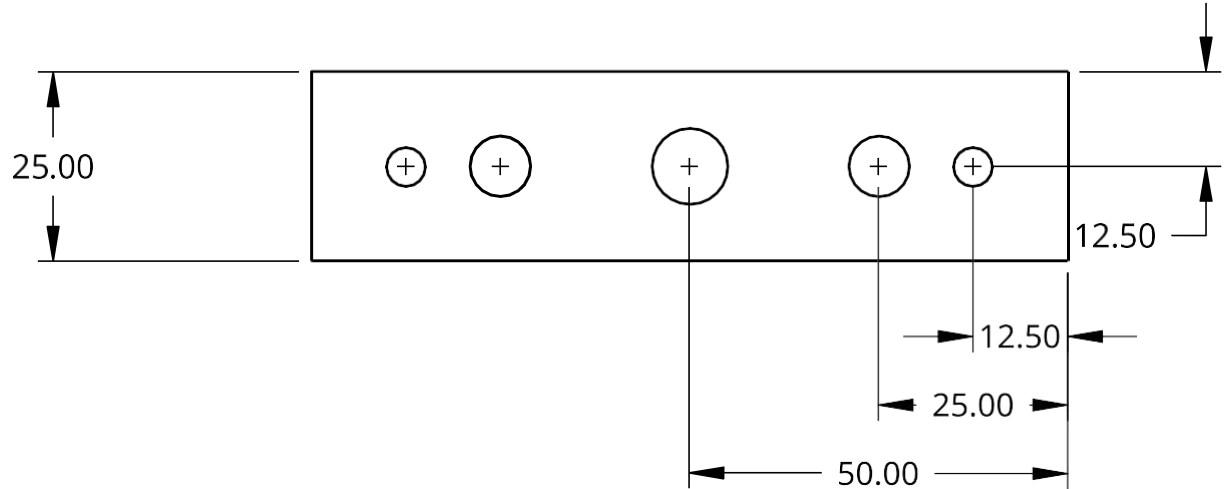
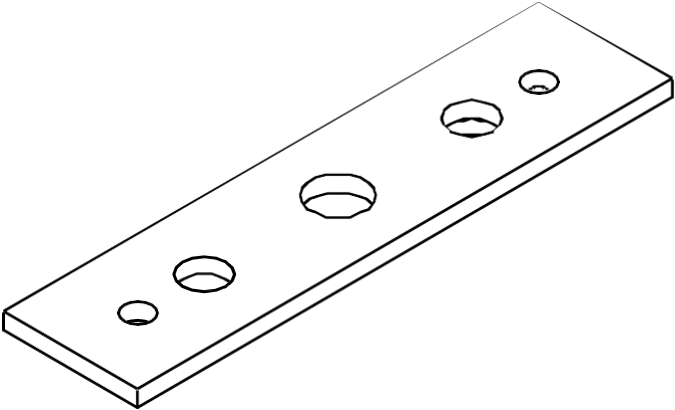
Auxiliary C - C

2

1

83

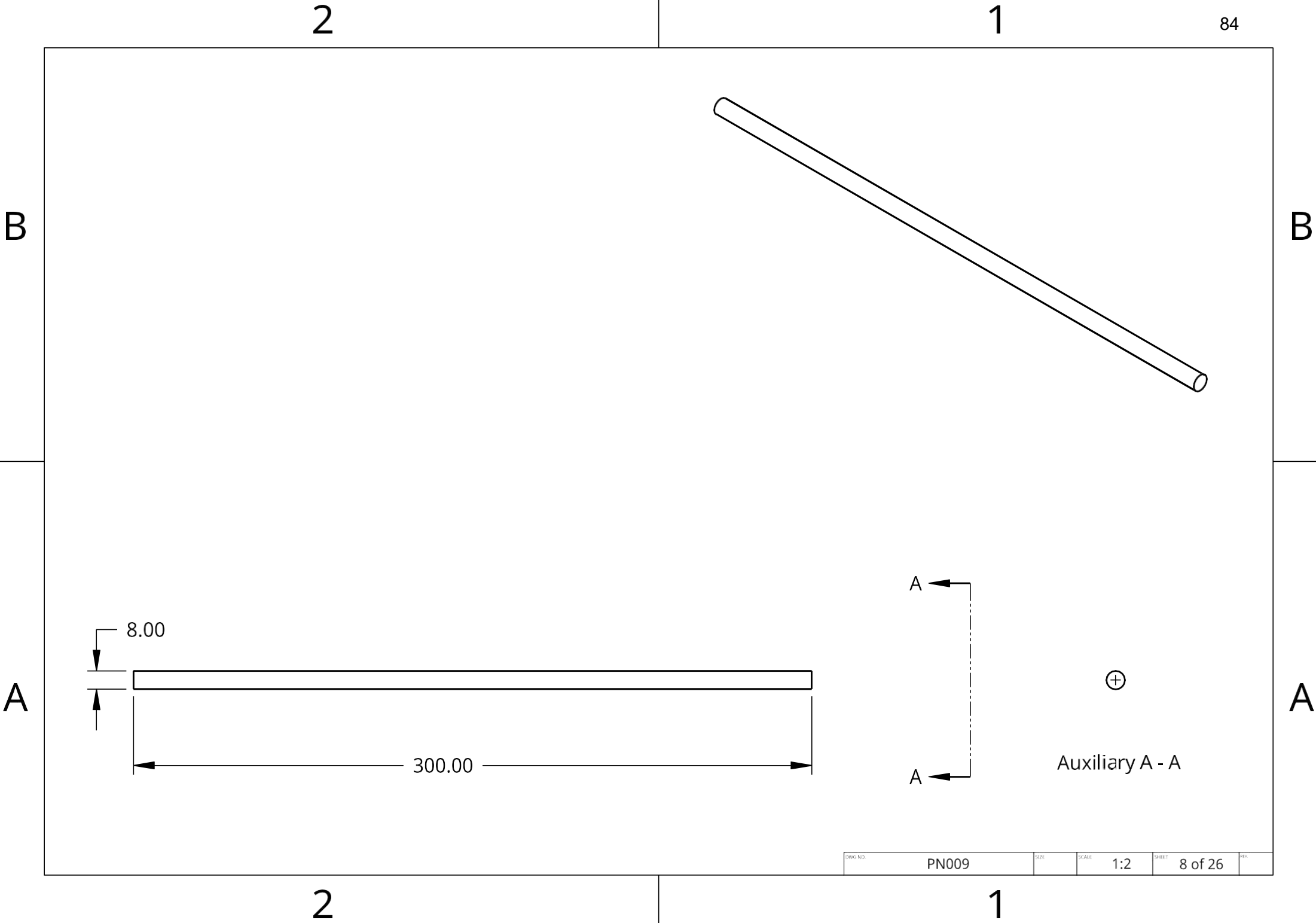
Auxiliary A - A



DWG NO.	PN008	SIZE	SCALE	1:1	SHEET	7 of 26	REV
---------	-------	------	-------	-----	-------	---------	-----

2

1

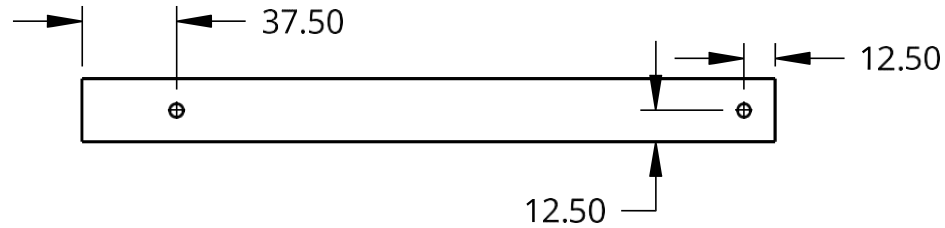
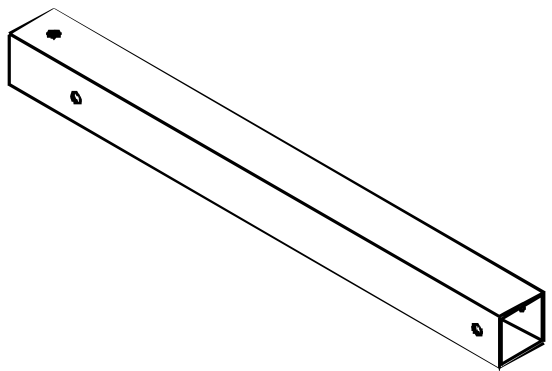


B

A

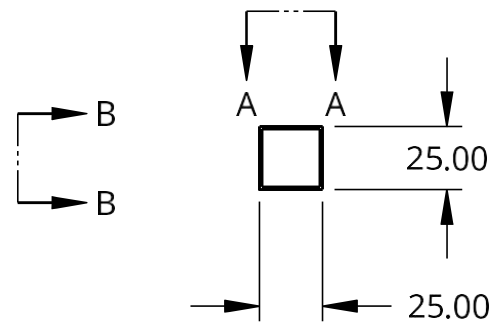
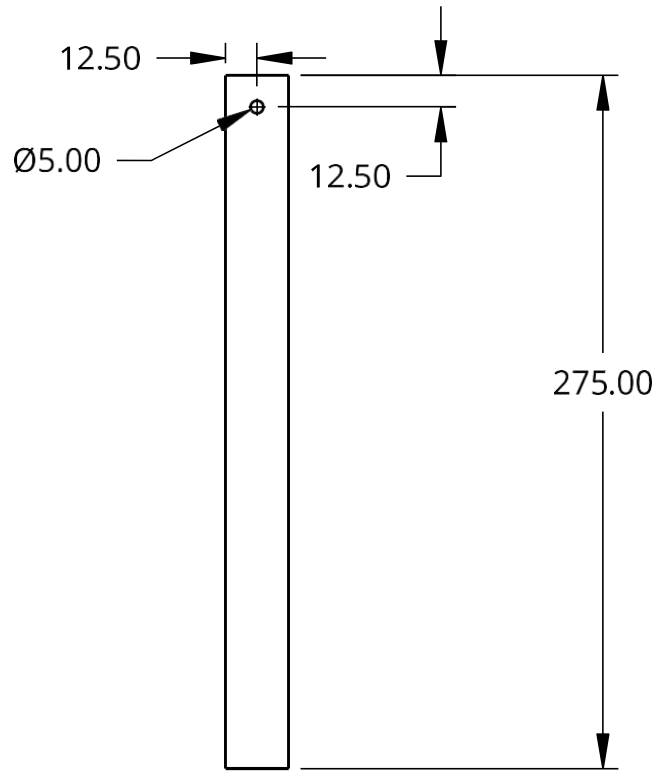
B

A



Auxiliary B - B

Auxiliary A - A

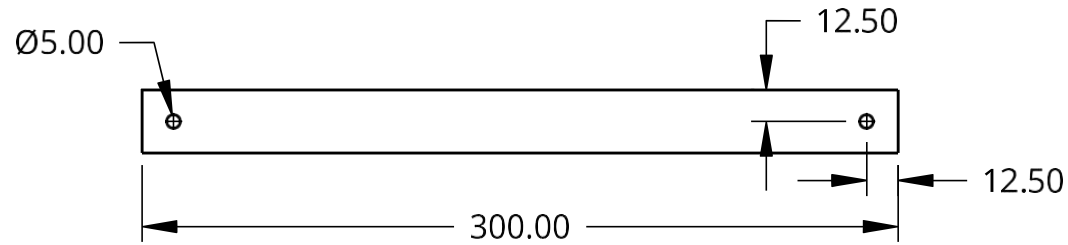
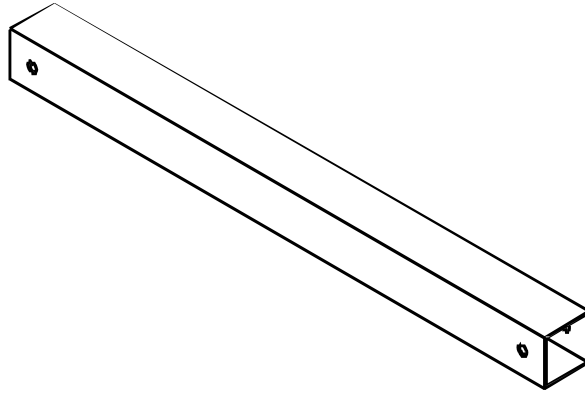


B

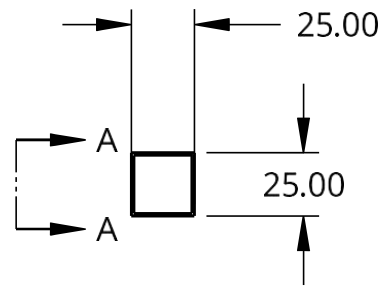
B

A

A



Auxiliary A - A



2

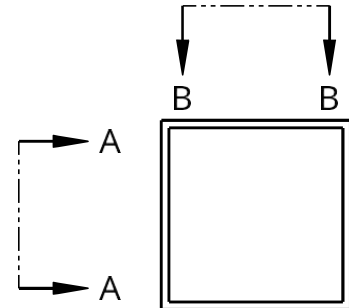
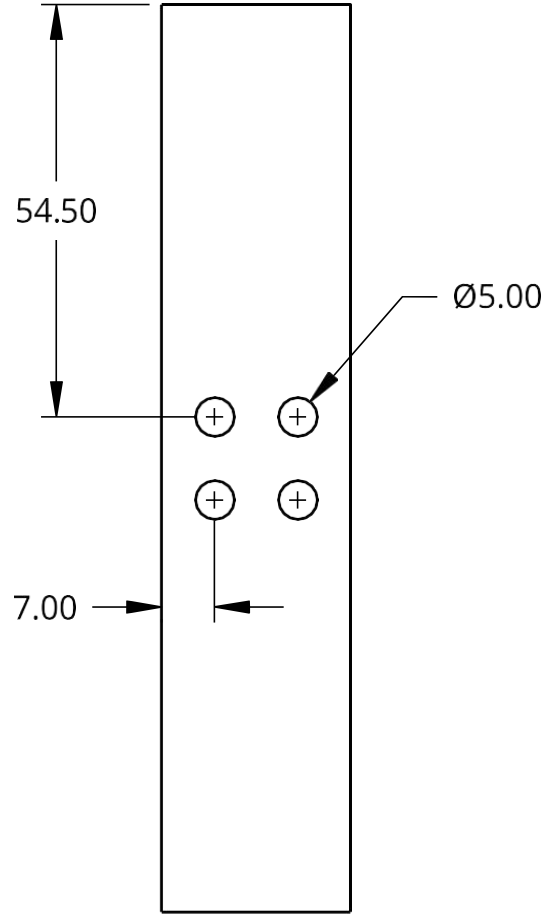
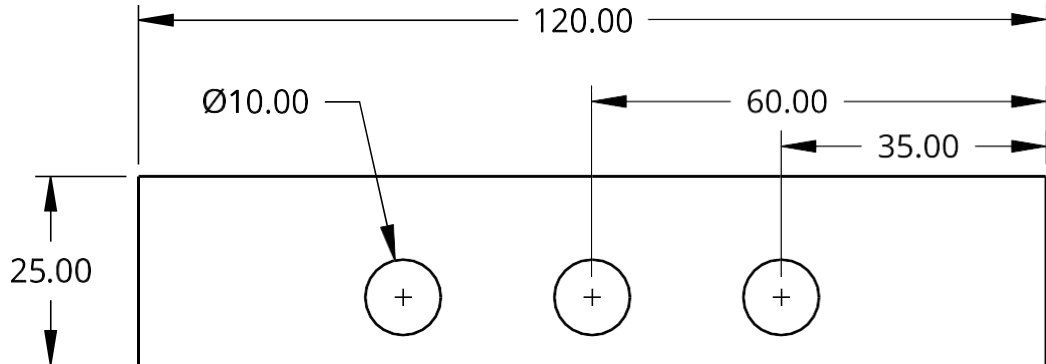
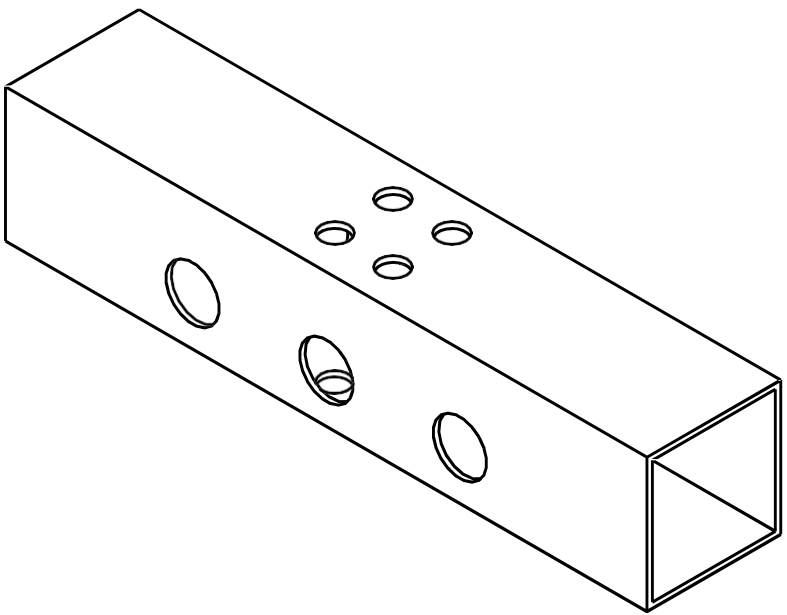
1

B

A

B

A



2

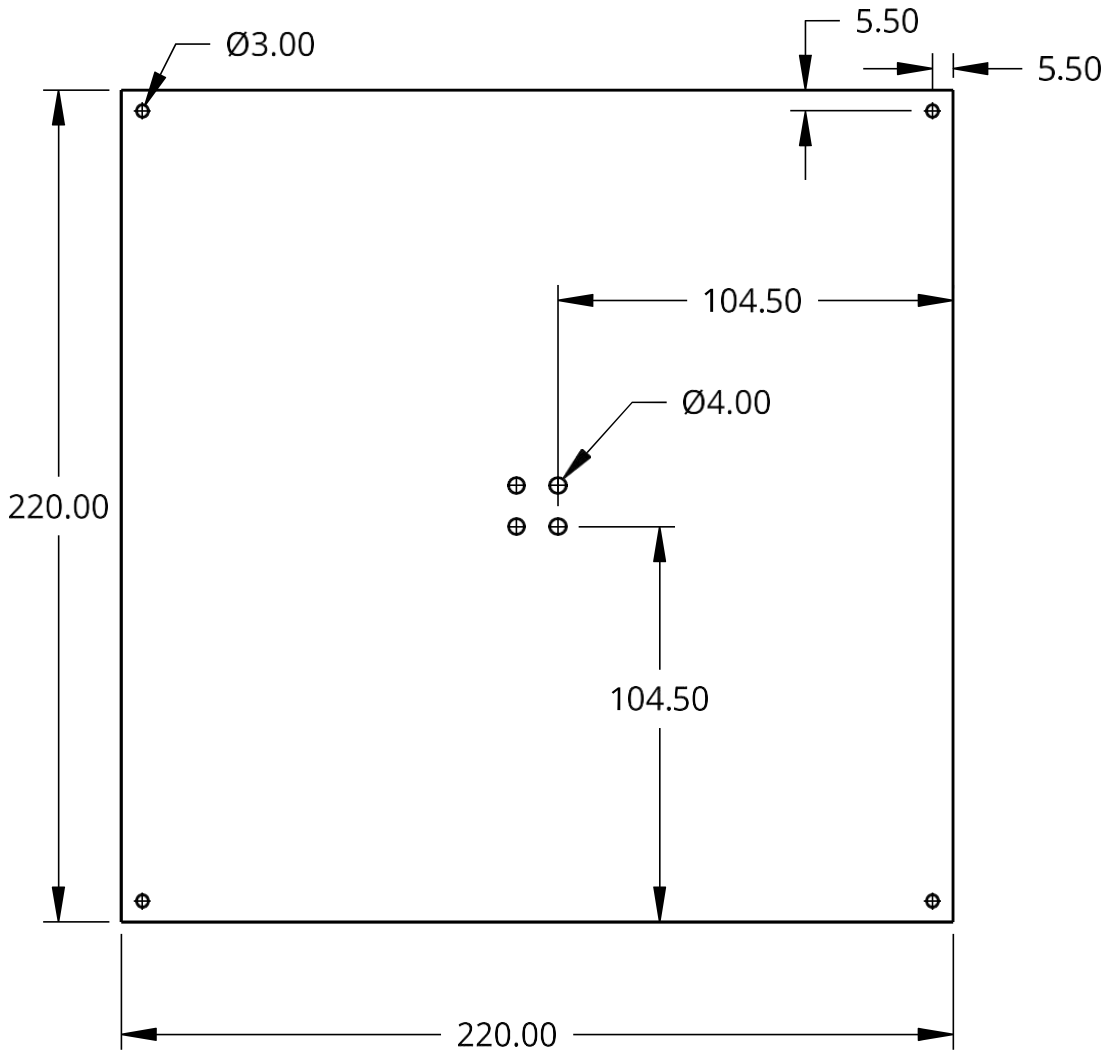
1

2

1

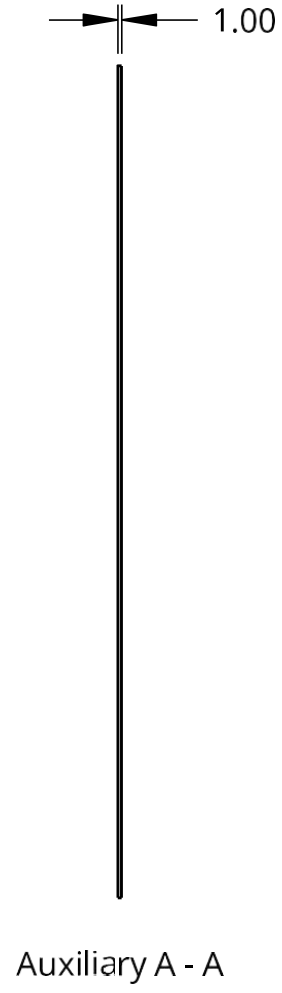
B

A



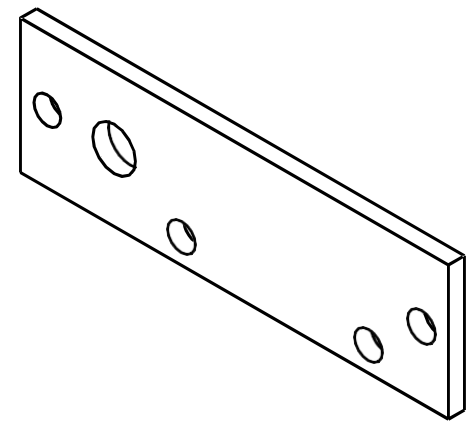
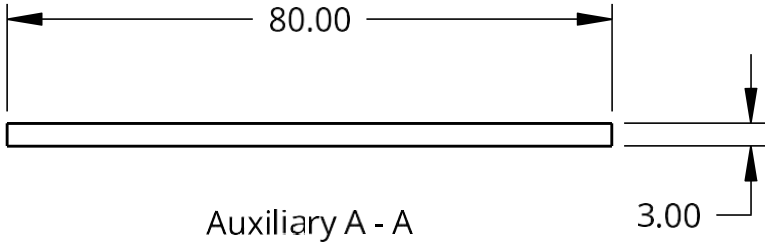
B

A



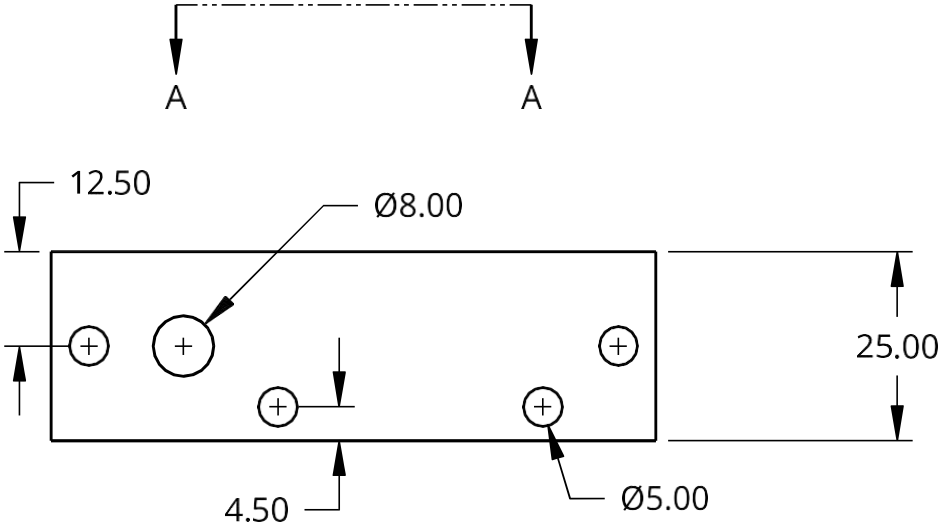
B

B



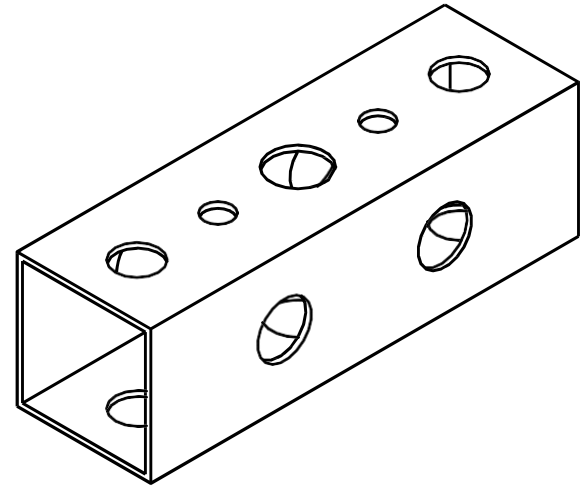
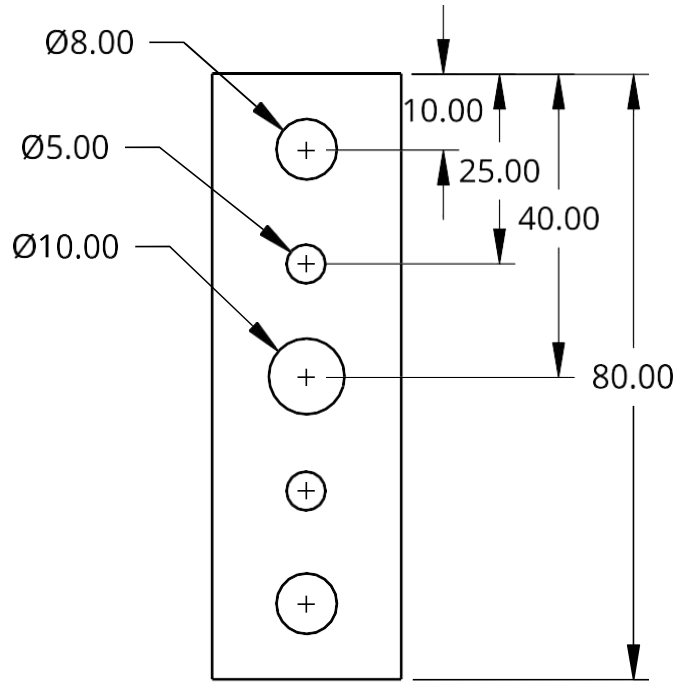
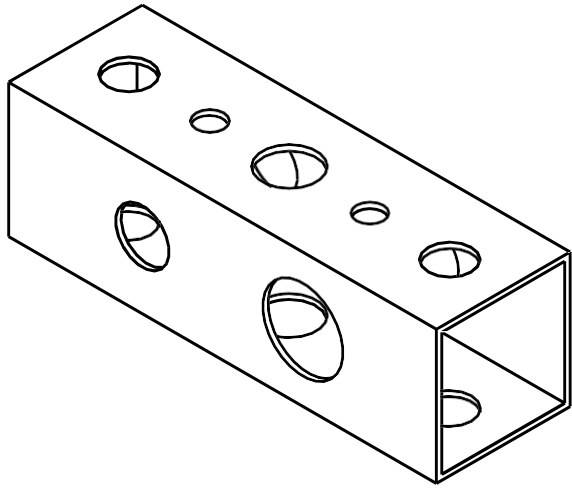
A

A

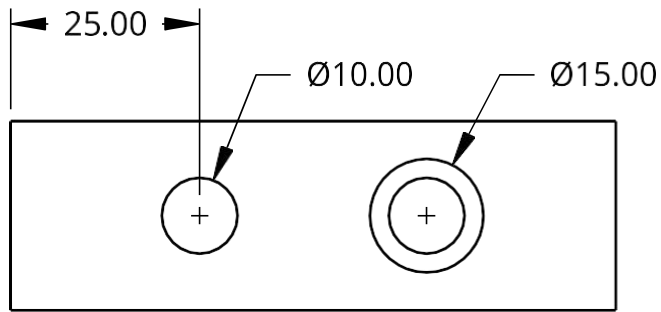


B

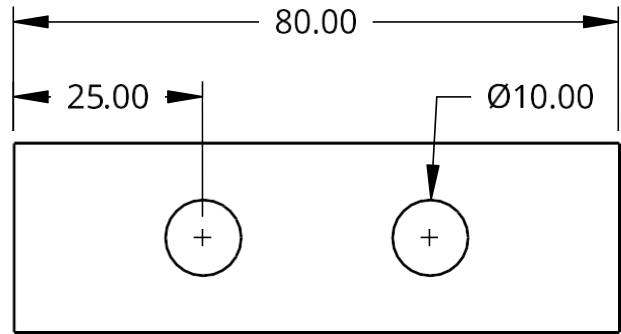
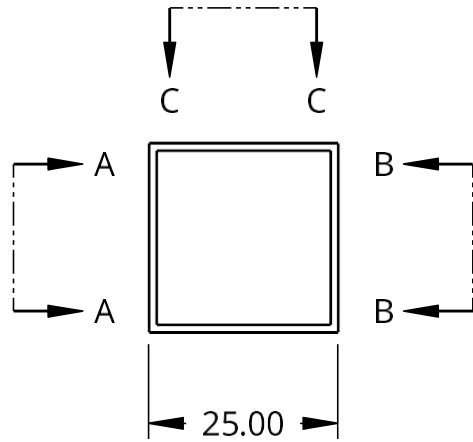
B



Auxiliary C - C



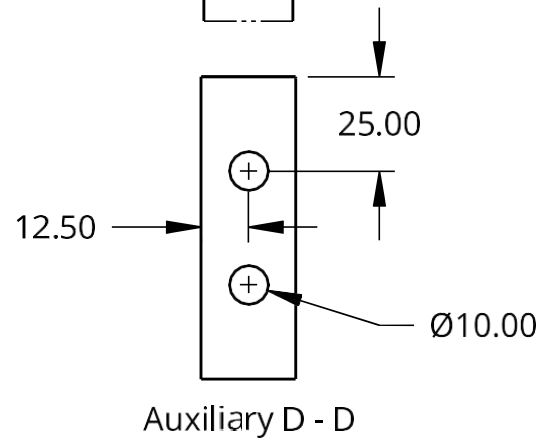
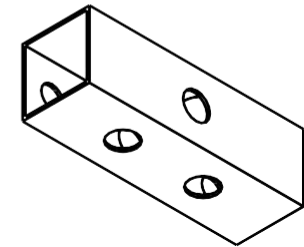
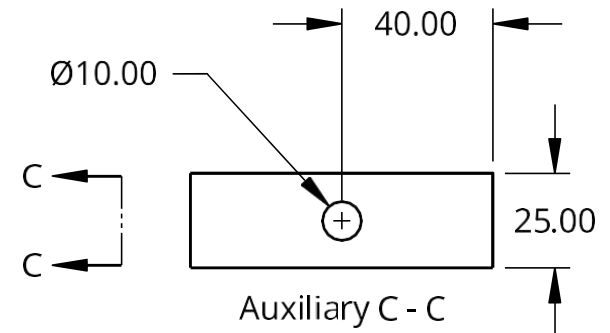
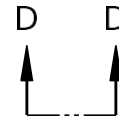
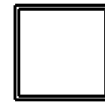
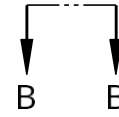
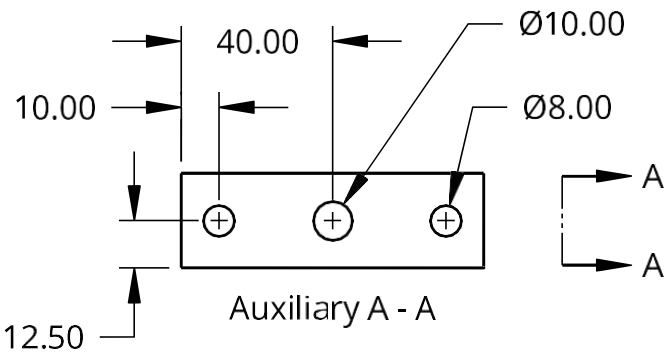
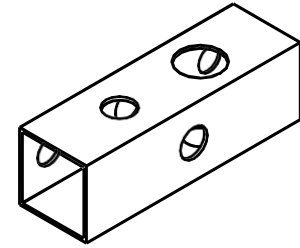
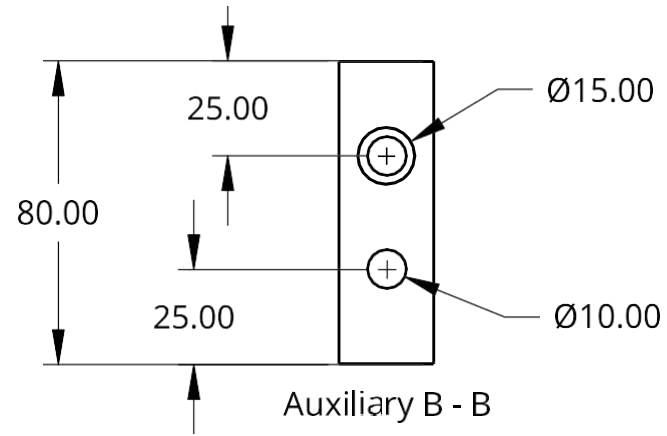
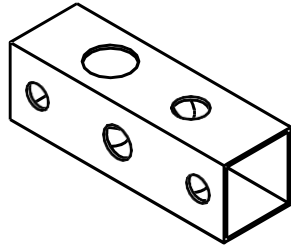
Auxiliary A - A



Auxiliary B - B

A

A

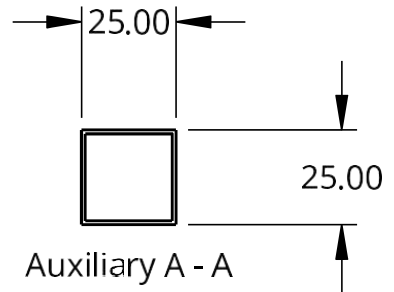
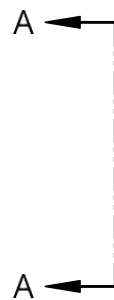
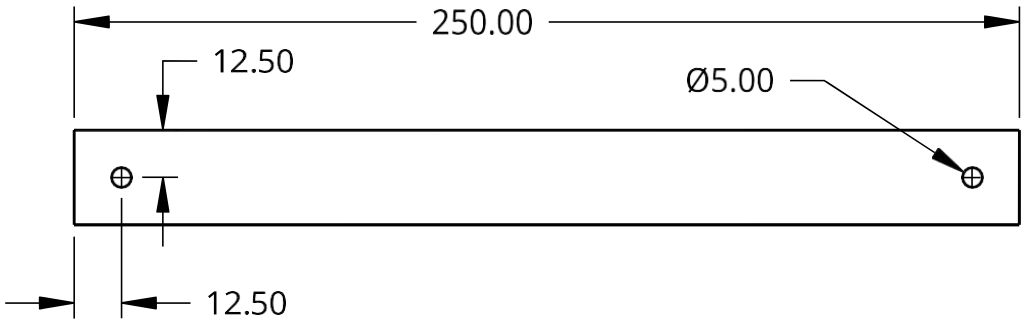


2

1

B

B



A

A

2

1

2

1

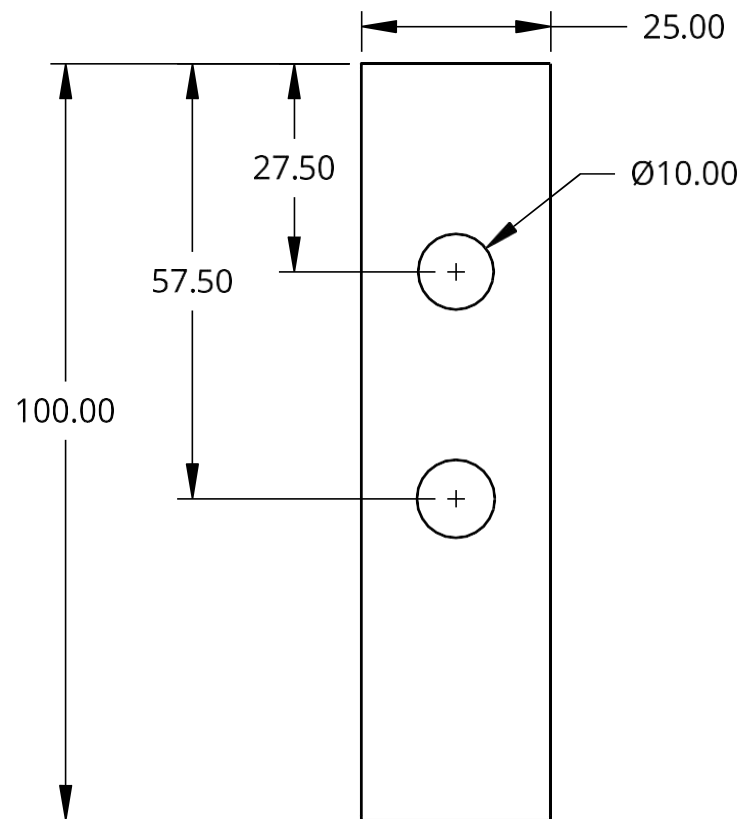
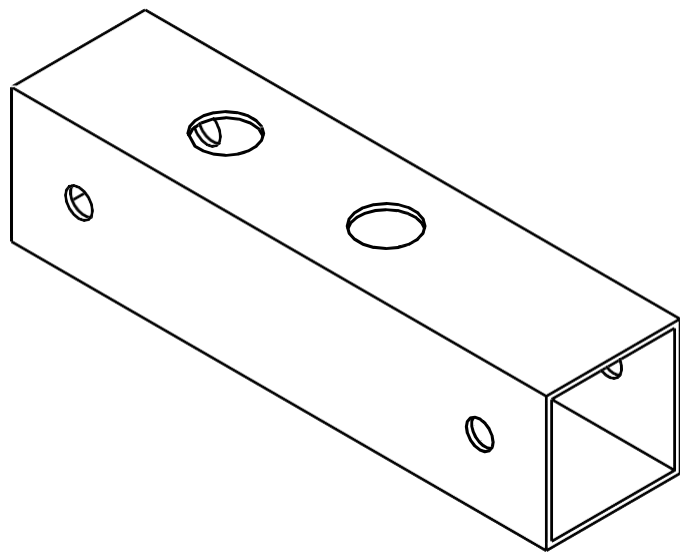
93

B

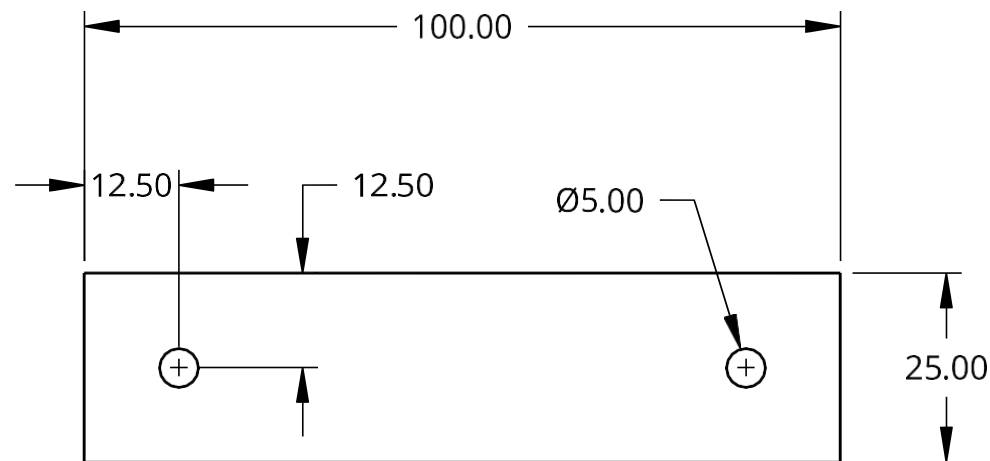
B

A

A



Auxiliary B - B



Auxiliary A - A

DWG NO.	PN031	SIZE	SCALE	1:1	SHEET	17 of 26	REV
---------	-------	------	-------	-----	-------	----------	-----

2

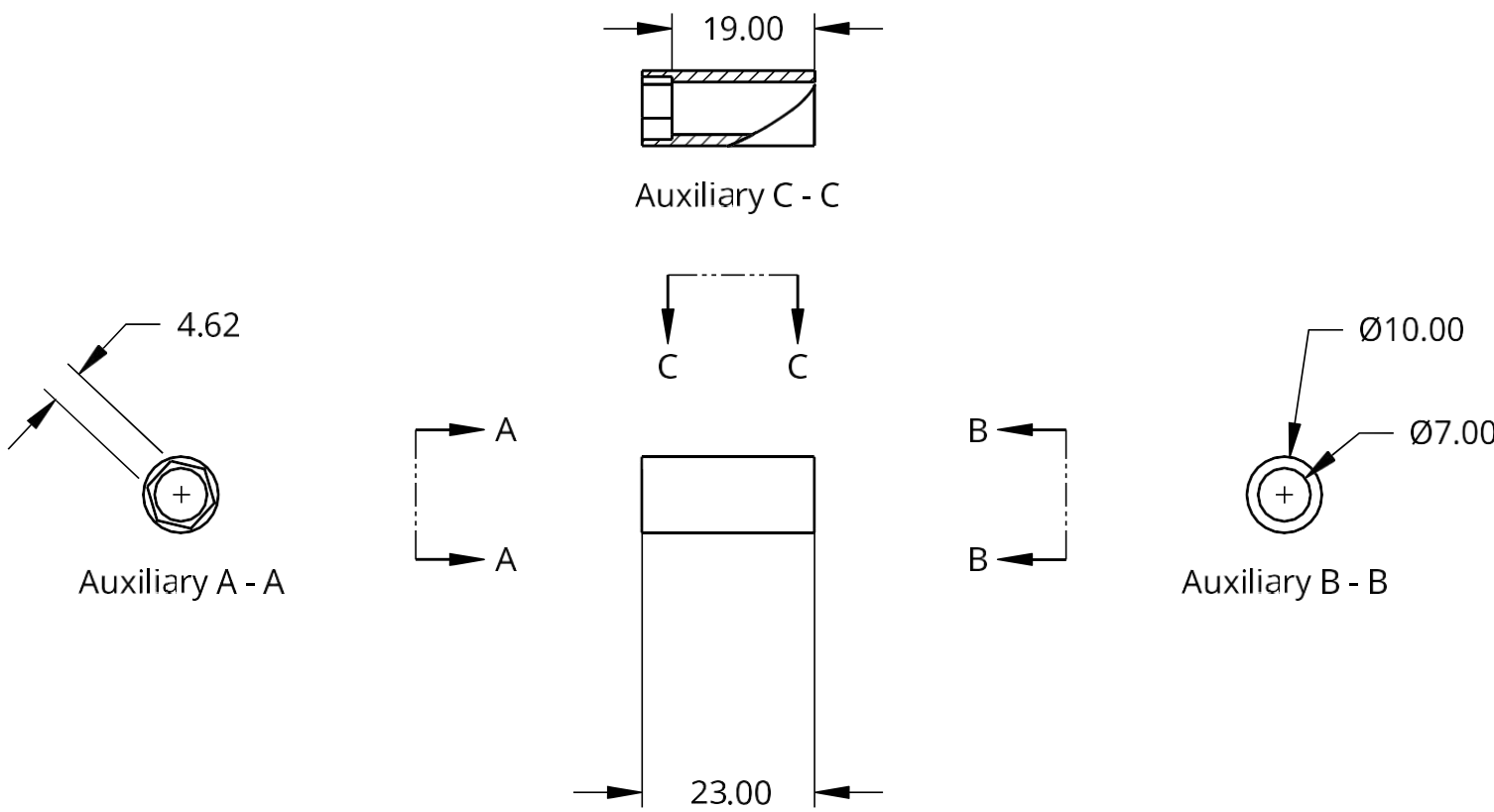
1

B

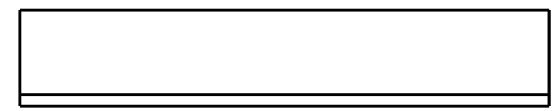
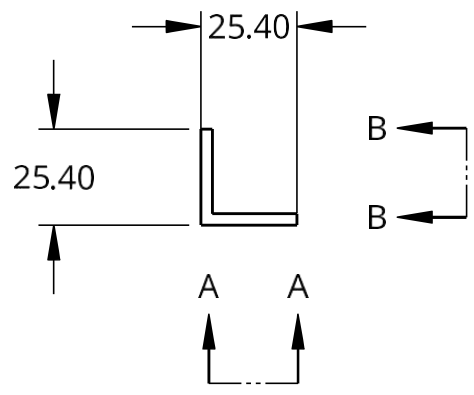
B

A

A

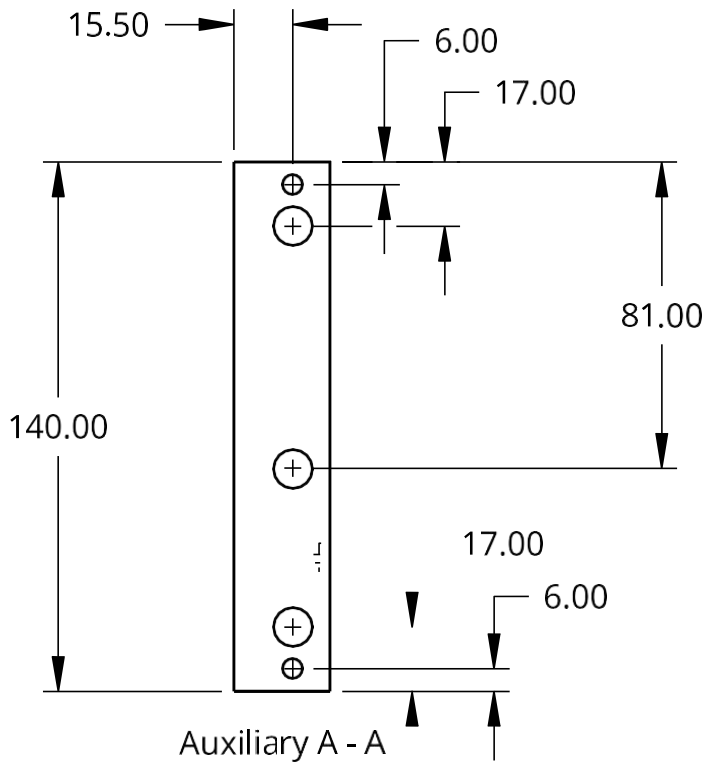


B

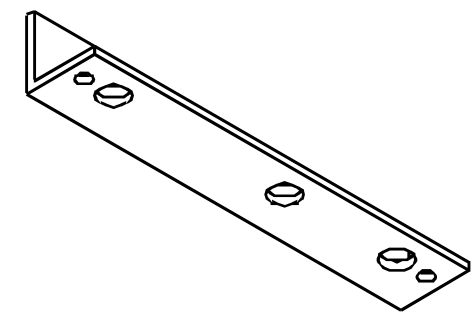


Auxiliary B - B

A



Auxiliary A - A



B

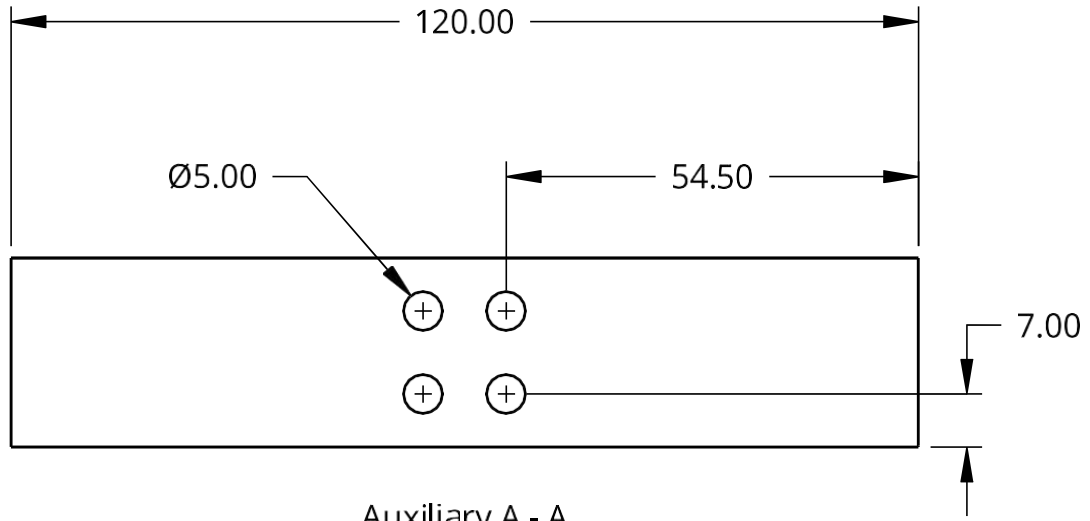
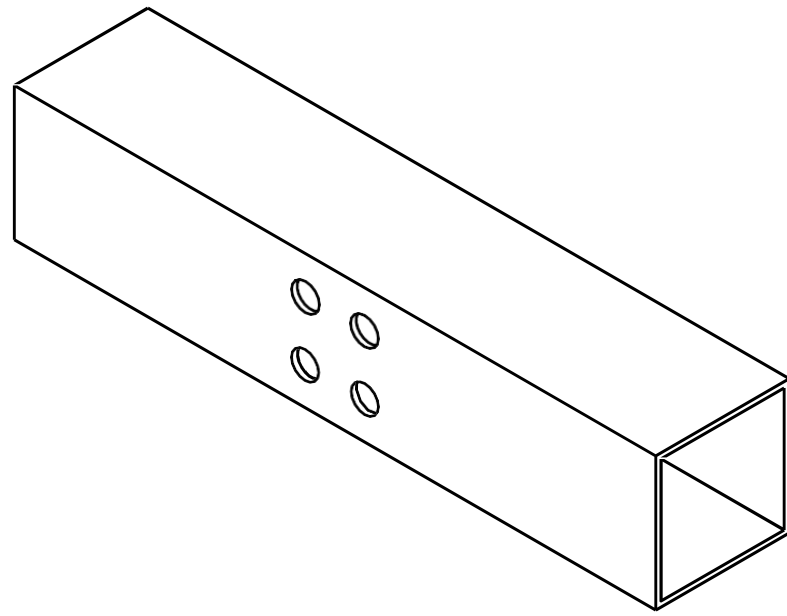
A

B

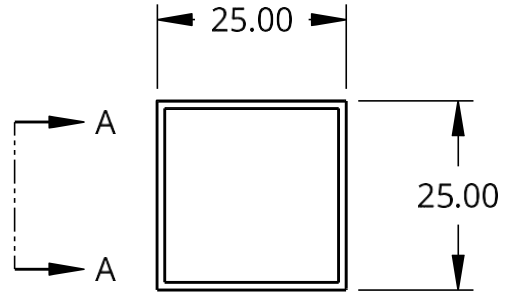
B

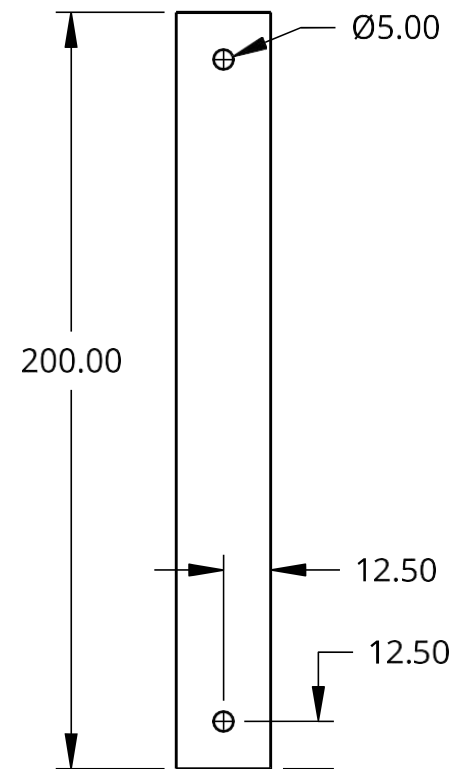
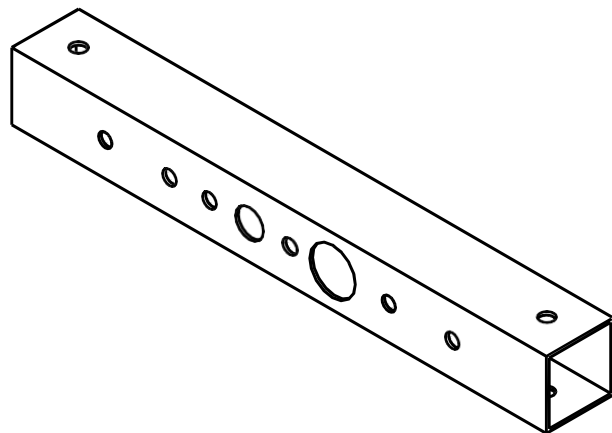
A

A

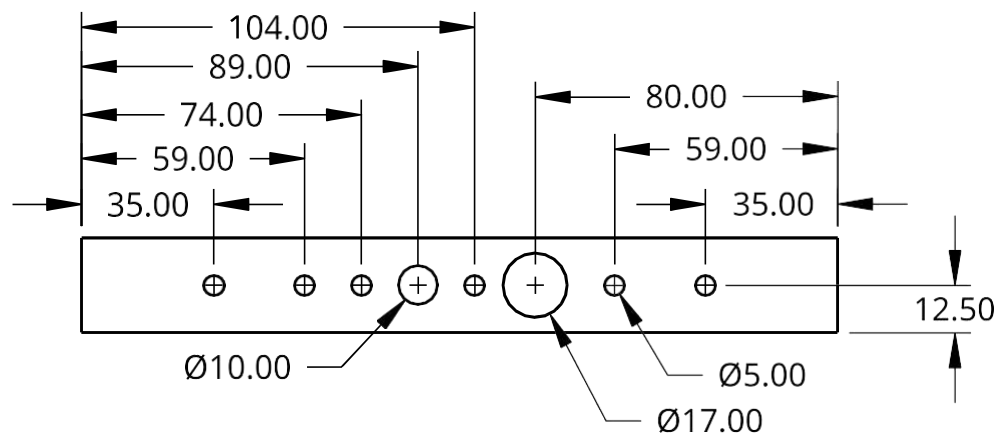
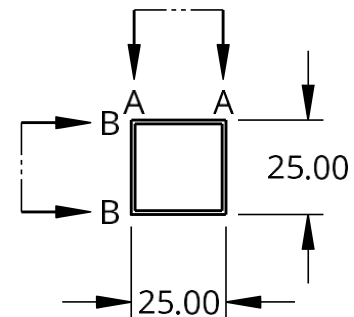


Auxiliary A - A





Auxiliary A - A



Auxiliary B - B

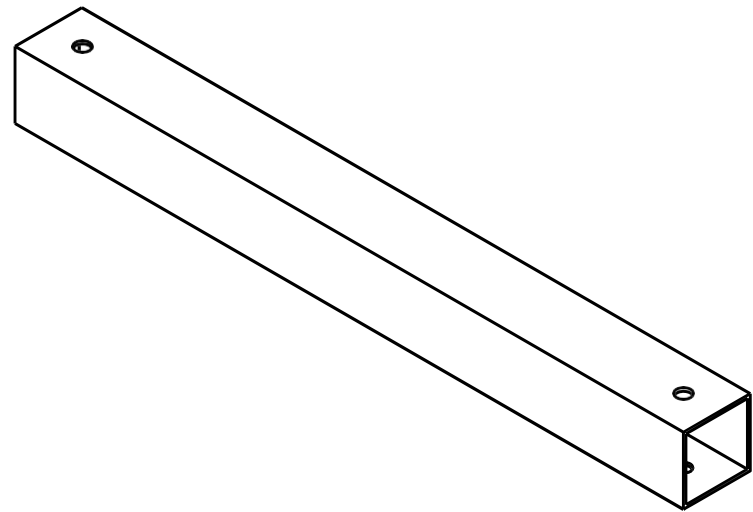
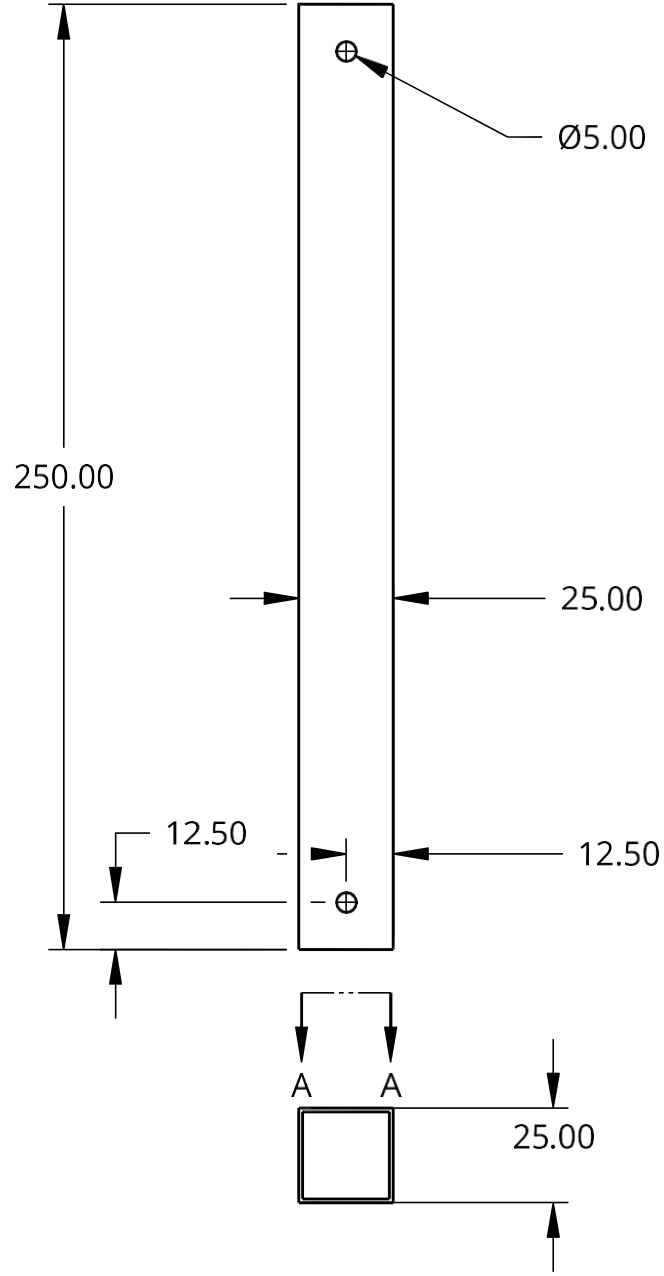
Auxiliary A - A

B

B

A

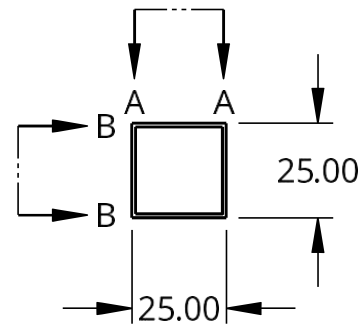
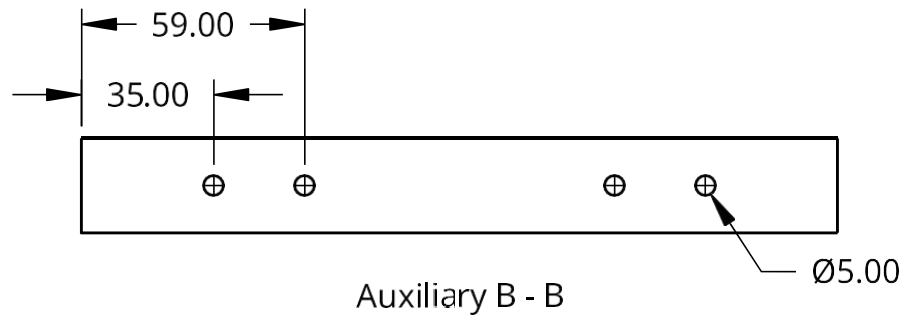
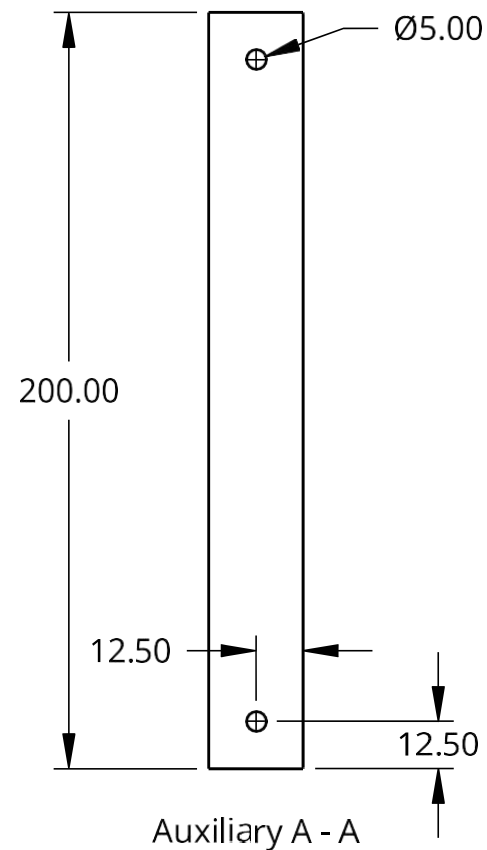
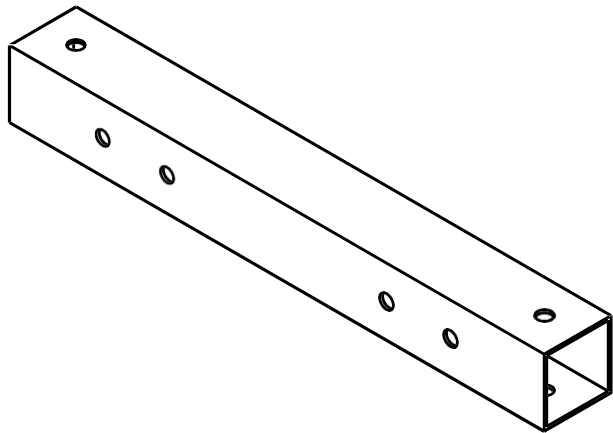
A



2

1

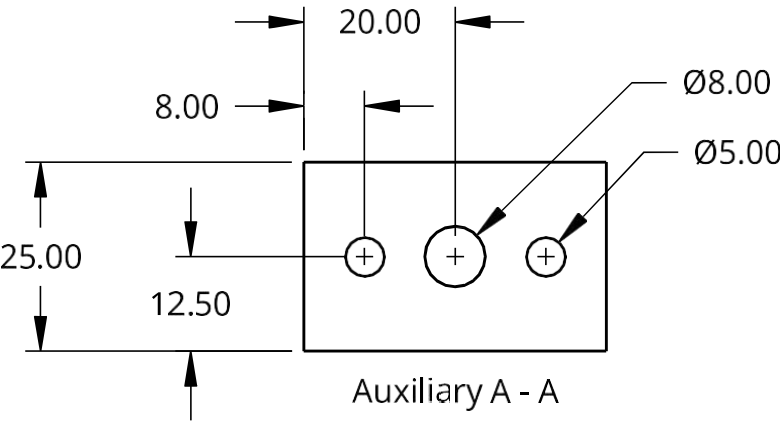
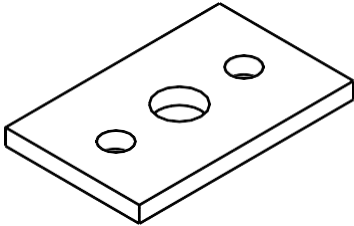
99



2

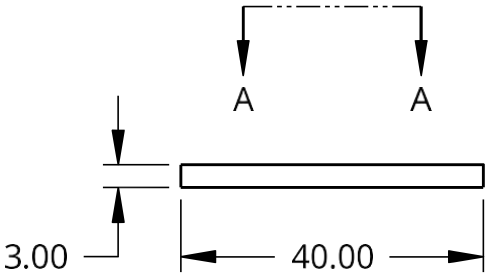
1

B

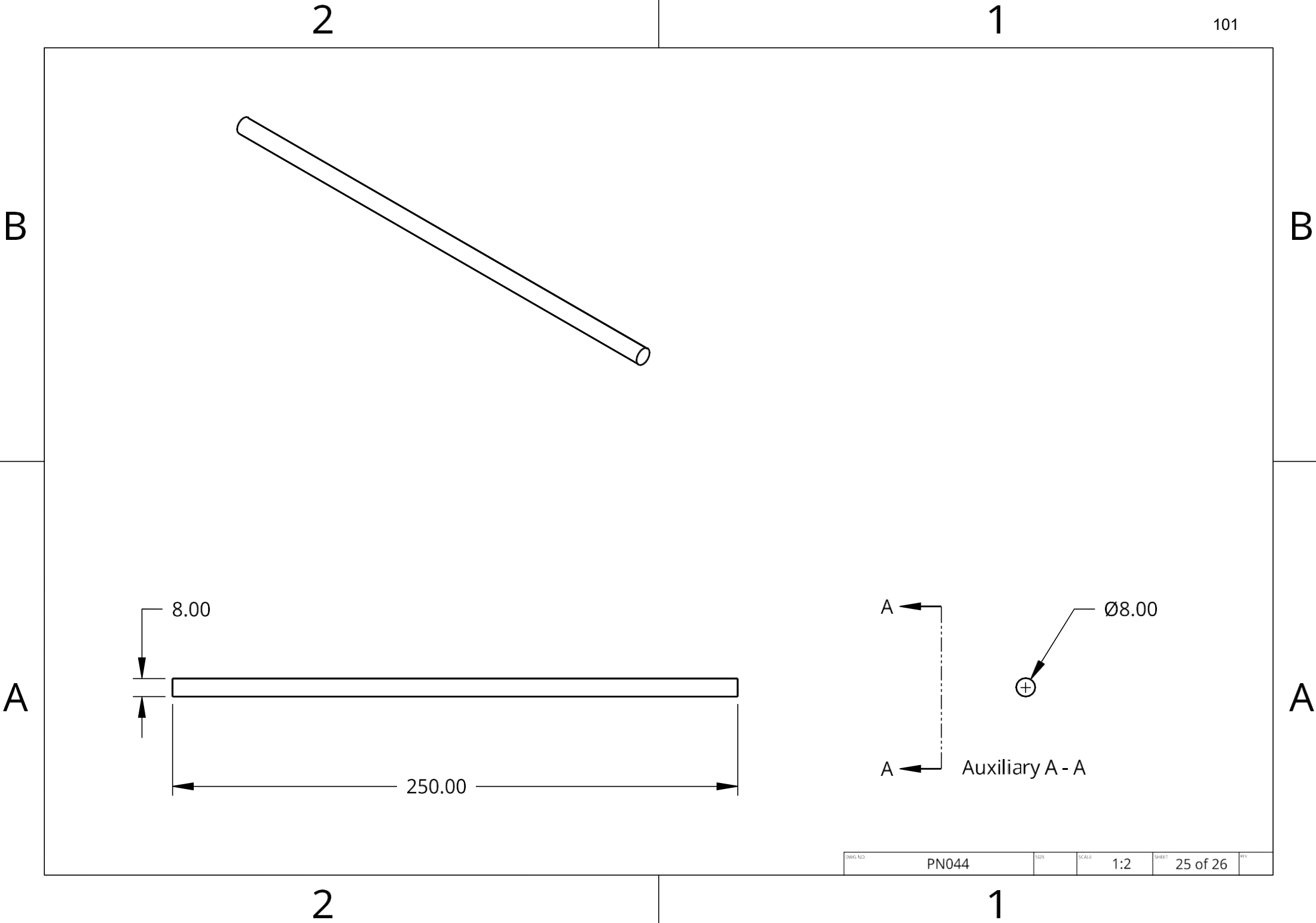


B

A

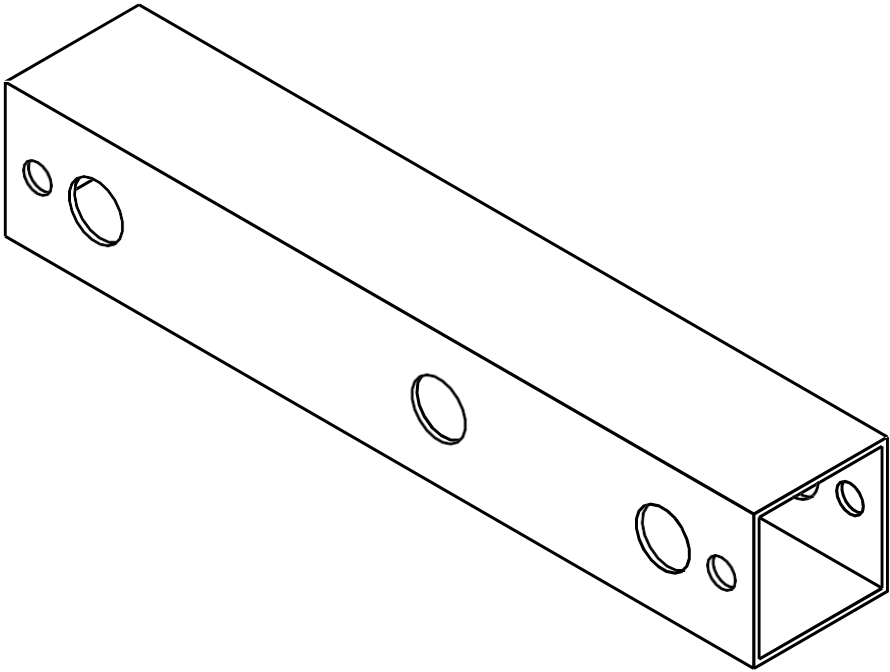


A



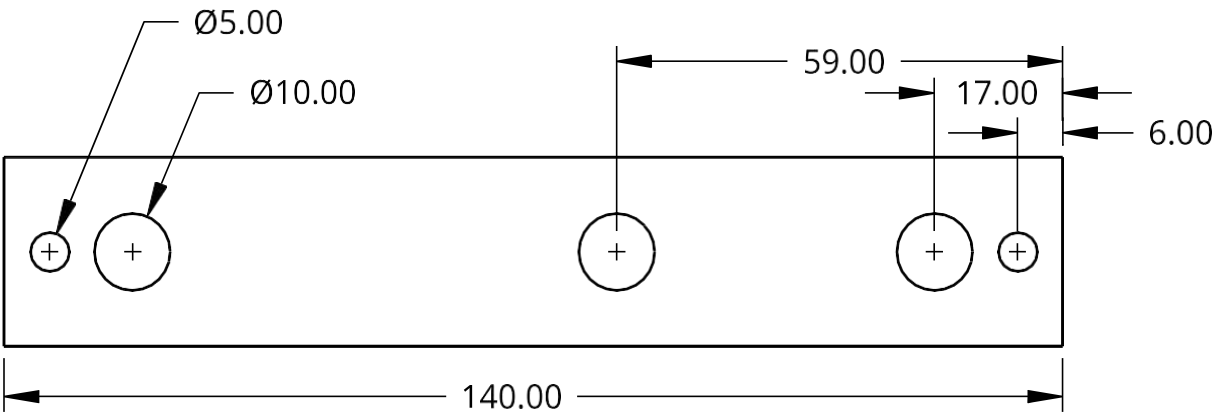
B

B

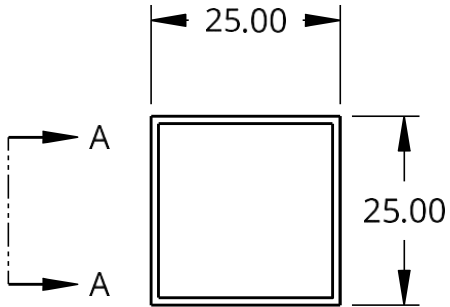


A

A



Auxiliary A - A



APÊNDICE B – ARTIGO PRODUZIDO DURANTE O PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO

Manuscript Number:	RBME-D-24-00039	
Full Title:	3D Printing of Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Scope Review	
Article Type:	Review	
Funding Information:	ITCBIO	Biomedical Engineer Lucas Henrique Veloso de Santana
	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Biomedical Engineer Lucas Henrique Veloso de Santana
Abstract:	Purpose Cartilage tissue damage can lead to pain, mobility problems and post-traumatic osteoarthritis. Limited healing capability of cartilage underscores the importance of developing functional cartilage replacement. This paper presents a literature review on the state of art technologies for printing alginate based scaffolds aiming cartilage tissue engineering. Methods A comprehensive literature search was carried out using search databases. Boolean operators were used combining the following keywords: 3D printing AND Alginate AND Scaffold. Search results were limited to articles published between 2022 and 2023 to ensure that technology and information are closely related to current practices. Results Studies reviewed showed prevalence of extrusion-based methodology for printing scaffolds. Despite wide variety of bioink formulations, calcium chloride was the dominant crosslink agent, either present alone or in combination with an auxiliary agent. It was noticed significant emphasis on morphological analyses of printed scaffolds. Half of the analyzed studies conducted some form of chemical characterization of raw materials or/and the produced bioink. There was also a predominant presence of in vitro assays of the produced scaffolds with positive outcomes, despite low occurrence of conducted in vivo essays. Conclusion This review highlights the potential of 3D printed alginate-based scaffolds in cartilage TE. Extrusion-based printing is predominant, other 3D printing methodologies presents opportunities for improvement. Investigation of CaCl₂ bath times offers valuable insights. In vitro essays with promising results underscore the efficacy of the printed scaffolds, despite a limited number of in vivo studies. The prevalence of extrusion-based and the support of significant results suggest a broad scope for innovation.	
Corresponding Author:	Lucas Henrique Veloso de Santana, bachelor Universidade Federal de Pernambuco BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		

Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Pernambuco
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Lucas Henrique Veloso de Santana, bachelor

Research on Biomedical Engineering
3D Printing of Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue
Engineering: A ScopeReview
 --Manuscript Draft--

<i>Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation</i> First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Lucas Henrique Veloso de Santana, bachelor
	Ricardo Yara
	Claudia Sampaio de Andrade Lima
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

3D Printing of Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Scope Review

Lucas Henrique
Veloso de Santana
Departamento de
Engenharia
Biomédica
Universidade
Federal de Pernambuco
Recife, Brasil
lucas.
veloso@ufpe.br

Claudia Sampaio de Andrade Lima
Departamento de Biofísica e
Radiobiologia Universidade Federal
de Pernambuco
Recife, Brazil
claudia.alima@ufpe.br

Ricardo
Yara
Departamento de
Engenharia
Biomédica
Universidade
Federal de
Pernambuco
Recife,
Brazil
ricardo.yara
@ufpe.
br

Purpose Cartilage tissue damage can lead to pain, mobility problems and post-traumatic osteoarthritis. Limited healing capability of cartilage underscores the importance of developing functional cartilage replacement. This paper presents a literature review on the state of art technologies for printing alginate based scaffolds aiming cartilage tissue engineering.

Methods A comprehensive literature search was carried out using search databases. Boolean operators were used combining the following keywords: 3D printing AND Alginate AND Scaffold. Search results were limited to articles published between 2022 and 2023 to ensure that technology and information are closely related to current practices.

Results Studies reviewed showed prevalence of extrusion-based methodology for printing scaffolds. Despite wide variety of bioink formulations, calcium chloride was the dominant crosslink agent, either present alone or in combination with an auxiliary agent. It was noticed significant emphasis on morphological analyses of printed scaffolds. Half of the analyzed studies conducted some form of chemical characterization of raw materials or/and the produced bioink. There was also a predominant presence of *in vitro* assays of the produced scaffolds with positive outcomes, despite low occurrence of conducted *in vivo* essays.

Conclusion This review highlights the potential of 3D printed alginate-based scaffolds in cartilage TE. Extrusion-based printing is predominant, other 3D printing methodologies presents opportunities for improvement. Investigation of CaCl_2 bath times offers valuable insights. *In vitro* essays with promising results underscore the efficacy of the printed scaffolds, despite a limited number of *in vivo* studies. The prevalence of extrusion-based and the support of significant results suggest a broad scope for innovation.

Keywords Cartilage - Tissue Engineering - 3D Printing - Alginate

Introduction

Cartilage tissue consists of an elaborate network of giant molecules the cells deposit around themselves, forming an extracellular matrix. This matrix includes large proteins and great volumes of water. Alongside the bone structure, cartilage plays a fundamental role in supporting the body (Caplan 1984). Injuries to this tissue can lead to pain, mobility problems and, in some cases, post-traumatic osteoarthritis, causing long-term consequences. Once damaged, cartilage tissue has limited healing capability (Stoddart, Della Bella and Armiento 2022).

Tissue Engineering (TE) is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences aiming to restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ. By integrating knowledge and technologies from different fields such as biology, chemistry, engineering, medicine, pharmaceutical and materials science, TE is dedicated to the development of biological substitutes or tissue reconstruction (De Boer et al. 2023; Lanza et al. 2020).

Development and manufacturing of scaffolds are important focal points in TE. A scaffold is a tridimensional porous structure designed to provide a substrate for cells to adhere and proliferate, while also offering structural stability in regenerative processes (Stratton 2016). Biomaterials capable of interacting with living systems are essential tools

for developing scaffolds. The criteria for material selection in biomedical applications are based on material chemistry, molecular weight, solubility, shape and structure, hydrophilicity/hydrophobicity, water absorption, and erosion mechanism (Dhandayuthapani et al. 2011; De Boer et al. 2023). The chosen material must also possess mechanical strength to support its form and structure, as well as create the necessary conditions for cell proliferation within its framework (Langer and Tirrell 2004).

Among the biomaterials used for creating scaffolds in TE, alginate is a natural polymer capable of producing hydrogels in the presence of divalent cations. It is a biocompatible material widely employed in biomedical applications, such as drug delivery systems (Parenteau-Bareil, Gauvin and Berthod 2010). Alginate is considered a very useful biomaterial due to its favorable properties, including biocompatibility and ease of gelation. It has been used to construct various structures for TE applications, particularly for bone, cartilage, muscle, and vascular applications. The main advantage of alginate is its rapid ionic gelation which occurs at mild pH and temperature conditions (Rehm and Moradali 2018).

Three-dimensional (3D) printing is a suitable technique for producing forms using bioinks with precision and accuracy. Its advantages include flexibility, customization, scalability, reliability, durability and high speed for producing prototypes. 3D printing is experiencing

2

widespread adoption in TE due to its capabilities, opening up a range of possibilities for the field (Babbar et al. 2022).

Methods

A systematic review of the literature was conducted following the guidelines outlined in recommendations protocol (Galvão et al. 2015). A comprehensive literature search was carried out using the Science Direct, PubMed and Biblioteca Virtual em Saúde databases. Boolean operators were employed in the database searches, using combinations of the following keywords: (3D printing) AND (Alginate) AND (Scaffold). Search results were limited to articles published between 2022 and 2023 to ensure that the technology and information are closely related to current practices. The title and abstract of each article were assessed to determine their relevance to the review's purpose. The search was restricted to full articles published in the field of bioengineering that deal with 3D printing of alginate based scaffolds for cartilage TE. The full text of the selected articles were reviewed, and their data were manually extracted into a spreadsheet for analysis. The following study characteristics were extracted: authors' names, printing methodology applied, bioink composition, crosslinking agent employed, conducting of *in vitro* and *in vivo* essays, performing of morphological and chemical characterization, and printability tests.

Results

The literature search yielded a total of 291 articles. The number of articles found in each database can be found in

Table 1. Of these, 79 articles were excluded due to the presence of duplicates, 198 articles were excluded for not meeting the adopted eligibility criteria, resulting in a total of 14 articles included for review (Table 1). Figure 1 shows the flowchart of the article identification and selection process during database search. For the articles reviewed it was found that a 100% of them used the Extrusion-Based printing technique, where the bioink is forced to pass through a printing nozzle. The printer then deposits the material onto a platform, according to the projected 3D model (Gebhardt and Jan-Steffen 2016). Nevertheless, two works employed subtly different approaches for printing the scaffolds. Yin et al. (2023) instead of depositing the extruded bioink onto a traditional printing platform, used a carbopol support bath as their printing substrate. The incorporation of a hydrogel as mentioned, aims to enhance print fidelity. The carbopol serves as the printing support, helping the bioink maintain its format until the definitive crosslinking process. On the other hand Kilian et al. (2022) used a special type of printing nozzle, a coaxial nozzle. It consists of two concentric tubes aligned inside each other, enabling the extrusion of two materials with different compositions simultaneously. With regard to the bioinks used, a wide variety of compositions were observed. In the reviewed studies, there was no instance where two studies employed the same composition. However, the combination of alginate with

gelatin was noticed in two articles (Maihemuti et al. 2023; Chen et al. 2023), as well as the combination of alginate and gelatin methacrylate (gelMA) (Wang et al. 2022; Yin et al. 2023). GelMa consists of a photocrosslinkable gelatin derivative obtained by modifying gelatin with methacrylic anhydride (MA) (Van Den Bulcke et al. 2000). When exposed to ultraviolet (UV) light the methacrylamide and methacrylate side groups on the GelMA chains forms hydrogel networks (Xiao et al. 2019).

Table 1 Database research results

Database	Numb artic
ScienceDirect	69
PubMed	83
Biblioteca Virtual em Saúde	13
Total	29

Despite the diversity in bioink formulations, 10 out of the 14 studies (71.4%) exclusively utilized calcium chloride (CaCl_2) for crosslinking the printed scaffold. Nevertheless, the crosslinking methodology varied amongst these 10 studies. Typically, the crosslinking process was conducted through a post-printing CaCl_2 bath, although bath times varied widely, ranging from 5 minutes to 12 hours. When introduced to alginate, the calcium cations cause the crosslinking of the biomaterial; however, this process can be challenging to fine-tune (Rehm and Moradali 2018). Other crosslinking agents can be used to refine the tuning process. Wang et al. (2022) and Yin et al. (2023) applied ultraviolet (UV) photocrosslinking in addition to CaCl_2 , given the presence of gelMA in their bioink. Kopecká et al. (2023) made a CaCl_2 bath pre-printing and used an iron (III) chloride (FeCl_3) bath post-printing. Maihemuti et al. (2023) applied a bath of CaCl_2 and carbodiimide hydrochloride-N-hydroxysuccinimide (EDC-NHS) for crosslinking the printed structure.

It is noteworthy that CaCl_2 was present in all studies. The extracted data can be found in table 2.

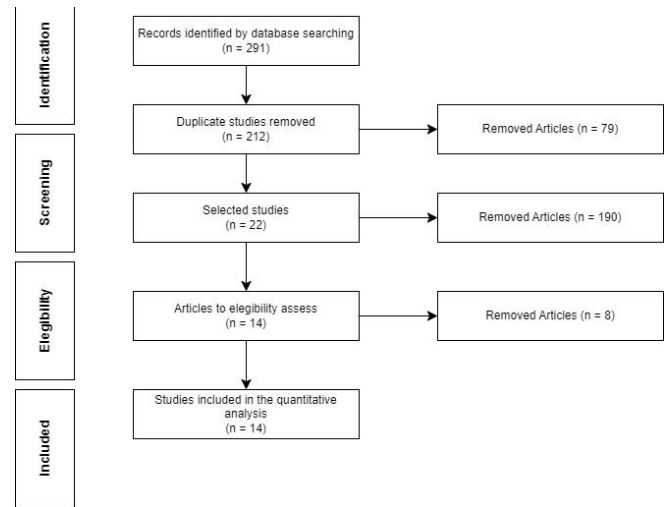


Fig. 1 Article identification and selection process flowchart.

Table 2 Reviewed article's printing technology, bioink formulation and crosslinking agent.

Authors	Year of publication	Printing methodology	Bioink	Crosslinking agent
Wang et al.	2022	Extrusion-based printing	Oxidized and methacrylated alginate (OMA) and GelMA, reinforced by PLLA short fibers	CaCl ₂ and UV photo-crosslinking
Zineh et al.	2022	Extrusion-based printing	Alginate, thymoquinone and nolloysite nanotube	CaCl ₂
Maihemuti et al.	2023	Extrusion-based printing	Alginate and fish skin alginate	CaCl ₂ and EDC-NHS
Yin et al.	2023	Extrusion-based printing on Carbopol Support	Alginate and gelMA	CaCl ₂ and UV photo-crosslinking
Olmos-Juste et al.	2023	Extrusion-based printing	Alginate (dispersed in chondrocyte expansion medium) + Waterborne polyurethane dispersion	CaCl ₂
Decarli et al.	2023	Extrusion-based printing	Alginate, Xanthan Gum and Human mesenchymal stromal cell (hMSC) spheroids	CaCl ₂
Lafuente-Merchan et al.	2023	Extrusion-based printing	Nanocellulose-alginate and chondroitin sulfate Nanocellulose-alginate and dermatan sulfate	CaCl ₂
Kilian et al.	2023	Extrusion-based printing	Alginate, methylcellulose and nanoclay Laponite.	CaCl ₂
Wei et al.	2022	Extrusion-based printing	Alginate and polyvinyl alcohol	CaCl ₂
Ma et al.	2023	Extrusion-based printing	Alginate and calcium silicate nanowires	CaCl ₂
Shanto et al.	2023	Extrusion-based printing	Tempo-oxidized cellulose nanofiber, decellularized extracellular matrix and sodium alginate	CaCl ₂
Chen et al.	2023	Extrusion-based printing	Alginate, gelatin and hydroxyapatite	CaCl ₂
Kopecká et al.	2023	Extrusion-based printing	Alginate, calcium phenylphosphonate, calcium phenylphosphonate-phosphate and nanoapatite particles	CaCl ₂ and FeCl ₃
Sathish et al.	2022	Extrusion-based printing	Gelatin, carboxymethyl cellulose and alginate	CaCl ₂

Regarding of in vitro experimentation, 92.8% of the reviewed articles performed this type of assay. Wang et al. (2022), Decarli et al. (2023), Lafuente-Merchan et al. (2023), Kilian et al. (2022), Ma et al. (2023) and Shanto et al (2023) achieved not only cellular colonization but also cellular differentiation in their experiments, suggesting that their bioinks may contribute to cell growth and assist in

tissue regeneration. Zineh et al. (2022), Yin et al. (2023), Chen et al. (2023), Kopecká et al. (2023) and Sathish et al (2022) found promising results in their essays. Concerning the conducting of *in vivo* essays, 28.6% of the reviewed articles performed this type of essay. Maihemuti et al. (2023) carried out immunogenicity and degradation, histological and immunohistochemical essays on the knee cartilage of mice. Although the alginate scaffolds are promising in cartilage defect repair, the repairing effect on rat knee cartilage defects was limited in

61
62
63
64
65

experiments conducted by the authors. However, when combined with fish gelatin, the printed scaffolds promoted almost completely tissue reppair, producing smooth surface cartilage.

Yin et al. (2023) and Shanto et al. (2023) conducted experiments in the subcutaneous tissue of rats. Yin et al. (2023) found that the combination of alginate and gelMA for producing scaffolds is cappable of generating tissue regeneration and cellular differentiation when compared to alginate and gelMA scaffolds. The alginate-gelMA scaffolds also mixed with the surrounding cartilage matrix, presenting good biocompatibility and biomechanical properties. Unlike alginate or gelMa scaffolds, the implanted alginate-gelMA scaffold showed almost no degradation. The authors claim that such characterisc is result of the combined crosslinking methodology.

4
52
53
On the other hand, Shanto et al.
54
(2023) used scaffolds with varying
55
concentrations of tempo-oxidized
56
cellulose nanofiber (TOCN) and
57
decellularized extracellular matrix
58
(dECM). The authors observed that a
59
higher concentration
60
of dECM corresponded to increased
61
chondrogenesis and
62
63
64
65

1
2
3
4
5
Table 3 Reviewed articles *in vitro*
and *in vivo* assays.

Authors	Cell culture	Performed essays	Animal/Tissue	Performed essays
Wang et al.	hBMSC	-Cell viability -Histology and immunohistochemistry analysis	—	—
Zineh et al.	Chondrocyte cells	-Cytotoxicity -Cell viability	—	—
Maihemuti et al.	-C28 -Mice chondrocytes	-Cell proliferation -Release of proteins -RNA extraction	-Mice knee cartilage	-Immunogenicity -Degradation -Histological -Immunohistochemical
Yin et al.	-Chondrocytes cells	-Cell proliferation -Release of proteins	-Subcutaneous tissue of SD rats	-Histological -Immunohistochemical
Olmos-Juste et al.	-Murine teratocarcinoma derived chondrogenic cell line (ATDC5)	-Lactate dehydrogenase release -DNA quantification -Histological analysis -Glycosaminoglycan quantification	—	—
Decarli et al.	-hMSC	-Cell viability -Cell differentiation	—	—
Lafuente - Merchan et al.	-Df-MSCs-EPO	-Cytotoxicity -Cell viability -Cell differentiation -Histological Staining and Collagen Production	—	—
Kilian et al.	-hTERT-MSC -hCHON -hOB	-Release of proteins and biochemical factors -Cell viability -Cytotoxicity -Gene expression analysis	—	—
Wei et al.	--	--	—	—
Ma et al.	-rBMSC -rTDSC	-Cell differentiation -Cell viability	-Rabbit Aquiles tendon	-Histological
Shanto et al.	-rBSCMC	-Cell viability -Cytotoxicity -Cell proliferation	-Subcutaneous tissue of SD rats	-Histological
Chen et al.	-ATDC5 cells	-Cell viability	—	—
Kopecká et al.	-3T3 fibroblasts -Mouse fibroblast	-Cytotoxicity	—	—
		-Cellular proliferation		

cartilage formation. Although a higher amount of dECM could improve these characteristics, its effects decrease gradually over time. A higher concentration of dCEM also corresponded to low printability, high degradation and insufficient mechanical strength.

51
52
53 Ma et al. (2023) performed
54 experiments in the Achillestendon of
55 rabbits. The authors' approach
56 provided efficient microenvironment
57 to the rabbit tendon stem cells
58 (TDSCs)
1 and rabbit bone mesenchymal stem cells
2 (rBMSCs) for
3 inducing ordered alignment and
4 differentiation, and further
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

Table 4 Reviewed articles' morphological and chemical analysis.

Authors	Morphology analysis essays performed	Chemical characterization essays performed	Printability
Wang et al.	SEM	HNMR	Evaluated by comparison between the fabricated and designed grid structure.
Zineh et al.	SEM	EDS	--
Maihemuti et al.	-Stereomicroscopy -SEM	--	The printing results were recorded according to the criteria of printable or nonprintable, stable or unstable.
Yin et al.	-Stereomicroscope confocal fluorescence microscopy -SEM	-HNMR -FT-IR	--
Omotosho et al.	SEM	--	--
Decarli et al.	-Optical microscopy -Confocal microscopy	--	Evaluated by comparison between the fabricated and designed grid structure.
Lafuente-Merchan et al.	-Optical profilometry -SEM	--	Evaluated by surface and architectural analysis of the printed grid structures aided by topology imaging.
Kilian et al.	PS-OCT	--	Evaluated by comparison between the fabricated and designed grid structure.
Wei et al.	SEM	FTIR	Evaluated by comparison between the fabricated and designed grid structure.
Ma et al.	-TEM -SEM	--	--
Shanto et al.	SEM	FT-IR	Evaluated by comparison between the fabricated and designed grid structure.
Chen et al.	Optical microscopy	--	--
Kopecká et al.	-SEM -AFM -CT	-XRD -EDS	--

5

stimulated tissue regeneration from tendon to bone. By controlling the orientation in which the collagen fibers are being produced, higher performance of healed tissue was achieved. The extracted data can be found in table 3.

6

Olmos-Juste et-al (2023) found that the evaluation of specialized extracellular matrix (ECM) deposition increased over time after 28 days of incubation, suggesting that the laden chondrocytes remained in a differentiated phenotype, without the necessity of the growth factors provided by the differentiation medium.

All articles executed morphological analysis in their studies using at least one microscopy method. The most employed technique was the Scanning Electron Microscope (SEM). Capable of generating detailed images of the printed scaffolds, SEM enables an in-depth analysis of imperfections and pores present in the structure. Regarding the chemical analysis, 7 out of the 14 studies performed essays.

The predominant technique utilized was Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Additionally, the analyzed studies conducted Proton Nuclear Magnetic Resonance (HNMR), Energy Dispersion Spectroscopy (EDS), and X-ray Diffraction Analysis (XRD). (Table 4).

For printability and print fidelity tests, it was found that 7 out of the 14 reviewed articles performed printability tests. Printability evaluation by comparison between the fabricated and designed grid structure was predominant. This methodology is valuable for analysing printing behavior. The observation of each element of the grid can provide crucial data for analyzing deformations that occur during filament deposition in printing, as well as reveal whether the printed structure is capable of supporting itself. Still, the results may indicate the use of inappropriate printing parameters. Topology imaging as used by Laufent-Merchan et al. (2023) is capable of providing precise data for

evaluation.

Broadly, studies indicate that higher viscosities of bioink

result in better materials for extrusion-based printing.

However, there is a viscosity limit beyond which increasing viscosity degrades printing capability. Zineh et al. (2022) found that for their bioink viscosity ranging from 2000 to 3000 mm²/s is good for kinematic viscosity in the printing procedure. On the other hand, higher viscosities made the printing process impossible.

Discussion

Based on the performed review, the prevalence of CaCl₂ as a crosslinking agent underscores the significance of the alginate presence in the studied bioinks. Alginate's ability to easily form hydrogels and its biocompatibility make it a popular choice for TE solutions. While fine-tuning the crosslinking process can pose challenges, solutions are being proposed. The use of an auxiliary crosslinking method, as performed by Wang et al. (2022), Maihemuti et al. (2023), Yin et al. (2023) and Kopecká et al. (2023), proves to be a feasible option. By adding a small amount of CaCl₂ during bioink fabrication, a more stable material was produced, due to increased viscosity. The variety in CaCl₂ bath times suggests that investigations in this regard could be crucial to elucidate its effects on the printed scaffolds.

Nevertheless, the prevalence of extrusion-based printing highlights the potential for improvement in other 3D printing methodologies, such as stereolithography or laser-assisted printing. These technologies could greatly improve printing definition while enabling the printing of more complex

shapes. The adoption of such methodologies for printing alginate-based scaffolds would be challenging due to crosslinking strategies. The use of CaCl_2 and UV photocrosslinking for producing these scaffolds in a two-step crosslinking strategy seems suitable for stereolithography and presents opportunities for further development.

Increasing studies in printability and print fidelity studies could be key to identifying the limitations in the scaffold fabrication process as a whole. The use of more precise methods for analyzing printed structures, combined with statistical analyses, can be the key to optimizing the printing process, indicating ways to improve efficiency or, in other cases, identifying limitations. Computerized methods are of great value for this type of analysis.

The *in vitro* studies performed in the studied articles emphasize the suitability of alginate-based bioinks for cartilage TE applications. Chondrogenic induction of human bone marrow stromal cells and secretion of collagen also highlights the mentioned suitability. A limited number of articles undertaking *in vivo* studies could indicate that the field of tissue engineering under consideration is in an intermediate stage, presenting significant opportunities for further development.

Conclusion

This review offers valuable insights into the role of 3D printed alginate-based scaffolds for cartilage TE. The capacity for rapid production of highly biocompatible constructs, promoting regeneration in such tissues, has the potential to shift the paradigm in lesion treatment. Moreover, the ability to elevate viscosity is beneficial for improving the printability of extrusion-based methods. Although extrusion-based 3D printing is predominant, there is

potential for improvement through the exploration of other 3D printing methodologies. The investigation of CaCl_2 bath times can also reveal important insights in this regard.

While morphological evaluation of printed scaffolds is crucial to assessing printed structure, conducting chemical characterization studies can significantly enhance the understanding of the produced bioinks. The high number of articles conducting *in vitro* essays with promising results showcases successful applications of 3D printed alginate-based scaffolds for cartilage TE. When considered alongside the relatively small number of articles performing *in vivo* essays, this underscores the potential for developing impactful studies. 3D printing of alginate-based scaffolds showcases a promising future in cartilage TE. The presence of studies that support significant results, the small number of *in vivo* essays and the prevalence of extrusion-based methodology highlight the broad scope for innovation in cartilage TE.

References

- Babbar A, et al. Additive Manufacturing of Polymers for Tissue Engineering: Fundamentals, Applications, and Future Advancements. CRC Press, 2022.
- Caplan, A. I. (1984). Cartilage. Scientific American, 251(4),

84-97.

Chen Y, et al. Research on Cartilage 3D Printing Technology Based on SA-GA-HA. *Materials*. 2023, v. 16, n. 15: p. 5312.

De Boer J, et al. *Tissue engineering*. 3rd ed. Elsevier, 2023.

Decarli MC, et al. Bioprinting of Stem Cell Spheroids Followed by Post- Printing Chondrogenic Differentiation for Cartilage Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*. 2023, v. 12, n. 19: p. 2203021.

Dhandayuthapani B, et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International journal of polymer science*. 2011.

Galvão, et al. Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises: A recomendação PRISMA. *Epidemiologia e serviços de saúde*. 2015, v. 24: 335-42.

Gebhardt A, Jan-Steffen H. *Additive manufacturing: 3D printing for prototyping and manufacturing*. Carl Hanser Verlag, 2016.

Kilian D, et al. Core-shell bioprinting as a strategy to apply differentiation factors in a spatially defined manner inside osteochondral tissue substitutes. *Biofabrication*. 2022, v. 14, n. 1: p. 014108.

Kopecká K, et al. Synthesis and Exfoliation of Calcium Organophosphonates for Tailoring Rheological Properties of Sodium Alginate Solutions: A Path toward Polysaccharide-Based Bioink. *Biomacromolecules*. 2023.

Lafuente- Merchan M, et al. Chondroitin and dermatan

sulfate bioinks for 3D bioprinting and cartilage regeneration. *Macromolecular Bioscience*. 2023, v. 22, n. 3: p. 2100435.

Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004, v. 428, n. 6982: 487-92.

Lanza R, et al. *Principles of tissue engineering*. 5th ed. Academic press, 2020.

Ma H, et al. Multiscale Hierarchical Architecture- Based Bioactive Scaffolds for Versatile Tissue Engineering. *Advanced Healthcare Materials*. 2023, V. 11, N. 13: p. 2102837.

Maihemuti A, et al. 3D-printed fish gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. *Bioactive Materials*. 2023, vol 26: 77-87.

Olmos-Juste R, et al. Alginate-waterborne polyurethane 3D bioprinted scaffolds for articular cartilage tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023, v.

7

253: p. 127070.

Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials*. 2010, v. 3, n. 3: 1863-87.

Rehm BHA, Moradali MF. Alginates and their biomedical applications. Vol. 11. Singapore: Springer, 2018.

Sathish PB, et al. Tricomposite gelatin- carboxymethylcellulose-alginate bioink for direct and indirect 3D printing of human knee meniscal scaffold. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022, v. 195: p. 179-189.

Shanto PC, et al. Physico-biological evaluation of 3D printed dECM/TOCN/alginate hydrogel based scaffolds for cartilage tissue regeneration. *Biomaterials Advances*. 2023, v. 145: p.213239.

Stoddart MJ, Della Bella E, Armiento AR. *Cartilage Tissue Engineering*. Springer Nature, 2023.

Stratton S, et al. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive materials*. 2016, 1.2: 93-108.

Van Den Buleke AI, et al. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules*. 2000,1.1: 31-8.

Wang M, et al. 3D Contour Printing of Anatomically Mimetic Cartilage Grafts with Microfiber-Reinforced Double- Network Bioink. *Macromolecular Bioscience*. 2022, v. 22, n. 9: p. 2200179.

Wei Q, et al. Design and evaluation of sodium alginate/polyvinyl alcohol blend hydrogel for 3D bioprinting cartilage scaffold: *Molecular*

dynamics simulation and experimental method. Journal of Materials Research and Technology. 2022, v. 17: p. 66-78.

Xiao S, et al. Gelatin methacrylate (GelMA)-based hydrogels for cell transplantation: an effective strategy for tissue engineering. *Stem cell reviews and reports*. 2019, 15: 664-679.

Yin P, et al. A modular hydrogel bioink containing microsphere-embedded chondrocytes for 3D-printed multiscale composite scaffolds for cartilage repair. *Iscience*. 2023, v. 26 n. 8.

Zineh BR, et al. 3D printing of alginate/thymoquinone/halloysite nanotube bio-scaffolds for cartilage repairs: experimental and numerical study. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 2022, v. 60, n. 11: p. 3069-3080.

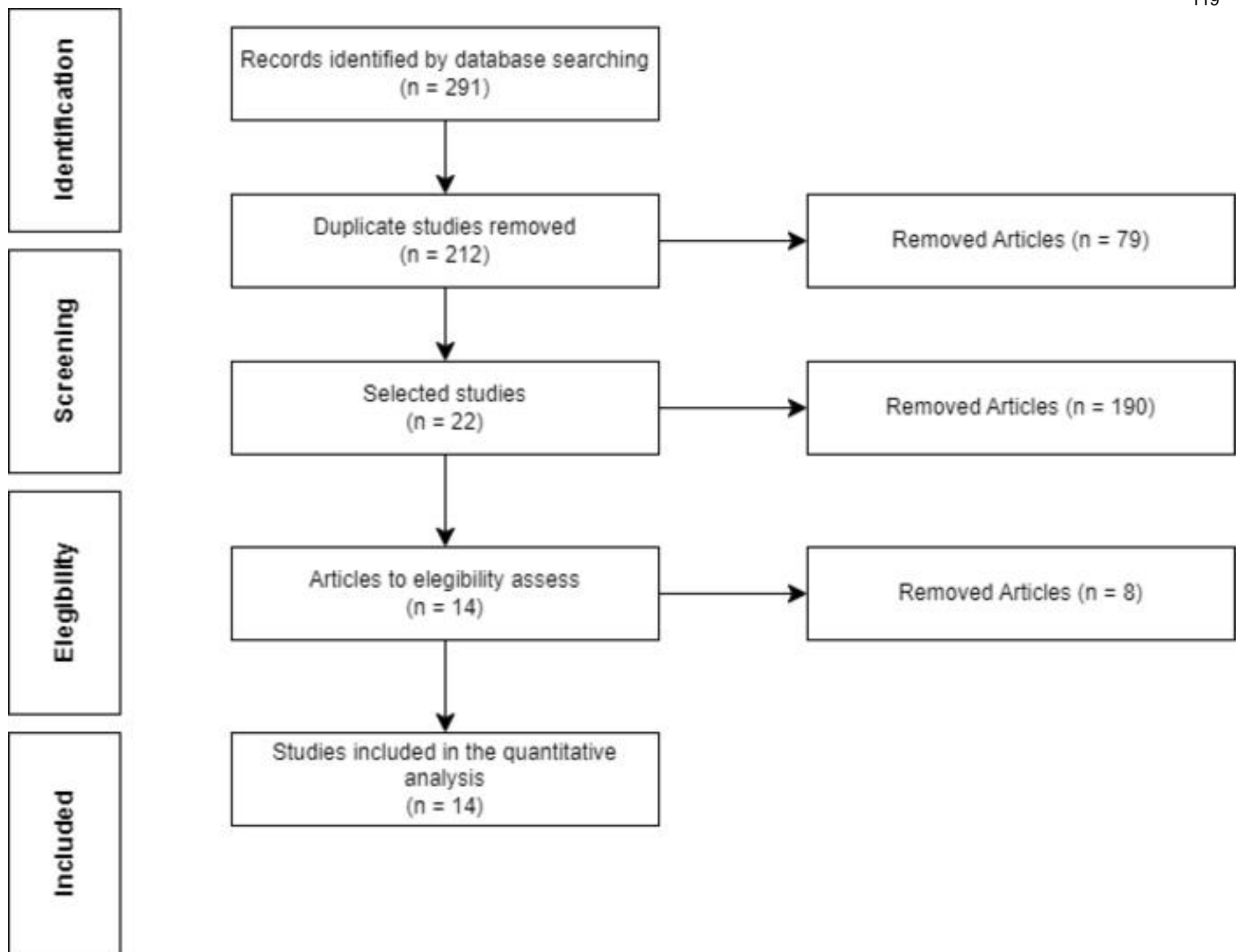


Figure 1 [Click here to access/download;Figure;Figure 1.png](#)