

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA  
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

**DIEGO SILVA BATISTA**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA BIOIMPRESSORA 3D E OBTENÇÃO DE  
HIDROGÉIS PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA TECIDUAL.**

Araraquara, SP

2020

Diego Silva Batista

**DESENVOLVIMENTO DE UMA BIOIMPRESSORA 3D E OBTENÇÃO DE  
HIDROGÉIS PARA APLICAÇÕES EM ENGENHARIA TECIDUAL.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Coorientadora: Dra. Molíria Vieira dos Santos

Araraquara, SP

2020

## FICHA CATALOGRÁFICA

B336d Batista, Diego Silva

Desenvolvimento de uma bioimpressora 3D e obtenção de hidrogéis para aplicação em engenharia tecidual/Diego Silva Batista. -Araraquara: Universidade de Araraquara, 2020.

56f.

Dissertação (Mestrado)- Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Coorientadora: Dra. Molíria Vieira dos Santos

1. Manufatura aditiva. 2. Impressora 3D. 3. Bioimpressora.  
4. Biomaterial. 5. Hidrogéis. 6. Microextrusão. 7. Laponita. 8. Goma Gelana. I. Título.

CDU 577.1:66

## **DIEGO SILVA BATISTA**

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 11 de fevereiro de 2020.

### **BANCA EXAMINADORA**

  
Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Orientador)  
Universidade de Araraquara - UNIARA

  
Prof. Dr. RODRIGO ALVARENGA REZENDE  
Universidade de Araraquara - UNIARA

  
Dr. HENRIQUE FINOCCHIO  
Afinko Soluções em Polímeros de São Carlos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me guia, protege e acompanha todos os dias.

Aos meus pais por apoiarem nas minhas escolhas, projetos e aventuras.

A Daniany, namorada, amiga, conselheira, por sempre me apoiar lembrar que nunca estarei sozinho. Obrigado por me compreender e me incentivar.

Ao meu amigo e orientador Hernane pela orientação, confiança, ensinamentos e estímulo.

A minha coorientadora Molíria pela orientação, ajuda, amizade e incentivo.

Aos meus irmãos Alysson e Igor meu irmão, por sempre me incentivar, ensinar, ter paciência e acreditar que essa etapa seria concluída.

A toda minha família e amigos por mandarem energias positivas para a conclusão do trabalho.

Ao coordenador André Amaral e a secretaria Sandra Pavanelli que sempre estiveram à disposição para tirarem minhas dúvidas.

Aos Amigos Anderson, Adilson, Marquinho, João e Domingão.

A minha segunda família, banda Acquários (Davidson, Igor, Betu, Leandro, Alysson, Robson, Daniel, Felipe, Everton, Sr. Toninho e Torraca).

A todos da HJR Construções, em especial a Sr. Hugo e Renato por permitirem que acompanhasse as aulas no horário de serviço.

A todos os membros e amigos do grupo BioPolMat.

“O que é nascido de Deus vence o mundo, e a vitória que vence o mundo é a Nossa Fé.”

1 João 5:4

## RESUMO

Impressão tridimensional (3D) ou manufatura aditiva é uma tecnologia emergente que recentemente vem ganhando significativa atenção na área de medicina e de engenharia tecidual. Entretanto, as plataformas de bioimpressão comerciais ainda apresentam alto custo para pequenas instalações de pesquisa, especialmente no ambiente acadêmico. Além disso, para a utilização dessa técnica, é necessário também a produção de hidrogéis e biotintas funcionais que visam igualar as propriedades, químicas, físicas e biológicas do tecido humano. Neste sentido, hidrogéis baseados em goma de gelatina (GG) podem ser promissores, uma vez que a GG é um polissacarídeo natural, de fácil funcionalização, biodegradável, biocompatível e que apresenta similaridades com a matriz celular. Ao mesmo tempo, a laponita (LAP) é uma argila formada por nanosilicatos e que apresenta excelentes propriedades referentes a atividades biológicas, adesão e proliferação celular. No presente trabalho, foi desenvolvida uma bioimpressora *homemade* de baixo custo utilizando a tecnologia de microextrusão através da modificação de uma impressora 3D de modelagem por deposição fundida (FDM) do modelo ReprapPrusa i3. Ademais, hidrogéis baseados em GG e LAP foram preparados e caracterizados pelas técnicas de MEV, FTIR, TGA, DRX e Reometria. O hidrogel ideal para bioimpressão utilizando a técnica de microextrusão, foi o de concentração 2,7 m/v% de GG e 0,3 m/v% de LAP. O mesmo foi utilizado para a validação da bioimpressora desenvolvida, demonstrando sua capacidade de fabricar estruturas 3D com boa precisão espacial ao longo dos eixos X, Y e Z e apresentando uma fidelidade de impressão na bioimpressão de um scaffold. Os resultados obtidos demonstraram que ambos, bioimpressora e os hidrogéis compósitos são promissores para aplicações em manufatura aditiva e engenharia tecidual.

**Palavras-Chaves:** Manufatura aditiva, impressora 3D, bioimpressora, biomaterial, hidrogéis, microextrusão, laponita, goma gelatina.

## ABSTRACT

Three-dimensional (3D) printing or additive manufacturing is an emerging technology that has recently been gaining significant attention in the area of medical and tissue engineering. However, commercial bioprinting platforms still have a high cost for small research facilities, especially in the academic environment. In addition, to use this technique, it is also necessary to produce hydrogels and functional bioink that aim to match the properties, chemical, physical and biological of human tissue. In this sense, hydrogels based on gellan gum (GG) can be promising, since GG is a natural polysaccharide, easily functionalized, biodegradable, biocompatible and which has similarities with the cell matrix. At the same time, laponite (LAP) is a clay formed by nanosilicates and has excellent properties related to biological activities, adhesion and cell proliferation. In the present work, a low cost homemade bioprinter was developed using microextrusion technology through the modification of a RepRap Prusa i3 model of molten deposition modeling (FDM). In addition, hydrogels based on GG and LAP were prepared and characterized by the techniques of SEM, FTIR, TGA, DRX and Rheometry. The ideal hydrogel for bioprinting using the microextrusion technique was a 2.7 w/v% GG concentration and 0.3 w/v% LAP. The same was used for the validation of the developed bioprinter, demonstrating its ability to manufacture 3D structures with good spatial precision along the X, Y and Z axes and presenting a fidelity of impression in the bioprinter of a scaffold. The results obtained demonstrated that both bioprinter and composite hydrogels are promising for applications in additive manufacturing and tissue engineering.

**Keywords:** Additive Manufacturing, 3D Printer, Bioprinter, Biomaterial, Hydrogels, Microextrusion, Laponite, Gellan Gum.



## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de bioimpressão por jato de tinta.....	10
Figura 2: Modelo de bioimpressão assistida por laser .....	11
Figura 3: Modelos de bioimpressão microextrusão .....	13
Figura 4: Classificação dos Biomateriais.....	15
Figura 5 – Exemplos de ligações químicas e físicas formadas entre hidrogéis e tecidos circundantes.....	18
Figura 6: Hidrogel de Goma Gelana.....	19
Figura 7: Parâmetros influentes na fidelidade de impressão e células, e suas relações críticas para a biofabricação.....	20
Figura 8: Estrutura Química da Goma Gelana. ....	21
Figura 9: Cristal único de laponita .....	22
Figura 10: Montagem da impressora: a) Estruturas em MDF utilizados para montagem b) Impressora montada. ....	25
Figura 11: Materiais tridimensionais impressos: (a) modelo de orelha (ABS); (b) troféu de participação do ENBIOCEL (PLA); (c) início de impressão do cabeçote da bioimpressora (ABS); (d) engrenagem para motor nema17 (PLA); (e) <i>Tyrannosaurus rex</i> (PLA); (f) exposição de itens impressos com impressora 3D montada. ....	27
Figura 12: Visão isométrica do projeto do cabeçote de microextrusão desenvolvido	28
Figura 13: Bioimpressora desenvolvida: (a) visão inteira; (b) visão ampliada do cabeçote.....	28
Figura 14 - Fatiamento para impressão (scaffold com 12 camadas).....	32
Figura 15: Amostra de hidrogéis (a) GOMA GELANA PURA, (b) GG/LAP-90/10, (c) GG/LAP-50/50, (d) GG/LAP-10/90, (e) LAPONITA PURA .....	33
Figura 16: Hidrogéis liofilizados (a) GOMA GELANA PURA, (b) GG/LAP-90/10, (c) GG/LAP-50/50, (d) GG/LAP-10/90, (e) LAPONITA PURA. ....	34
Figura 17: Imagens de MEV dos hidrogéis: (a) LAPONITA PURA, (b) GG/LAP-10/90, (c) GG/LAP-50/50, (d) GG/LAP-90/10, (e) GOMA GELANA PURA. ....	35
Figura 18: Espectrometria na região do infravermelho: a) GOMA GELANA PURA, b) GG/LAP-90/10, c) GG/LAP-50/50, d) GG/LAP-90/10, e) LAPONITA PURA. ....	36
Figura 19: TGA dos hidrogéis - (a) LAPONITA PURA, (b) GG/LAP- 10/90, (c) GG/LAP-50/50, (d) GG/LAP- 90/10, (e) GOMA GELANA PURA.....	38

Figura 20 - Difractogramas de Raios-X das amostras GOMA GELANA PURA (preto), GG/LAP-90/10(vermelho), GG/LAP-50/50(verde), GG/LAP-10/90 (azul) e LAPONITA PURA (azul claro).....	40
Figura 21 - Viscosidade ( $\eta$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\gamma$ ): LAPONITA PURA, GG/LAP- 10/90, GG/LAP- 50/50, GG/LAP- 90/10, GOMA GELANA PURA.....	41
Figura 22: Impresso em impressora <i>home made</i> usando cabeçote de microextrusão .....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Biomateriais utilizados na impressão 3D.....	17
Tabela 2: Formulações de hidrogéis de LAP e GG. ....	29
Tabela 3: Dados das curvas TGA dos hidrogéis laponita pura, GG/LAP 90/10, GG/LAP 50/50, GG/LAP 10/90, goma gelana pura .....	39
Tabela 4 - Parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade Ostwald-de Waele.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS - Acrilonitrilabutadieno estireno

FDM - Modelagem de deposição fundida (*fuseddepositionmodelling*)

PLA - Ácido poliláctico

LAP - Laponita

GG - Goma de gelana

TGA -Termogravimetria ou análise termogravimétrica

FTIR - Espectroscopia na região doo infravermelho com transformada de Fourier

MEV -Microscópio eletrônico de varredura

STL -uma abreviação de "stereolithography"

CAD - Desenho auxiliado por computador (Computer-aided design)

LAB - Bioimpressão assistida por laser (*Laser-assistedbioprinting*)

MA - Manufatura aditiva

MDF - Placa de fibra de média densidade (*Medium-DensityFiberboard*)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:.....	8
1.1. Bioimpressão .....	8
1.2. Bioimpressora 3D .....	9
1.2.1. Jato de Tinta .....	9
1.2.2. Bioimpressão assistida por laser (LAB) .....	11
1.2.3. Microextrusão .....	12
1.3. Biomateriais .....	14
1.4. Biomateriais para bioimpressão.....	15
1.5. Hidrogéis.....	17
1.6. Goma Gelana .....	21
1.7. Laponita.....	22
2. OBJETIVOS:.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
3.1. Bioimpressora.....	25
3.2. Aplicação dos Hidrogéis .....	29
3.2.1. Preparação dos hidrogéis compósitos baseados em goma gelana e laponita. 29	
3.3. Técnicas empregadas na caracterização dos materiais. ....	30
3.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	30
3.3.2. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (FTIR) .....	30
3.3.3. Análise Termogravimétrica (TGA) .....	30
3.3.4. Reometria de placas paralelas .....	31
3.3.5. Difração de Raio X (DRX).....	31
3.3.6. Bioimpressão .....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5. CONCLUSÃO .....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	45

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1. Bioimpressão

De acordo com Murphy e Atala (2014), a bioimpressão é uma técnica de impressão camada por camada para fabricação de estruturas 3D de componentes funcionais tais como, materiais biológicos, bioquímicos e células vivas.

Segundo Highley, (2019) a bioimpressão é uma tecnologia que nos permite posicionar células e materiais com alta resolução no espaço 3D.

A partir da interseção entre a manufatura Aditiva (MA), medicina regenerativa e engenharia tecidual, a bioimpressão traz uma visão em que, dispositivos são desenvolvidos para auxiliar o tratamento de lesões, falência de órgão e substituição tecido humano. A partir de uma imagem da lesão, por exemplo, é gerado um modelo 3D, sendo transmitido para o hardware de bioimpressão, onde é gerada uma estrutura de sistema biológico funcional e compatível com o paciente (HIGHLEY, 2019).

Atualmente, a bioimpressão, como ferramenta para medicina, desenvolve um papel importante para aplicações de impressoras 3D em engenharia tecidual, visando a replicação da natureza complexa do tecido humano e a redução da necessidade de doação de órgãos ou tratamentos imunossupressores (GRAY et al., 2016; KAMALI et al., 2016; MALDA et al., 2013; SIGAUX et al., 2019; VANKOEVERING; HOLLISTER; GREEN, 2017).

Segundo Groll et al. (2016) e Keriquel et al. (2010), a bioimpressão utiliza processos auxiliados por computador para fabricar materiais vivos e não vivos em 2D ou 3D, afim de produzir estruturas para serem utilizadas em medicina regenerativa.

Para bioimpressão, a bioimpressora bem como ferramentas como software CAD (desenho auxiliado por computador) são elementos chaves para projetar e executar a deposição camada a camada (DATTA et al., 2017; KOLESKY et al., 2016). Além disso, o processo de bioimpressão se assemelha ao da impressão 3D clássica, porém necessita controle de parâmetros, tais como temperatura da material impresso, viscosidade do material no momento da impressão, velocidade e temperatura de impressão (GAO et al., 2018).

De pesquisas na área de bioimpressão, diversos trabalhos significativos já foram publicados, tais como produção de *scaffold* para liberação de fármacos (WU et al., 1996), regeneração óssea (GIORDANO et al., 1997), e a utilização de poli (caprolactona) para construção de *scaffolds* contendo células (DHARIWALA et al., 2004). Mais recentemente, Cox e colaboradores reportaram a bioimpressão de camadas à base de hidroxiapatita

bioativa fabricados a partir de pós usando aglutinantes impressos e sinterização (COX et al., 2015). A seguir, serão abordados às principais técnicas utilizadas na bioimpressão.

## 1.2. Bioimpressora 3D

A bioimpressora 3D tem como objetivo em longo prazo, a construção de tecidos, órgãos utilizando os seguintes materiais: células vivas, fármacos, polímeros sintéticos e naturais, fatores de crescimento e genes. Quando o objeto for impresso de maneira controlada e precisa, a bioimpressão é capaz de produzir *scaffolds*, modelos de órgãos e pequenos tecidos, através de diferentes técnicas (GUDAPATI; DEY; OZBOLAT, 2016; KIM; KIM; JUNG, 2016).

De acordo com Lee *et al.* (2016), a bioimpressora 3D é um tipo de impressora na qual o material a ser impresso é composto por células vivas, moléculas biotivas, biomateriais ou agregados celulares pequenos.

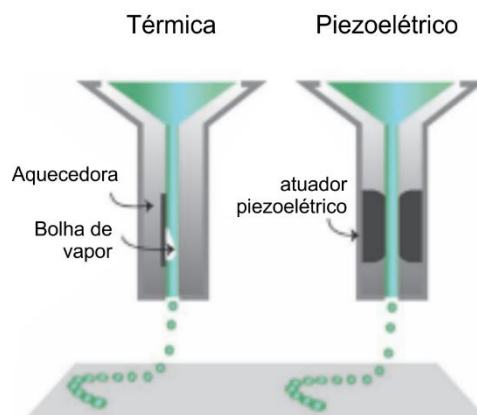
Segundo Murphy e Atala (2014), as principais técnicas utilizadas para deposição de materiais biológicos são: Jato de tinta (*Inkjet*), microextrusão (*Microextrusion*) e impressão assistida por laser (*Laser-assisted*).

### 1.2.1. Jato de Tinta

A bioimpressão por jato de tinta consiste na liberação de gotículas líquidas de biotinta de forma rápida e precisa em um substrato. São projetadas de forma personalizada para manipular e imprimir materiais biológicos em alta resolução, velocidade e precisão de impressão, utilizando forças térmicas ou acústicas para ejetar as gotículas em um substrato. Há um crescente interesse nesta tecnologia no campo de engenharia tecidual devido a mesma ser uma maneira prática e eficiente de impressão, de elementos biológicos, de modo a formar estruturas celulares e teciduais com alta precisão (MURPHY; ATALA, 2014; XU et al., 2006).

Na técnica de bioimpressão por jato de tinta, os biomateriais são armazenados em um cartucho, em sequência a tinta é transferida para uma câmara onde realiza a ejeção de gotículas, que são geradas por dois mecanismos, sendo o primeiro piezoelétrico e outro por atuação térmica (X. CUI, T. BOLAND, D. D. D'LIMA, 2012), tais podem ser observado pela figura 1.

**Figura 1:** Modelo de bioimpressão por jato de tinta.



Fonte: Modificado de Malda et al. (2013)

A técnica de bioimpressão por atuação térmica consiste no aquecimento elétrico do cabeçote de impressão, produzindo pulsos de pressão que forçam as gotas do bico a ser dispensados. A temperatura do cabeçote varia entre 200 ° C e 300 ° C. O aquecimento do cabeçote representa uma certa desvantagem para o uso dessa bioimpressão, pois expõe células e materiais a tensões mecânicas e térmicas, apresentam baixa direcionalidade das gotas, não uniformidade das gotículas, frequente entupimento do bico de impressão e baixa confiabilidade do encapsulamento de celular (GOLDMANN; GONZALEZ, 2000; OKAMOTO; SUZUKI; YAMAMOTO, 2000).

Outra técnica de bioimpressora a jato de tinta utiliza cristal piezoelétrico, onde é aplicada uma voltagem, gerando uma pressão dentro do cabeçote de impressão, transformando o líquido em gotículas, sendo possível controlar o tamanho das gotículas pela tensão aplicada (DEMIRCI; MONTESANO, 2007; TEKIN; SMITH; SCHUBERT, 2008).

De acordo com os pesquisadores Fang et al. (2012) e Demirci e Montesano (2007) há outros modelos que utilizam a radiação acústica associada a um campo de ultrassom para ejetar as gotículas de tinta, onde parâmetros como duração e amplitude do pulso são utilizados para controlar a taxa de ejeção das gotículas.

As bioimpressoras a jato de tinta acústicas possuem como vantagens a capacidade de gerar e controlar o tamanho da gotícula e a direção da ejeção, baixa exposição das células ao calor e à pressão, baixo custo, alta resolução, alta velocidade e compatibilidade com muitos materiais biológicos, não requer contato com a superfície da impressão (CAMPBELL et al., 2005; NAKAMURA et al., 2005; PHILLIPPI et al., 2008; SAUNDERS; GOUGH; DERBY, 2008). As desvantagens e dificuldades encontradas nas



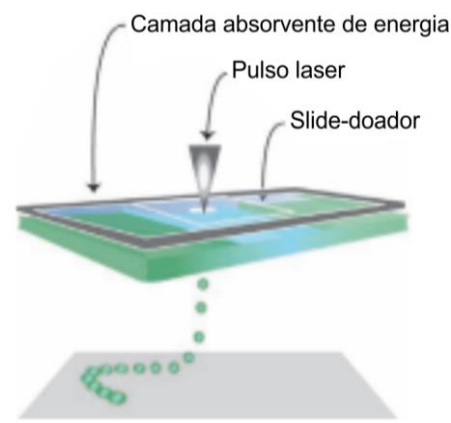
bioimpressoras por jato de tinta são o fato de que as biotintas ou hidrogéis devem estar na forma líquida para possibilitar a formação de gotículas, dificuldade em atingir densidades celulares biologicamente relevantes e a dificuldade de impressão de estruturas verticais (SKARDAL; ATALA, 2015). De acordo com Murphy e Atala (2014), dentre exemplos relevantes realizados pela bioimpressão por jato de tinta estão: a regeneração de pele (SKARDAL; ATALA, 2015), a produção de cartilagem *in situ* (CUI et al., 2012), construções de cartilagem em camadas *in vitro* combinados com eletrofiação (XU et al., 2013), construções ósseas (DE COPPI et al., 2007), bioimpressão a jato de tinta à base de nanocelulose (GUNASEKERA et al., 2016; NECHYPORCHUK et al., 2017).

A diferença entre o método de bioimpressão por jato de tinta e o método na impressão 2D (impressora utilizada para impressão em papel), é a substituição da tinta tradicional (cartucho) por um material biológico (biotinta/hidrogel), e ao invés da impressão no o papel, ocorre a em uma mesa controlada eletronicamente nos eixos X, Y e Z.

### 1.2.2. Bioimpressão assistida por laser (LAB)

A bioimpressão assistida por laser é uma técnica que utiliza como princípio a transferência direta induzida por laser. A bioimpressora é composta por uma fonte de laser pulsado, uma fita revestida com o material biológico a ser transferido e um substrato receptor, como pode ser observado na figura 2.

**Figura 2:** Modelo de bioimpressão assistida por laser



Fonte: Modificado de Malda et al. (2013)

Em seu funcionamento, um pulso de laser é aplicado na camada doadora, aquecendo uma pequena porção, gerando uma bolha de alta pressão, que gera uma pressão na camada do material (hidrogel ou biotinta) impulsionando-o em direção ao substrato. A técnica LAB é de pouca utilização se compararmos com as técnicas microextrusão e bioimpressão a jato de tinta, no entanto sua aplicação na engenharia tecidual é onde tem se havido mais sucesso com uso de materiais biológicos como DNA, células e peptídeos (BARRON et al., 2004; BOHANDY; KIM; ADRIAN, 1986; CHRISEY, 2000; DINCA et al., 2008).

Essa técnica de impressão possui algumas vantagens, devido ao fato de a mesma ser livre de bicos de impressão, o que evita o problema de entupimento por células, fontes de contaminação e ainda permite a impressão de materiais altamente viscosos (HOPP et al., 2005; KOCH et al., 2010). A principal desvantagem citada por Guillotin e Guillemot (2011) e Murphy e Atala (2014) é o alto custo desses sistemas, o que limita a utilização em pesquisas básicas de engenharia de tecidual. Um exemplo de aplicação da impressão a laser 3D na área médica é a fabricação de uma tala traqueal personalizada, sendo não celular e reabsorvível, implantada em um paciente jovem com traqueobroncomalácia (ZOPF et al. (2013). Há também estudos de Keriquel et al. (2010) que demonstram a utilização de LAB na deposição de nano-hidroxiapatita em um modelo 3D de defeito calvária de camundongo.

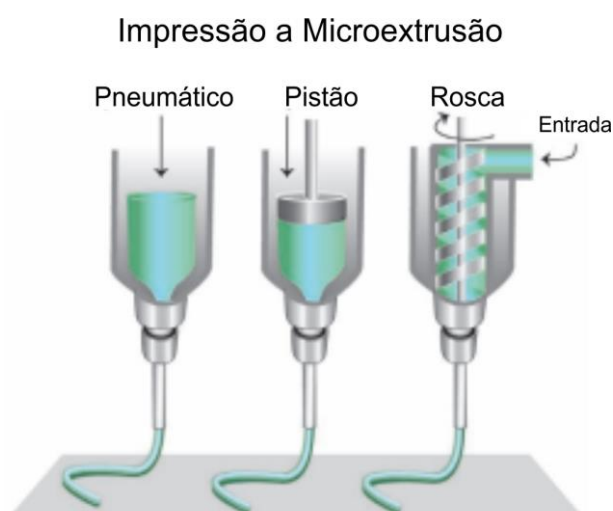
### 1.2.3. *Microextrusão*

Neste trabalho foi utilizada a técnica de microextrusão na qual o material é extrudado na forma de um filamento cilíndrico e contínuo por um cabeçote, através de um reservatório que contém um bico (comumente uma seringa com agulha), com fluxo controlado por um pistão. O cabeçote de microextrusão se move-se ao longo dos eixos X, Y e Z, depositando camada por camada o material, sendo que a primeira camada depositada atua como base ao seu término move-se o eixo Z para a próxima camada, formando assim um objeto 3D. Este tipo de bioimpressora possui um sistema de distribuição formado por: parte mecânica (parafuso ou pistão) e pneumática, sendo o sistema de distribuição mecânico realizado por um pistão que é o método mais comum (Figura 3) (DATTA et al., 2017; HOSPODIUK et al., 2017; MIRONOV et al., 2009; XU et al., 2008).

Uma das vantagens encontradas na técnica de microextrusão é a capacidade de depositar altas densidades celulares com alta resolução, permitindo a impressão de

projetos de estruturas complexas. Sua desvantagem ocorre devido a necessidade de bicos de extrusão, o que pode acarretar em baixa velocidade de impressão diminuição da viabilidade celular das biotintas, e a necessidade de se trabalhar com uma viscosidade ideal do material a ser impresso para evitar entupimentos e preservar formas complexas de impressão (MURPHY; ATALA, 2014).

**Figura 3:** Modelos de bioimpressão microextrusão



Fonte: Modificado de Malda et al. (2013)

Existem trabalhos realizados a partir da tecnologia de bioimpressão de microextrusão que apresentam grande destaque na engenharia de tecidual (NOROTTE et al., 2009), fabricação de válvulas aórticas (DUAN et al., 2013), bioimpressão de um coração com células humanas e material biológico (NOOR et al., 2019), reparo de cartilagem (ZHANG et al., 2014). Entretanto, esta técnica é considerada uma técnica lenta para a impressão de estruturas complexas de alta resolução (MURPHY; ATALA, 2014).

De acordo com Habib et al. (2018) e Murphy et al. (2018) há uma concentração de pesquisas na área de bioimpressão utilizando o processo de extrusão de materiais, utilizando diversos materiais biocompatíveis, como géis, polímeros e hidrogéis contendo células.

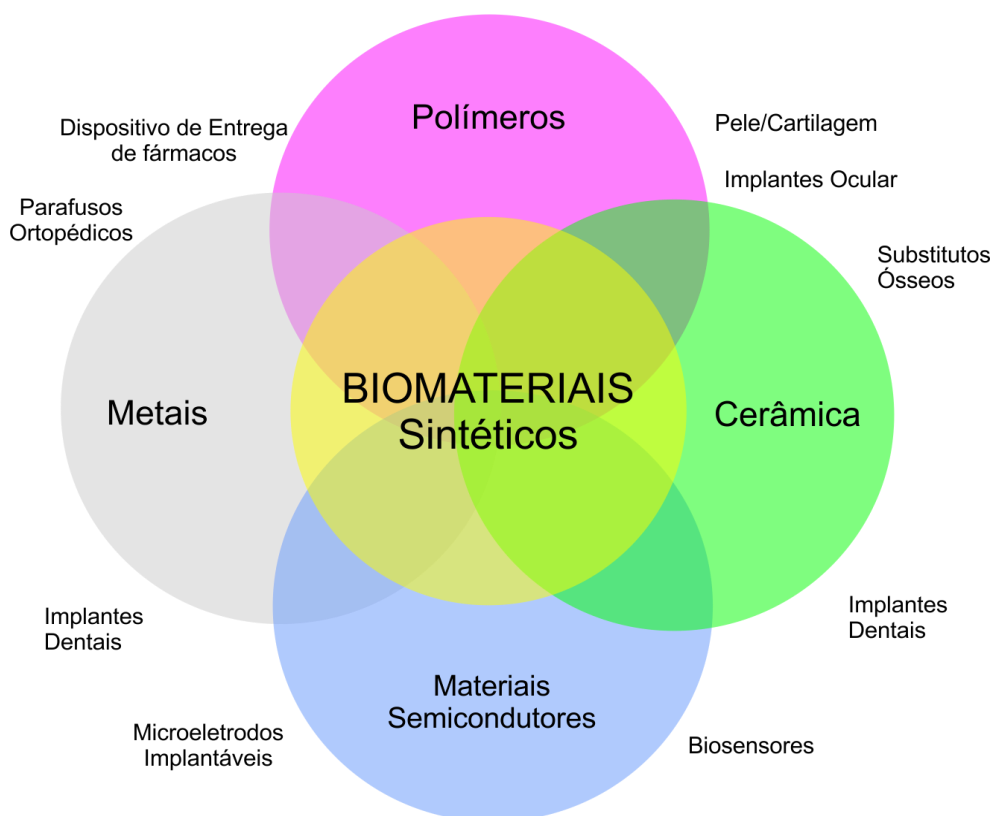
Na bioimpressão a partir da microextrusão, é comum serem usados materiais que reticulam no decorrer da impressão. Os que reticulam à temperatura ambiente (35 – 40°C) permitem a sua extrusão na presença de componentes biológicos, importante fator para aplicações biomédicas (MURPHY; ATALA, 2014; SMITH et al., 2004, 2007).

Comparado com as demais técnicas de bioimpressão a microextrusão é a mais utilizada e acessível (MURPHY; ATALA, 2014; OZBOLAT; HOSPODIUK, 2016; OZBOLAT; MONCAL; GUDAPATI, 2017). Visando obter um equipamento de baixo custo, e que pudesse ser utilizado para a impressão de protótipos baseados nos hidrogéis preparados primeiramente para este trabalho no laboratório Biopolmat da Universidade de Araraquara. O trabalho demonstrou o desenvolvimento de uma bioimpressora 3D através de modificações de uma impressora 3D comercial no modelo de FDM, que possui o mesmo princípio de funcionamento de uma bioimpressora de microextrusão.

### 1.3. Biomateriais

Um biomaterial trata-se de um material capaz de interagir com sistemas biológicos para tratar, avaliar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo, visando a qualidade de vida do indivíduo (ULBRICH, 2007; WILLIAMS, 1987).

Os biomateriais podem ser divididos em classes: cerâmicos, metais, poliméricos ou a combinação destes, podendo ser utilizados em diferentes aplicações, tais como implantes dentários, próteses oculares, fármacos, fixação ortopédica, válvulas cardíacas dentre outras, além da própria bioimpressão, como pode ser observado na figura 4 (PATEL; GOHIL, 2012).

**Figura 4:** Classificação dos Biomateriais

Fonte: modificado de Sundaram (2016)

Os polímeros naturais vêm sendo muito estudados como materiais para aplicações na biomedicina, sendo utilizados em diversos tipos de aplicações dentre elas revestimentos farmacêuticos, implantes mamários, *scaffolds* na engenharia tecidual e regeneração do disco intervertebral (SILVA-CORREIA et al., 2013).

Com boa biocompatibilidade os hidrogéis estão sendo vastamente utilizados como materiais para bioimpressão, sendo explorados em diversas aplicações, tais como bioimpressão a laser (BARRON; SPARGO; RINGEISEN, 2004; GUILLEMOT et al., 2010), bioimpressão a jato de tinta (NAKAMURA et al., 2005) e impressão baseada em extrusão (CHUNG et al., 2013; OZBOLAT; HOSPODIUK, 2016).

#### 1.4. Biomateriais para bioimpressão

Materiais como as biotintas e hidrogéis podem ser utilizados na MA para impressão de tecidos complexos, por atuarem de forma semelhante a um ambiente de matriz extracelular para proliferação, suporte, adesão e diferenciação de células vivas.

Biotintas são formulações com a presença de células adequadas para utilização na biofabricação, onde pode conter componentes e biomateriais biologicamente ativos (GROLL et al., 2019). Casos de formulações que possuem componentes ou moléculas biologicamente ativas, mas não apresentem a presença de células, não se qualificam como biotintas. Alguns biomateriais podem ser impressos e posteriormente semeados com células após a impressão, mas se não são diretamente formulados com células não se qualificam como biotinta (SCHUURMAN et al., 2011; SHIM et al., 2011).

Para a preparação de biomateriais, estratégias específicas devem ser utilizadas na impressão de biotintas, por exemplo, um processo de impressão termicamente ameno, com temperaturas menores que 37°C que evitem a degradação de moléculas bioativas, macropoteínas e células vivas. Além disso, para obter uma estrutura com maior precisão, é necessário empregar técnicas de reticulação durante ou após a impressão, tais como: reticulação iônica, enzimática, química, térmica, e reticulação por UV (HENNINK; VAN NOSTRUM, 2012; XU et al., 2018). A definição da estratégia a ser utilizada depende muito do material a ser impresso e, por isso, o desenvolvimento de hidrogéis que apresentam características, tais como, similaridades com a matriz extra celular, fácil funcionalização e reticulação, viscosidade adequada para impressão e biodegradabilidade, biocompatibilidade é essencial (MURPHY; ATALA, 2014).

Neste sentido, diversos pesquisadores vêm estudando a formulações de hidrogéis baseados em materiais naturais, por exemplo alginato, quitosana, colágeno, gelatina, metacrilato de gelatina. A tabela 1 apresenta uma relação de trabalhos publicados com o tipo de material usado e sua aplicação.

**Tabela 1** - Biomateriais utilizados na impressão 3D

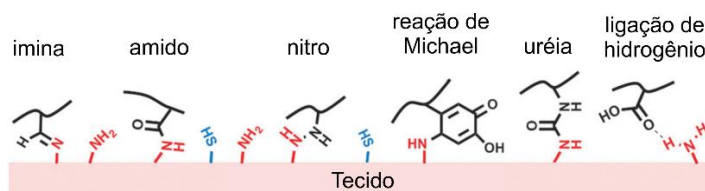
<b><i>Hidrogel</i></b>	<b><i>Aplicação</i></b>	<b><i>Referências</i></b>
Quitosana	Plataforma celulares para Engenharia Tecidual	(DEMIRTAŞ; IRMAK; GÜMÜŞDERELIOĞLU, 2017)
Alginato, Laponita e Metilcelulose	Bioimpressão 3D de <i>scaffolds</i>	(AHLFELD et al., 2017)
Metacrilato e Gelatina	Bioimpressão 3D carregada de células	(BERTASSONI et al., 2014; BILLIET et al., 2014)
Nanocelulose-Alginato	Bioimpressão 3D de estruturas	(MARKSTEDT et al., 2015)
Fibrina	Microambientes projetados por células-tronco para uso na bioimpressão	(PHILLIPPI et al., 2008)
Alginato e Acrilamida	Protótipo de cartilagem do menisco	(BAKARICH et al., 2014)
Hidroxiapatita	Bioimpressão 3D de <i>scaffolds</i> para utilização na Engenharia de tecidual	(COX et al., 2015)
Goma Gelana	Hidrogéis injetáveis para regeneração da cartilagem	(OLIVEIRA et al., 2010)
Goma Gelana, Laponita e Metacrilato	Curativo para o tratamento de feridas	(PACELLI et al., 2016)
Poli (etileno glicol) (PEG) e Ácido Hialurônico (HA)	Bioimpressão 3D de <i>scaffolds</i>	(BOERE et al., 2015)
Poli (ácido acrílico) e Laponita	Hidrogéis como adesivos biocompatíveis	(SHEN et al., 2014)

### 1.5. Hidrogéis

Os hidrogéis são constituídos por cadeias poliméricas tridimensionalmente estruturadas por ligações químicas e físicas (figura 5). Os hidrogéis podem ser obtidos a partir de polímeros naturais e sintéticos com cadeias parcialmente hidrofílicas que fazem com que os mesmos apresentem uma grande retenção de água sem perder sua

estrutura. Estas características possibilitam interações e ligações com tecidos e permite a utilização de hidrogéis na área farmacêutica, liberando controladamente fármacos após estímulos fisiológicos, tais como: pH, oxidação, temperatura e presença de biomoléculas (uréia, glicose e insulina) (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

**Figura 5** – Exemplos de ligações químicas e físicas formadas entre hidrogéis e tecidos circundantes.



Fonte: Modificado de Ghobril e Grinstaff (2015)

A engenharia tecidual apresenta interesse nos hidrogéis também, devido a características de materiais líquidos e materiais sólidos, onde, como material líquido permitem a difusão de solutos e circulação de fluido, e como materiais sólidos os hidrogéis são mais resistentes a aplicação de uma tensão podendo se deformar de forma reversível, são flexíveis e permitem boa mobilidade nas cadeias poliméricas (GONG, 2006).

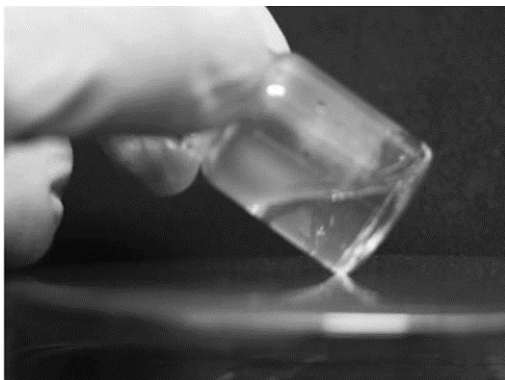
Uma parte razoável dos hidrogéis utilizados na engenharia de tecidual é baseada em polímeros de origem natural, abrangendo gelatina, alginato, quitosana, colágeno, ácido hialurônico e fibrina (DASH et al., 2011; HUNT; GROVER, 2010; SELIKTAR, 2012; SPILLER; MAHER; LOWMAN, 2011).

Na figura 6, apresenta uma solução de gelatina antes da reticulação em temperatura elevada (aproximadamente 80°C), e o hidrogel de gelatina em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) após a reticulação

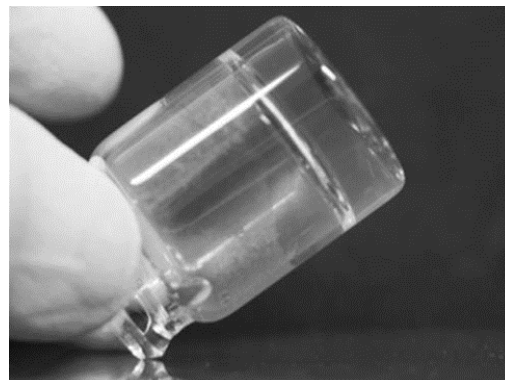


**Figura 6:** Hidrogel de Goma Gelana

Hidrogel antes da reticulação



Hidrogel após da reticulação



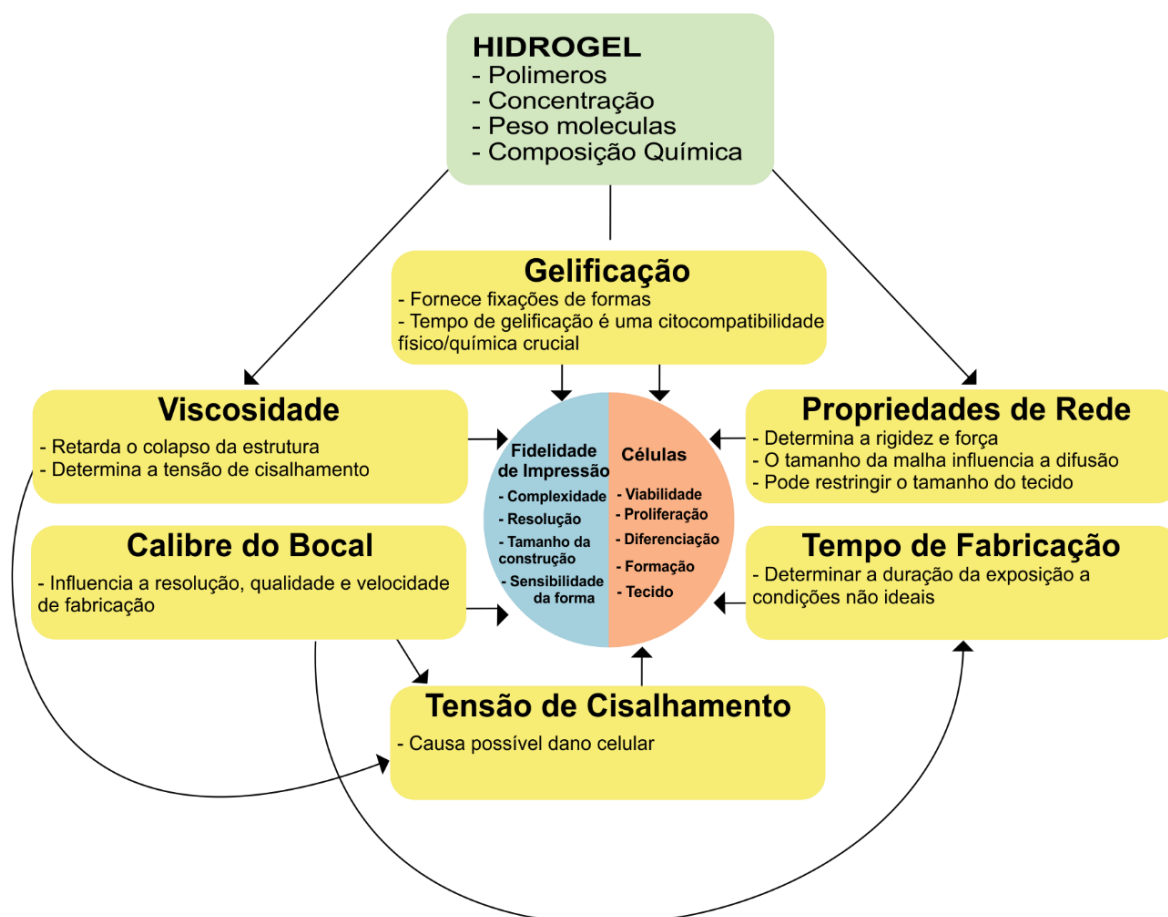
Fonte: modificado de Oliveira et al. (2010).

Para que um hidrogel se torne uma biotinta, células devem ser adicionadas na formulação (BRODSKY; ANDREWS, 2011). Os hidrogéis proporcionam um ambiente ideal para células. Neste contexto, a impressão de hidrogéis na forma de uma estrutura tridimensional, flexível e porosa, permite não apenas a incorporação de células, como também a comunicação entre as mesmas, sendo assim promissor para aplicação das mesmas como um biomaterial (DRURY; MOONEY, 2003; RAJAN et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2009).

Na área biomédica as aplicações são em lentes de contato, matriz de encapsulamento de células, pele artificial, curativos, liberação controlada de fármacos e scaffolds, devido sua natureza elástica e hidratada que diminui irritações em tecidos adjacentes (ORÉFICE, RODRIGO LAMBERT; PEREIRA, MARIVALDA DE MAGALHÃES; MANSUR, 2006; OVIEDO et al., 2008).

No entanto a obtenção de hidrogéis para serem utilizados em bioimpressão depende de alguns parâmetros físico-químicos. Tais como Mecanismo de reticulação e propriedades de reologia que determinam a habilidade de impressão de hidrogéis. Parâmetros como demonstrado a seguir na figura 7, são interligados e importantes para todas as técnicas de bioimpressão.

**Figura 7:** Parâmetros influentes na fidelidade de impressão e células, e suas relações críticas para a biofabricação.



Fonte: Modificado de Malda et al. (2013).

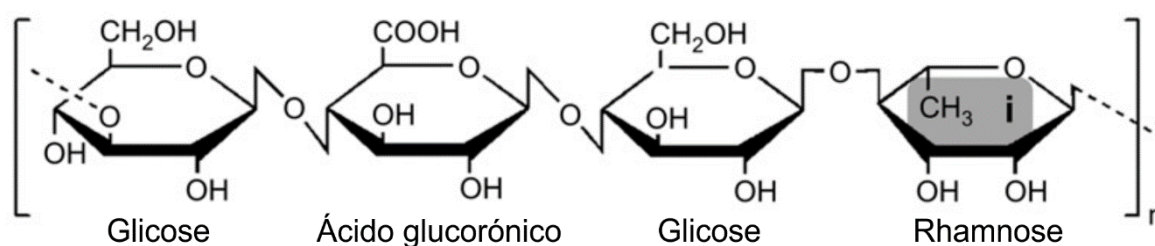
De acordo com Guvendiren et al. (2012) para que um hidrogel possa ser utilizado na medicina, alguns critérios essenciais são necessários, como, possuir uma viscosidade adequada para permanecer em uma seringa, o hidrogel deve fluir sobre uma pressão moderada e possuir elasticidade e resistência mecânica. Para as aplicações específicas do material, este necessita ser também biocompatível. Até o momento, nenhum hidrogel para aplicação em cirurgia está disponível no mercado, o que se encontra no mercado são hidrogéis para tratamento cicatrização de feridas. Entretanto, existem estudos utilizando hidrogéis como adesivos para reparos do tendão flexor (FERGUSON; RINKER, 2006) e para proteção do endotélio corneano durante cirurgias de facoemulsificação (GALVIS et al., 2019).

O principal desafio dos hidrogéis é oferecer maior capacidade de impressão 3D, possibilitando a impressão de órgãos complexos (CABRAL; MORATTI, 2011).

## 1.6. Goma Gelana

A Goma Gelana (GG) é um polissacarídeo bacteriano extracelular aniônico produzido com alto rendimento pela cepa não patogênica de alto peso molecular, biodegradável e não tóxico, solúvel em água sendo produzido a partir da bactéria *Sphingomonas elodea* (anteriormente conhecida como *Pseudomonas elodea*). A estrutura química da GG é composta de unidades repetitivas de tetrassacarídeos lineares as quais consistem de dois resíduos de D-glicose e um resíduo de L-Ramnose e ácido glicurônico (Fig.7) (JANSSON; LINDBERG; SANDFORD, 1983; O'NEILL; SELVENDRAN; MORRIS, 1983).

**Figura 8:** Estrutura Química da Goma Gelana.



**Fonte:** Modificado de Coutinho et al. (2010).

Diversos setores utilizou a GG, como indústria farmacêutica, indústria alimentícia, engenharia química entre outras, devido a ser um hidrogel transparente, biocompatível, biodegradável, dúctil, maleável e não tóxico. Além disso, o hidrogel de gelana apresenta ainda resistência ao calor e é termoreversível (GRASDALEN; SMIDSRØD, 1987; PICONE; DA CUNHA, 2010; QUINN; HATAKEYAMA, 1993; WANG et al., 2016; ZHAO et al., 2015).

Segundo Jen et al. (1996) as vantagens da utilização da GG em aplicações biomédicas incluem processamento sob condições brandas, atoxicidade, semelhança estrutural com glicosaminoglicanos da matriz celular, presença de resíduos de ácido glicurônico em sua unidade de repetição, e a possibilidade de utilizar um sistema injetável de maneira minimamente invasiva.

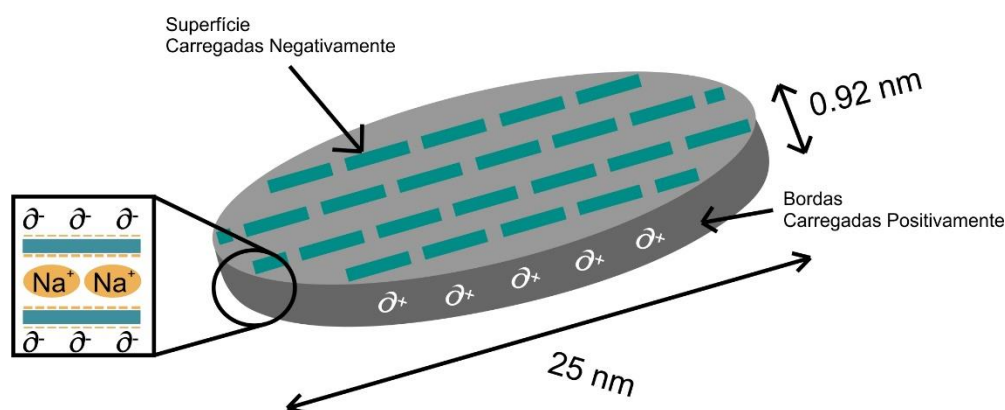
Atualmente, a GG tem sido muito estudada na preparação de géis para aplicações em biomedicina (PACELLI et al., 2015), como vem sendo demonstrado por Pacelli e colaboradores que desenvolveram um hidrogel nanocompósito à base de metacrilato de GG e Laponita para aplicações biomédicas (PACELLI et al., 2016). Outros exemplos são: hidrogéis de goma gelana para cultura 3D de cardiomiócito (KOIVISTO et al., 2019),

esferas de goma gelana e laponita para liberação de fármacos (ADROVER et al., 2019), aplicação de goma gelana como biomaterial na engenharia tecidual para aplicações em cartilagem, uma vez que se trata de um material bem versátil, cuja reticulação pode ser alcançada com mudanças de temperatura ou pH (OLIVEIRA et al., 2010) e hidrogéis compósitos para regeneração do tecido osteocondral (PEREIRA et al., 2018).

### 1.7. Laponita

A laponita (LAP) é uma argila sintética, da família de nanosilicatos, que possui uma estrutura 2:1, sendo duas camadas de sílica coordenada em tetraedro com uma camada de óxido de magnésio coordenada octaédricamente comparável à estrutura da hectorite mineral de argila natural. Em dispersão aquosa a laponita forma cristais em forma de disco, conforme a figura 9. Sua fórmula empírica é  $\text{Na}^{+0.7}[(\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3})\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{-0.7}$  sintetizada diante de uma combinação de magnésio, sais de sódio, lítio com silicato de sódio. Possui várias vantagens, como dispersão estável em água, fácil mistura, e baixa viscosidade (RUZICKA; ZACCARELLI, 2011; XAVIER et al., 2015).

**Figura 9:** Cristal único de laponita



Fonte: Modificado de BYK Additives & Instruments (2014).

A forma de disco do cristal único de LAP apresenta uma altura de 0,92nm e um diâmetro de 25 nm, sendo este menor que o de argilas naturais. Outra característica que difere das argilas é o tamanho médio das partículas, uma vez que a argila natural

apresenta maiores variações e a LAP, devido ao processo de fabricação, apresenta um tamanho da partícula relativamente uniforme (AVERY; RAMSAY, 1986).

A superfície dos discos da LAP possui cargas negativas em sua superfície e cargas positivas em sua borda gerando complexas interações entre partículas que fazem com que as suspensões aquosas de laponita sejam o objeto de intensa investigação (RUZICKA; ZACCARELLI, 2011).

A LAP apresenta características, tais como, biocompatibilidade, elevada pureza, boa dispersão em água, atoxicidade, possibilidade de interações com polímeros e pode agir como modificador de reologia após ser adicionada a produtos à base de água (JOSHI et al., 2008; LI et al., 2018; THOMPSON; BUTTERWORTH, 1992; TOMÁS; ALVES; RODRIGUES, 2018).

Dávila e Ávila (2017) apresentaram um estudo de LAP como modificador reológico em soluções de Alginato. Segundo Dawson e Oreffo (2013), a mistura de LAP com materiais poliméricos apresenta melhorias das propriedades mecânicas e biológicas do material final.

Estudos recentes apresentam a utilização da LAP na área da medicina, tal como hidrogéis de laponita com metacrilato de gelatina que estimulam a adesão, proliferação e diferenciação celular (XAVIER et al., 2015), hidrogéis à base de LAP e Poli(ácido acrílico) como adesivos biocompatíveis (SHEN et al., 2014), hidrogel de LAP que facilita a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas (GAHARWAR et al., 2013) e obtenção de hidrogéis para a entrega de microambientes regenerativos (DAWSON et al., 2011).

Recentemente, foram reportadas estruturas 3D com alta fidelidade para material interno de scaffolds (JIN et al., 2017).

## 2. OBJETIVOS:

### Objetivo geral

O objetivo principal do projeto foi o desenvolvimento de uma bioimpressora 3D e a obtenção de hidrogéis de Goma Gelana e Laponita, visando a fabricação de protótipos tridimensionais para aplicações em engenharia tecidual.

### Objetivos específicos:

- Montagem da impressora 3D FDM.
- Teste da impressora 3D utilizando filamentos comerciais (PLA e ABS),
- Desenvolvimento e instalação de um novo cabeçote na impressora 3D para a impressão de hidrogéis.
- Preparação e caracterização de hidrogéis a base de Laponita / Goma Gelana,
- Validação da bioimpressora 3D desenvolvida utilizando hidrogéis obtidos como material de bioimpressão.
- Impressão de protótipos tridimensionais utilizando a impressora desenvolvida e caracterização.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

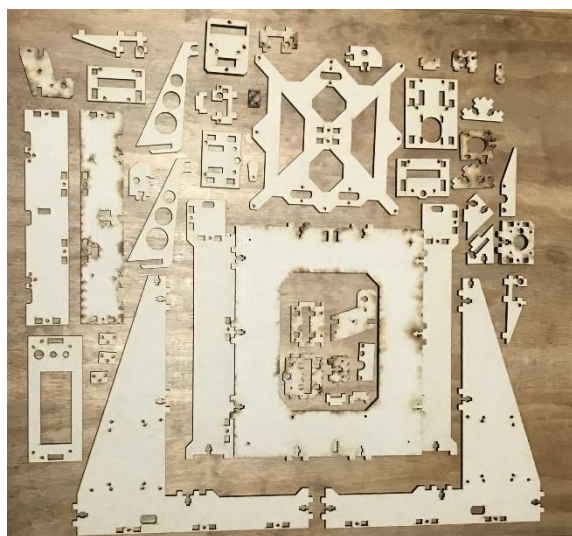
#### 3.1. Bioimpressora

Foi realizada a montagem de uma impressora 3D do tipo FDM, baseada no projeto RepRap Prusa I3 (REPRAP, 2019). Para a montagem da impressora foram utilizados os seguintes dispositivos: motores de passo (Nema 17) para movimentos no eixo X,Y e Z e extrusão do material; uma fonte chaveada de 12V e 20 A para alimentação dos motores e eletrônicos; sensores de temperatura (K); sensores de fim de curso (Switch); resistência do cabeçote de extrusão (Hotend); mesa aquecida Pcb Mk2b Dual Power, com dimensões de 214 mm x 214 mm e um vidro com as mesmas dimensões e o microcontrolador Arduino Mega 2560 para realizar o controle de rotação dos motores (eixos e extrusão). O Arduino utilizado possui 14 pinos de entrada e saída, um conector de alimentação, um cristal oscilador de 16 MHz, 6 entradas analógicas, uma conexão USB, um botão de reiniciar e um cabeçalho ICSP. Para seu funcionamento é necessária uma tensão de 5 V (ARDUINO, 2016). A programação para o funcionamento da impressora foi desenvolvida na plataforma do software do Arduino (IDE).

Para montagem da impressora, usou-se uma estrutura de placa de fibra de média densidade (MDF), conforme a figura 10.

**Figura 10:** Montagem da impressora: a) Estruturas em MDF utilizados para montagem b) Impressora montada.

a)



b)



Fonte: Própria

Os softwares Repetier-Host, utilizado para adicionar e posicionar os arquivos .STL e Slic3r que realiza o fatiamento do modelo 3D em fatias horizontais, obtendo as coordenadas que serão preenchidas. Em seguida foi realizada configurações para impressão de materiais em ABS e PLA, tais como, altura da mesa, tamanho da mesa, tipo de preenchimento, temperatura da extrusora, temperatura da mesa aquecida, fatiamento e velocidade. Após a montagem, para validação do cabeçote de impressão, foram impressos alguns objetos tridimensionais utilizando ABS e PLA da empresa Boa Impressão 3D LTDA, como pode ser observado na figura11.



**Figura 11:** Materiais tridimensionais impressos: (a) modelo de orelha (ABS); (b) troféu de participação do ENBIOCEL (PLA); (c) início de impressão do cabeçote da bioimpressora (ABS); (d) engrenagem para motor nema17 (PLA); (e) *Tyrannosaurus rex* (PLA); (f) exposição de itens impressos com impressora 3D montada.

(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



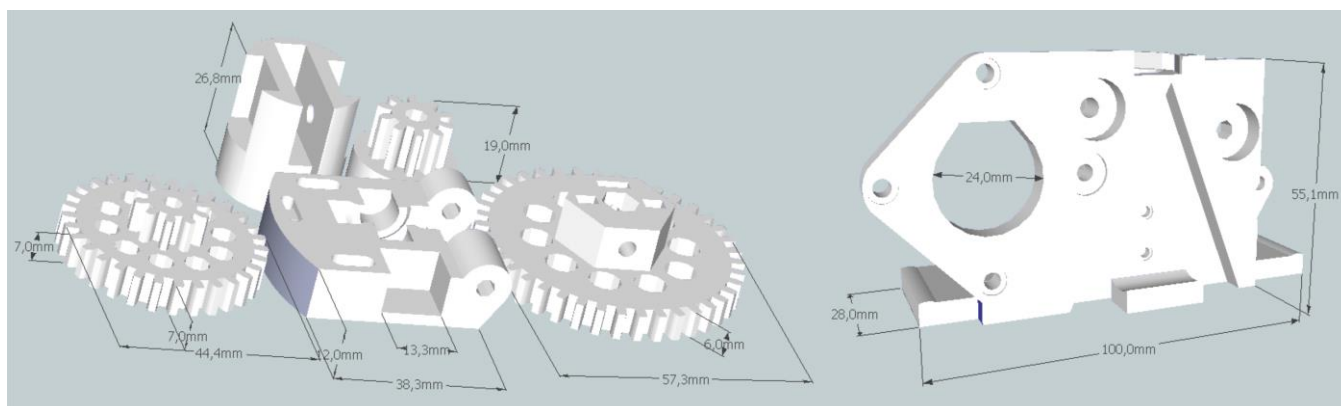
(f)



Fonte: Própria

Com a impressora 3D montada, foi projetado um cabeçote de microextrusão por pistão (Figura 12), utilizando o software SketchUp, para adaptação na impressora 3D do modelo RepRap Prusa i3.

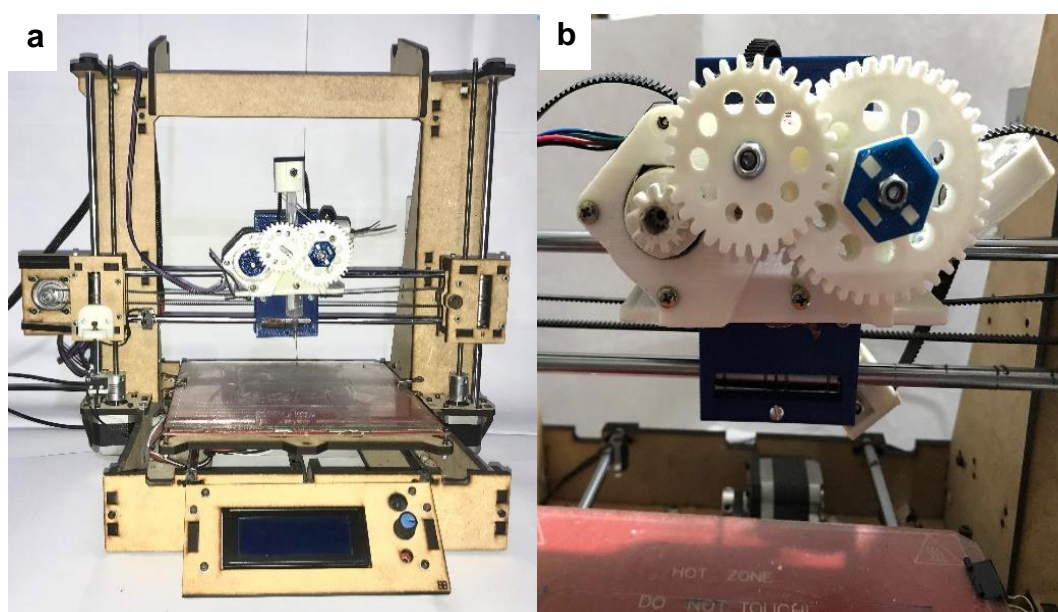
**Figura 12:** Visão isométrica do projeto do cabeçote de microextrusão desenvolvido



Fonte: Própria

O arquivo desenvolvido em CAD foi convertido para o formato .STL e impresso por uma impressora 3D pelo método FDM utilizando filamento de ABS. A figura 13 mostra a bioimpressora de microextrusão por pistão desenvolvida. A bioimpressora é de fácil configuração e manuseio podendo-se trocar o cabeçote de maneira prática e rápida o cabeçote da bioimpressora de microextrusão para na técnica de FDM. Uma vez instalado o cabeçote de bioimpressão, para a impressão de hidrogéis produzidos, foi realizada a alteração da configuração no software Repetier-Host, onde foi desligado a temperatura da mesa aquecida e eixos (X, Y e Z) afim de iniciar no centro da mesa.

**Figura 13:** Bioimpressora desenvolvida: (a) visão inteira; (b) visão ampliada do cabeçote



Fonte: Própria

### 3.2. Aplicação dos Hidrogéis

#### 3.2.1. Preparação dos hidrogéis compósitos baseados em goma gelana e laponita.

A laponita utilizada neste trabalho foi adquirida da empresa Buntech e a goma gelana tipo KELCOGEL CG-LA da CP Kelco Brasil S/A.

Devido a estudos preliminares foram preparados amostras de hidrogéis variando a proporção de GG e LAP a 3% m/v. A laponita foi dispersa em 10 mL de água destilada em um intervalo de 20 a 30 segundos, usando um agitador magnético, em aproximadamente 20 minutos obteve-se uma solução incolor e clara. Após a dispersão da laponita, foi adicionada gradualmente a goma gelana em intervalos de 20 a 30 segundos, a uma temperatura 60°C, sob agitação constante até se obter uma solução homogênea.

Os hidrogéis GG/LAP foram preparados usando diferentes quantidades de laponita e goma gelana, como pode ser observado na tabela abaixo (Tabela 2).

**Tabela 2:** Formulações de hidrogéis de LAP e GG.

<b>Amostras</b>	<b>Goma gelana (% m/v)</b>	<b>Laponita (% m/v)</b>
GOMA GELANA PURA	3	0
GG/LAP 90/10	2,7	0,3
GG/LAP 50/50	1,5	1,5
GG/LAP 10/90	0,3	2,7
LAPONITA PURA	0	3

Fonte: Própria

Parte dos hidrogéis preparados foi congelada em uma temperatura de -35°C durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram liofilizadas por 48 horas utilizando o liofilizador Liotop da empresa Liobras, seguindo o protocolo do laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (Lab-BioPolMat) da Universidade de Araraquara (UNIARA).

### 3.3. Técnicas empregadas na caracterização dos materiais.

#### 3.3.1. *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

O microscópio eletrônico de varredura permite a análise dos relevos da amostra ao mesmo tempo em foco, oferecendo imagens tridimensionais com alta profundidade de foco, e nitidez (GONÇALVES, 2007).

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM 6510 alocado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Instrumentação/ São Carlos- São Paulo), operando na faixa de tensão de 10 kV. As amostras foram fixadas com fita de carbono e cobertas com uma camada de ouro.

#### 3.3.2. *Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (FTIR)*

A espectroscopia de infravermelho é uma das principais técnicas utilizadas para caracterização de polímeros, onde é possível obter dados de alta resolução espectral em uma ampla faixa espectral (GRIFFITHS, PETER R.; DE HASETH, 2007).

As amostras foram caracterizadas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) utilizando o espectrômetro Cary 630 (Agilent) instalado no laboratório Quimera da Universidade de Araraquara (UNIARA), utilizando o método *Attenuated Total Reflectance* (ATR) com um acúmulo de 60 varreduras e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , na faixa de absorção de 4500-500  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.3.3. *Análise Termogravimétrica (TGA)*

É uma das técnicas de análise térmica existente, onde se possibilita analisar diante de um aquecimento em relação ao tempo, as alterações na massa da amostra (MATOS, J. R; MACHADO, 2007).

Foram realizadas análises termogravimétricas (TGA) utilizando o equipamento TA SDT Q600 localizado no laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (Lab-BioPolMat) da Universidade de Araraquara (UNIARA). A análises foram obtidas entre 25 a 600 ° C sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de 100mL  $\text{min}^{-1}$  e taxa de aquecimento de 10 °C  $\text{min}^{-1}$ .

#### 3.3.4. *Reometria de placas paralelas*

Para observar o comportamento dos hidrogéis se seu comportamento é pseudoplástico, uma curva de viscosidade é traçada em função da taxa de cisalhamento.

Foram realizadas análises do comportamento reológico dos hidrogéis preparados utilizando um Reômetro rotacional de placa paralela, modelo AR1500EX. Os testes foram conduzidos usando uma placa jateada com 40 mm de diâmetro a 25°C. Os testes de varredura de amplitude foram realizados em uma frequência angular de 10 rad.s<sup>-1</sup>.

#### 3.3.5. *Difração de Raio X (DRX)*

Técnica utilizada para definir a cristalinidade dos materiais, ligações químicas, sua desordem e outras informações, devido a densidade de elétrons dentro de um cristal, onde átomos cristalinos gera um feixe de raio X e difrata em específicas direções. Com isso é possível juntamente com tabelas, determinar a composição química do cristal. (EWALD, 1999).

Os difratogramas de raios X (DRX) das amostras foram obtidos em um equipamento da Siemens® 246 – Modelo D5000, utilizando radiação CuK $\alpha$  (1,541 Å), varrendo a faixa de 2 $\Theta$  entre 2,8 - 50° e um passo de 0,02°/seg.

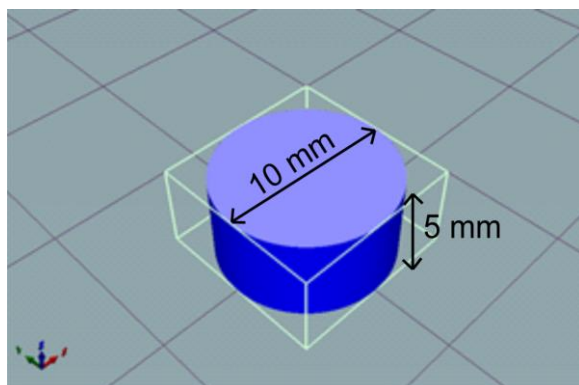
#### 3.3.6. *Bioimpressão*

Para realizar a bioimpressão utilizando os hidrogéis desenvolvidos de GG e LAP, foi utilizada a bioimpressora desenvolvida, como descrito anteriormente. Os softwares Repetier-Host e Slic3r foram utilizados para ajustar as configurações de eixos, fatiamento, passo, tamanho da mesa, velocidade de impressão e temperatura da mesa. Para impressão do scaffolds, foi projetado um cilindro no software Repetier-Host e utilizada a configuração criada com preenchimento de 20%, altura da camada de 0,1 mm.

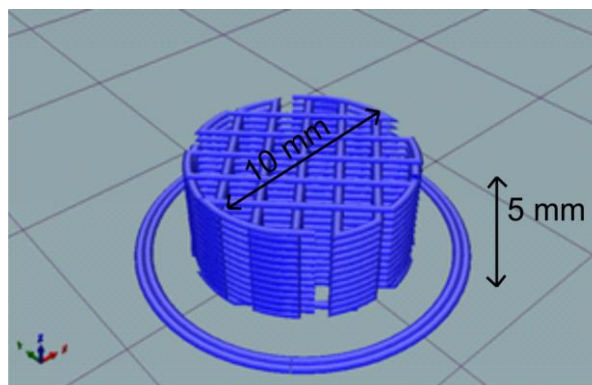
A temperatura utilizada na mesa foi a ambiente (24°C), a velocidade de impressão foi de 15 mm/s e o preenchimento de 20%. Foi utilizada uma seringa de 10 mL (bico Luerlock) e agulha descartável 25x0,7 da marca BD.

**Figura 14** - Fatiamento para impressão (scaffold com 12 camadas)

Objeto antes do fatiamento



Objeto após fatiamento



Fonte: Própria

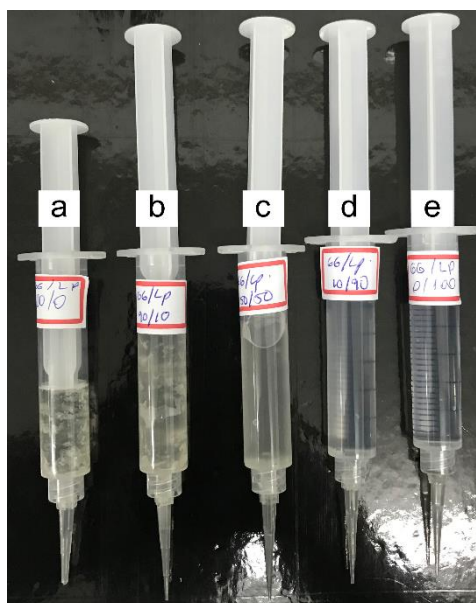
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseado nos crescentes estudos envolvendo a GG e a LAP como biomateriais, observou uma oportunidade para o desenvolvimento de hidrogéis para aplicação na medicina utilizando a bioimpressão como ferramenta.

O interesse na obtenção de hidrogéis de GG e LAP é aproveitar a semelhança estrutural com glicosaminoglicanos da matriz celular da GG e em relação a LAP a capacidade de dispersão estável e principalmente a modificação da reologia do hidrogel, sendo capaz de encontrar o hidrogel ideal para bioimpressão.

A figura 15 apresenta a fotografia dos hidrogéis GGLAP obtidos. Os hidrogéis apresentaram-se homogêneos e transparentes em todas as formulações

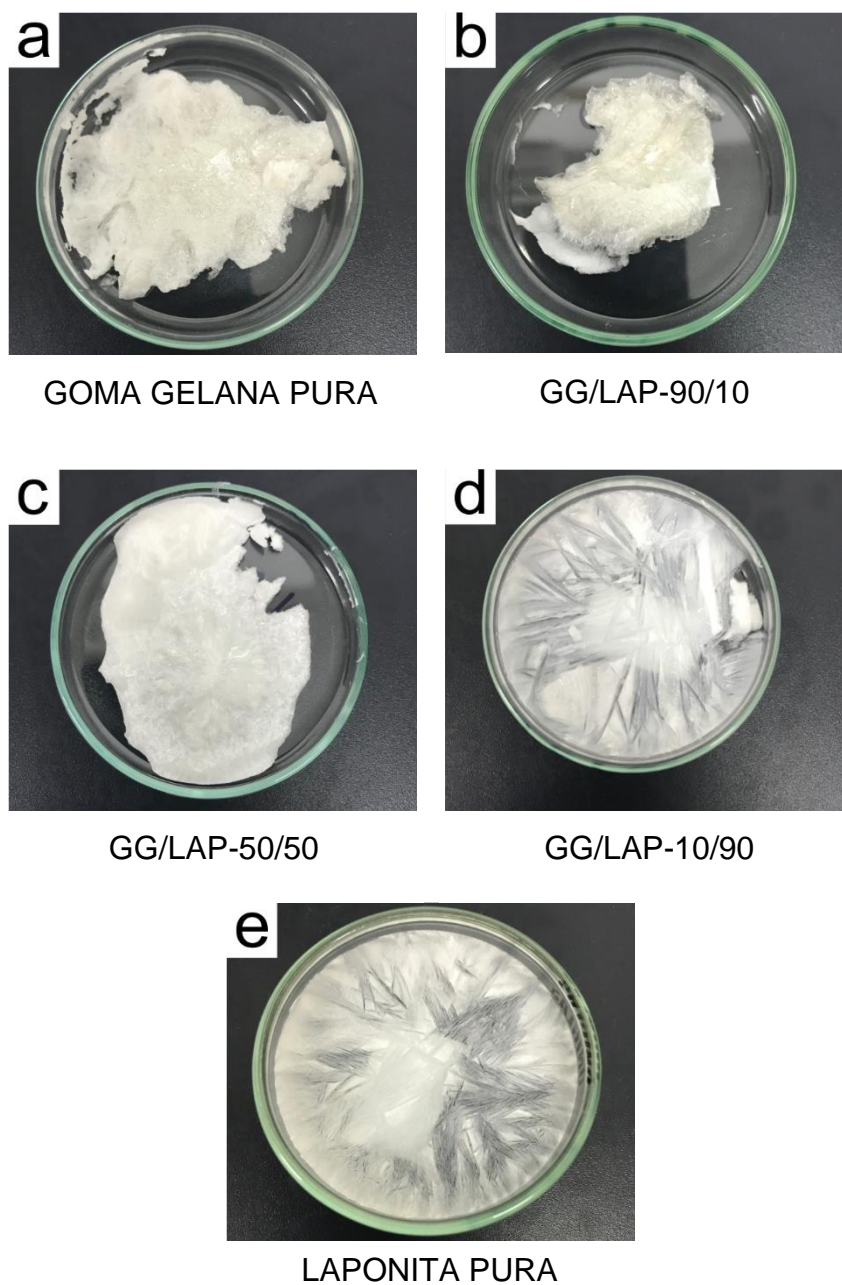
**Figura 15:** Amostra de hidrogéis (a) GOMA GELANA PURA, (b) GG/LAP-90/10, (c) GG/LAP-50/50, (d) GG/LAP-10/90, (e) LAPONITA PURA



Fonte: Própria

Com o intuito de facilitar as caracterizações morfológicas, estruturais e térmicas dos hidrogéis compósitos, os mesmos foram liofilizados. A figura 16(a-e) apresenta fotografias das amostras após o processo de liofilização.

**Figura 16:** Hidrogéis liofilizados (a) GOMA GELANA PURA, (b) GG/LAP-90/10, (c) GG/LAP-50/50, (d) GG/LAP-10/90, (e) LAPONITA PURA.



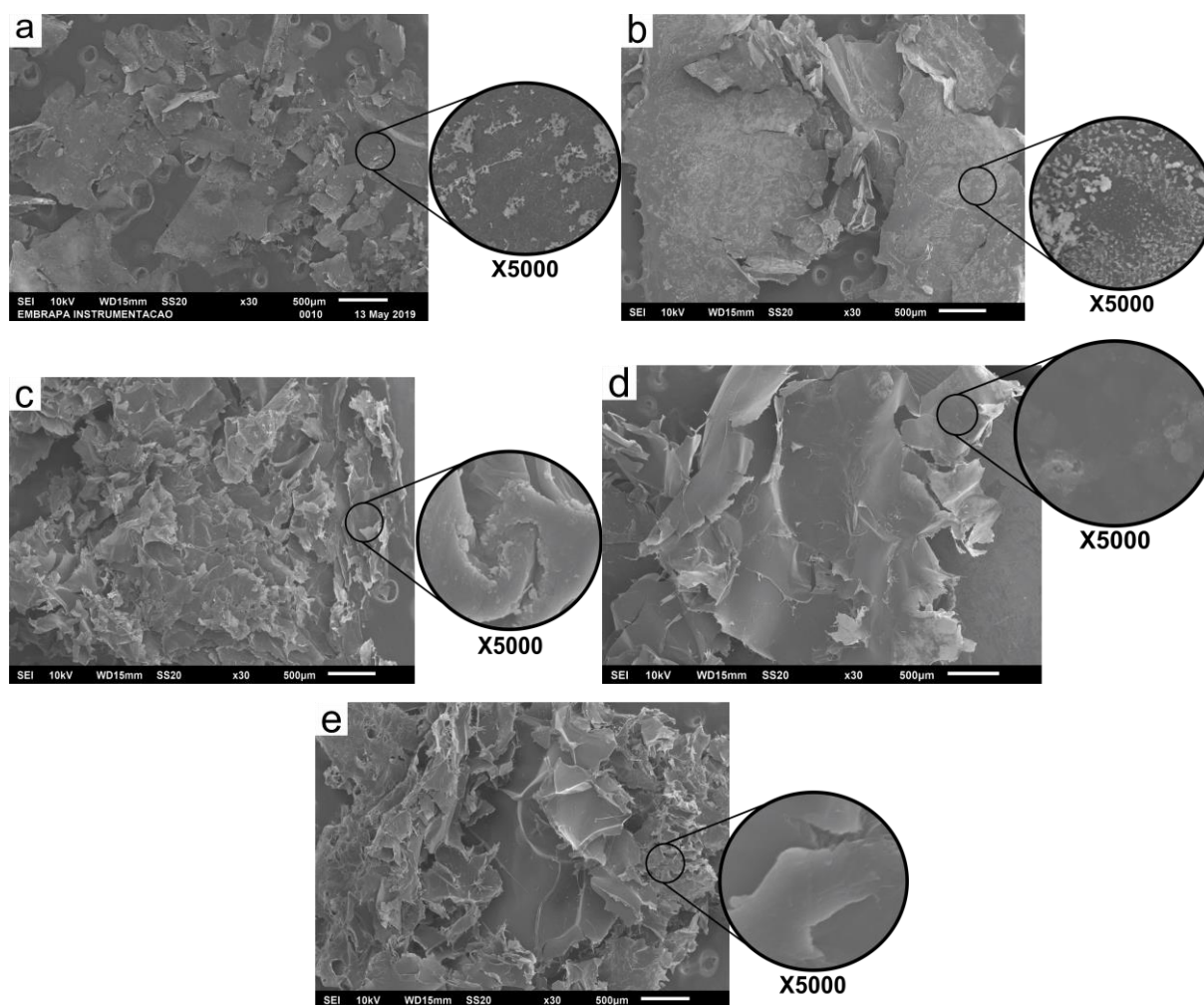
Fonte: Própria

A figura 17 apresenta imagens de MEV dos compósitos GG/LAP. Na figura 17a observa-se uma estrutura compacta da amostra de laponita pura e presença de pequenos agregados. Nas micrografias das amostras que contem GG e LAP (figuras 17b-e), observa-se uma estrutura mais porosa e uma boa dispersão da laponita nos hidrogéis compósitos. Resultados semelhantes foram observados por Pacelli et al. (2016)



que relatou a preparação de hidrogéis nanocompósitos baseados em metacrilato, goma gelana e laponita para aplicações em liberação de fármacos.

**Figura 17:** Imagens de MEV dos hidrogéis: (a) LAPONITA PURA, (b) GG/LAP-10/90, (c) GG/LAP-50/50, (d) GG/LAP-90/10, (e) GOMA GELANA PURA.



Fonte: Própria

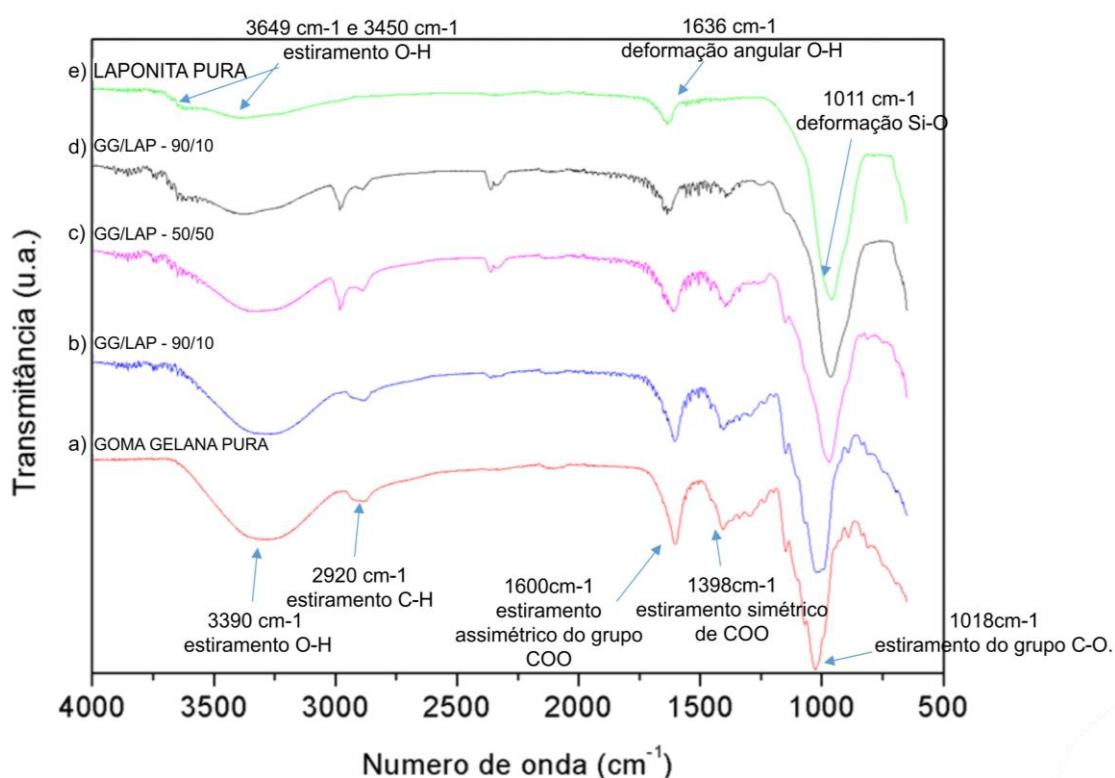
A Figura 18 apresenta os espectros de espectroscopia vibracional na região do infravermelho dos compósitos GG/LAP, Laponita pura e Goma Gelana pura liofilizadas.

Os principais atributos que caracterizam a amostra de GG pura (figura 18a) aparecem no espectro em  $3390\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento O-H dos grupos hidroxilas, em  $2920\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento C-H, em  $1600\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento assimétrico do grupo  $\text{COO}^-$ , em  $1398\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento simétrico de  $\text{COO}^-$ , em  $1018\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento do grupo C-O (BACELAR et al., 2016).

O espectro da amostra de laponita pura apresenta bandas vibracionais características em  $3649\text{ cm}^{-1}$  e  $3450\text{ cm}^{-1}$  (estiramento O-H da rede),  $1636\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular O-H) e  $1011\text{ cm}^{-1}$  (deformação Si-O) (CAI et al., 2016).

Com relação às amostras compósitas, figura 18 (b-d), os espectros revelaram que não houve o surgimento de nenhuma nova banda, e que os espectros são formados basicamente pelo somatório das bandas presentes na GG e laponita.

**Figura 18:** Espectrometria na região do infravermelho: a) GOMA GELANA PURA, b) GG/LAP-90/10, c) GG/LAP-50/50, d) GG/LAP-90/10, e) LAPONITA PURA.



Fonte: Própria

A figura 19 apresenta as curvas TGA/DTG dos compósitos GG/LAP.

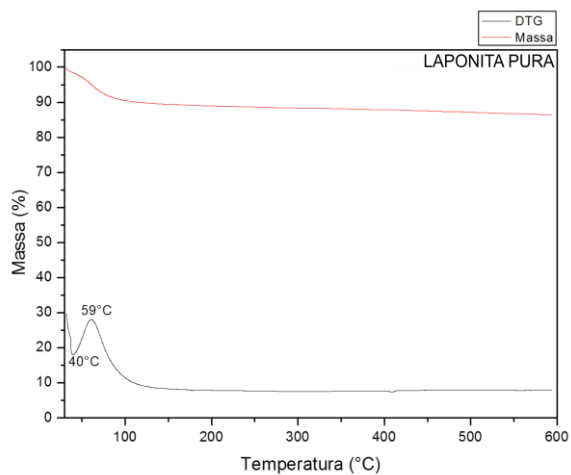
A curva da TG da GG (Fig. 19a) apresenta uma perda de massa de aproximadamente 10% na faixa de temperatura entre  $35\text{--}100^\circ\text{C}$ . Essa perda de massa é confirmada por um evento endotérmico observado na curva DSC, e pode ser atribuída à desidratação da GG, como, por exemplo, evaporação de água adsorvida. Um evento bem acentuado com grande perda de massa é observado na faixa de temperatura que compreende o intervalo de  $200^\circ\text{C}$  a  $300^\circ\text{C}$ , e com máximo em  $245^\circ\text{C}$  como demonstrado na curva DTG, o qual está relacionado a processos de degradação da GG como despolimerização.

A curva da TGA da GG (Fig. 19e) apresenta uma perda de massa de aproximadamente 10% na faixa de temperatura entre 35-100°C. Um evento bem acentuado de perda de massa é observado na faixa de temperatura que compreende o intervalo de 200°C a 300°C, com máximo em 245°C como demonstrado na curva DTG.

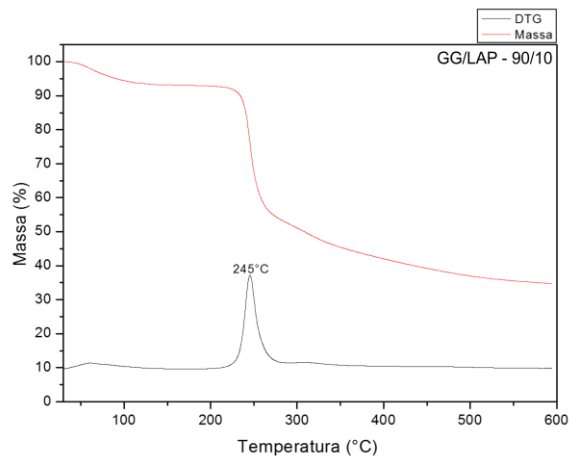
Para os compósitos, observam dois eventos principais. Um entre 35-150°C com perda de massa de aproximadamente 7 % correspondente a evaporação de água de superfície. Na faixa de temperatura entre 200°C a 300°C observa-se uma perda de massa acentuada referente a decomposição da GG. De maneira geral, não houve mudança na estabilidade térmica da GG com a presença de laponita, apenas para a amostra que contém maior proporção de laponita, onde observa-se um significativo aumento da estabilidade térmica, com aumento da temperatura de degradação de 245°C para 280°C. Além disso, as curvas TGA apresentam diferença no resíduo, que como esperado, aumenta com o aumento da concentração de laponita e corrobora com os valores estabelecidos na preparação das amostras, como pode ser observado na tabela 3.

**Figura 19:** TGA dos hidrogéis - (a) LAPONITA PURA, (b) GG/LAP- 10/90, (c) GG/LAP- 50/50, (d) GG/LAP- 90/10, (e) GOMA GELANA PURA.

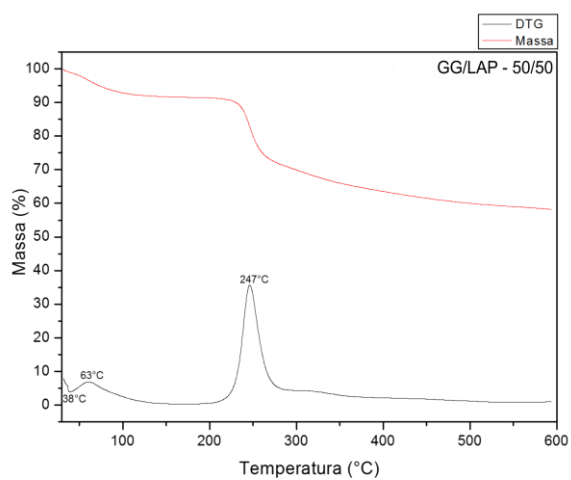
(a)



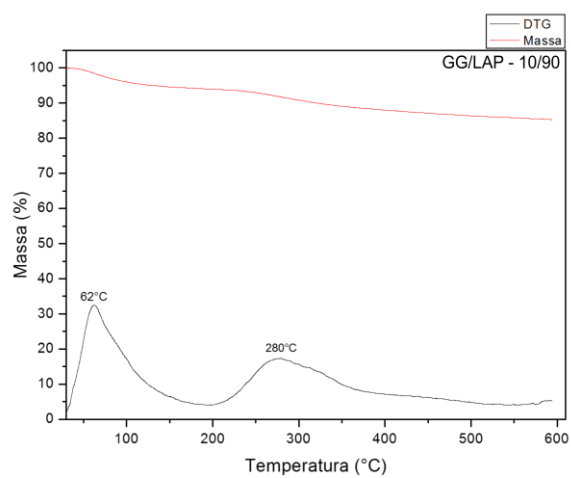
(b)



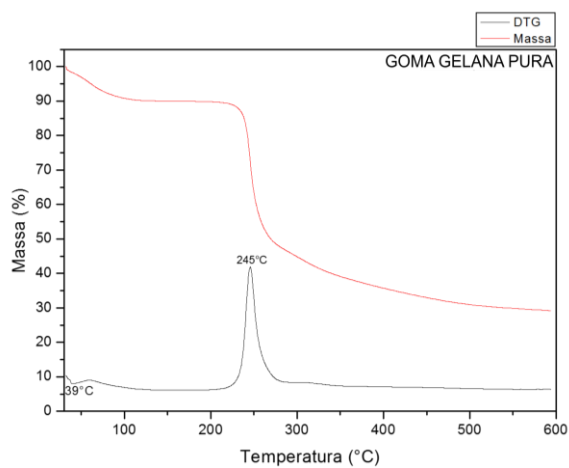
(c)



(d)



(e)



Fonte: Própria

**Tabela 3:** Dados das curvas TGA dos hidrogéis laponita pura, GG/LAP 90/10, GG/LAP 50/50, GG/LAP 10/90, goma gelana pura

<b>Amostras</b>	<b>Tmax (°C)</b>	<b>Resíduo (%)</b>
Goma Gelana Pura	245	29
GG/LAP 90/10	245	35
GG/LAP 50/50	247	69
GG/LAP 10/90	280	85
Laponita Pura	-	89

Fonte: Própria

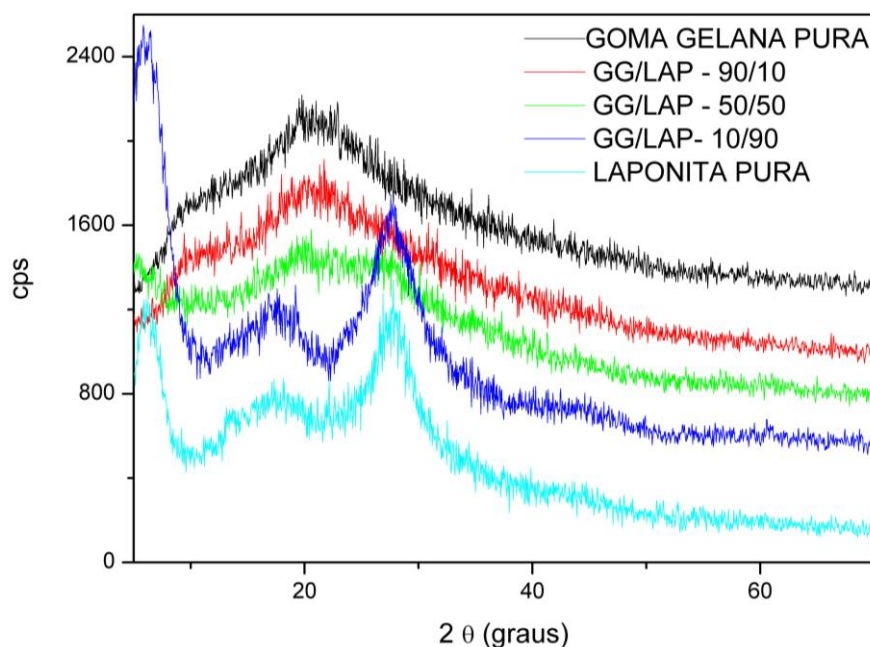
A figura 20 apresenta os difratogramas da GG, LAP e dos compósitos GG/LAP.

Na difratometria de Raio X da amostra de goma gelana pura pode ser observado um pico de menor intensidade em  $2\theta=21,80$  ( $d=0,141\text{nm}$ ) relacionado ao plano cristalográfico (200), refletindo o plano da unidade do polimanuronato, resultados semelhantes aos reportados por (SUNDARRAJAN et al., 2012).

O difratograma de raio-x da Laponita pura apresenta picos em  $2\theta = 6,04^\circ$ ,  $19,62^\circ$ ,  $34,53^\circ$  correspondentes as distâncias interplanares de 14.2, 4.50, 2.56 e 1.51 Å, e se referem aos planos basais 001, 110, 200 e 060, respectivamente (MAHDAVINIA et al., 2015).

Com o aumento da concentração de GG nas amostras com LAP, ocorre uma redução da cristalinidade da LAP e da GG, alterando a organização estrutural original levando assim a uma redução do espaçamento basal, podendo-se observar um alargamento e diminuição de intensidade do pico em  $21,80^\circ$ .

**Figura 20** - Difrátogramas de Raios-X das amostras GOMA GELANA PURA (preto), GG/LAP-90/10(vermelho), GG/LAP-50/50(verde), GG/LAP-10/90 (azul) e LAPONITA PURA (azul claro).



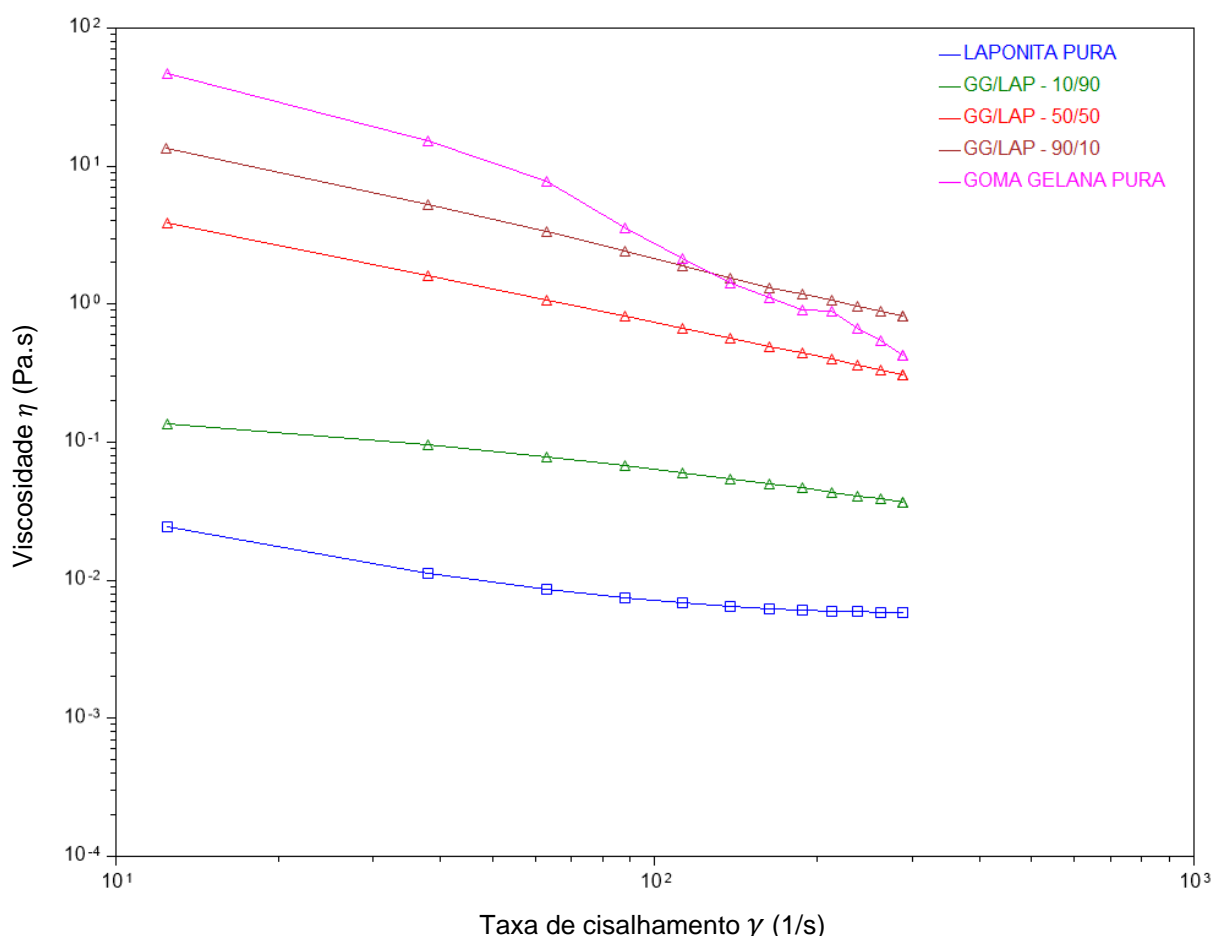
Fonte: Própria

Para o desenvolvimento dos hidrogéis com características ideais para bioimpressão 3D é fundamental a análise das propriedades reológicas do material. Com estudo da reologia é possível prever o comportamento do hidrogel ou biotinta no momento da bioimpressão (AKIRA; LUIS, 2018).

Para a bioimpressão do hidrogel, o mesmo deve possuir características tixotrópicas, apresentando um comportamento não newtoniano, onde quanto maior a tensão de estresse menor será sua viscosidade com tempo razoável de recuperação (DÁVILA; D'ÁVILA, 2017).

Com medidas de viscosidade de cisalhamento em estado estacionário foi possível avaliar a capacidade de impressão dos hidrogéis caracterizados, gerando um gráfico de viscosidade em função da taxa de cisalhamento, como pode ser observado na figura 21.

**Figura 21** - Viscosidade ( $\eta$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ): LAPONITA PURA, GG/LAP- 10/90, GG/LAP- 50/50, GG/LAP- 90/10, GOMA GELANA PURA.



Fonte: Própria

Os hidrogéis Laponita Pura e GG/LAP-10/90 apresentaram características newtonianas, apresentando características líquidas. Para os demais hidrogéis observa-se comportamento mais sólido dos hidrogéis, que estaria associado a reticulação física das cadeias poliméricas de GG entre as plaquetas da LAP (MIYOSHI; TAKAYA; NISHINARI, 1996). Nota-se também que a viscosidade das amostras diminui com a adição LAP ( tabela 4), conforme já reportado por Adrover et al.(2019).

Foram analisadas as curvas de viscosidade utilizando o modelo de Ostwald (1913) onde  $n$  é o índice da lei de potência, definindo o comportamento da viscosidade e o  $m$  é o índice de consistência que está relacionada à grandeza da viscosidade. Sendo assim Morrison (2001) definiu os seguintes termos: se  $n > 1$  é dilatante, se  $n = 1$  é newtoniano e para ser pseudoplástico  $n < 1$ .

**Tabela 4** - Parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade Ostwald-de Waele

<b>Amostras</b>	<b><math>m</math> (Pa.s<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>n</math> (-)</b>	<b><math>R^2</math></b>
Goma Gelana Pura	3364,15	-1,555	0,9829
GG/LAP 90/10	136,059	-0,904	0,9993
GG/LAP 50/50	30,063	-0,806	0,9999
GG/LAP 10/90	0,4093	-0,426	0,9999
Laponita Pura	0,0588	1,323	0,9997

Fonte: Própria

Observa-se que na tabela 4 o índice de consistência ( $m$ ) diminui significativamente com a adição de LAP, sendo assim a LAP está relacionada diretamente a modificação reológica do hidrogel, modificando o material e o deixando menos viscoso. Os hidrogéis GG/LAP 90/10 e GG/LAP 50/50 apresentaram propriedades satisfatórias para aplicação em bioimpressoras 3D do modelo de microextrusão, visto em estudo de Bakarich et al. (2014) que apresenta índices de  $m$  na faixa de 20 a 150 Pa.s<sup>-1</sup> (BAKARICH et al., 2014).

Para analisar a processabilidade dos hidrogéis, as soluções foram carregadas na seringa a 40°C. A concentração de GG pura resultou uma solução altamente viscosa e causou entupimento da agulha da seringa. Uma alta viscosidade impede a formação de filamento para a impressão. Entretanto, quando a concentração de GG é muito baixa, ocorre uma diminuição na viscosidade que não permite a formação de um filamento ideal para bioimpressão. Da mesma forma, o hidrogel de LAP Pura mostrou-se pouco viscoso, não sendo capaz de formar um filamento no decorrer da impressão (MALDA et al., 2013).

A adição da LAP nos hidrogéis de GG induz uma diminuição da viscosidade, onde a LAP interage com as cadeias de GG, diminuindo a reticulação física das cadeias poliméricas de GG e causando a formação de um gel menos rígido (PACELLI et al., 2018).

Para se ter uma qualidade de impressão, deve-se optar a utilizar materiais que exibem uma relação linear entre viscosidade e taxa de cisalhamento. Deste modo, é fundamental encontrar relações entre viscosidade, tixotropia, taxas de cisalhamento e a velocidade de impressão (RUZICKA; ZACCARELLI, 2011).

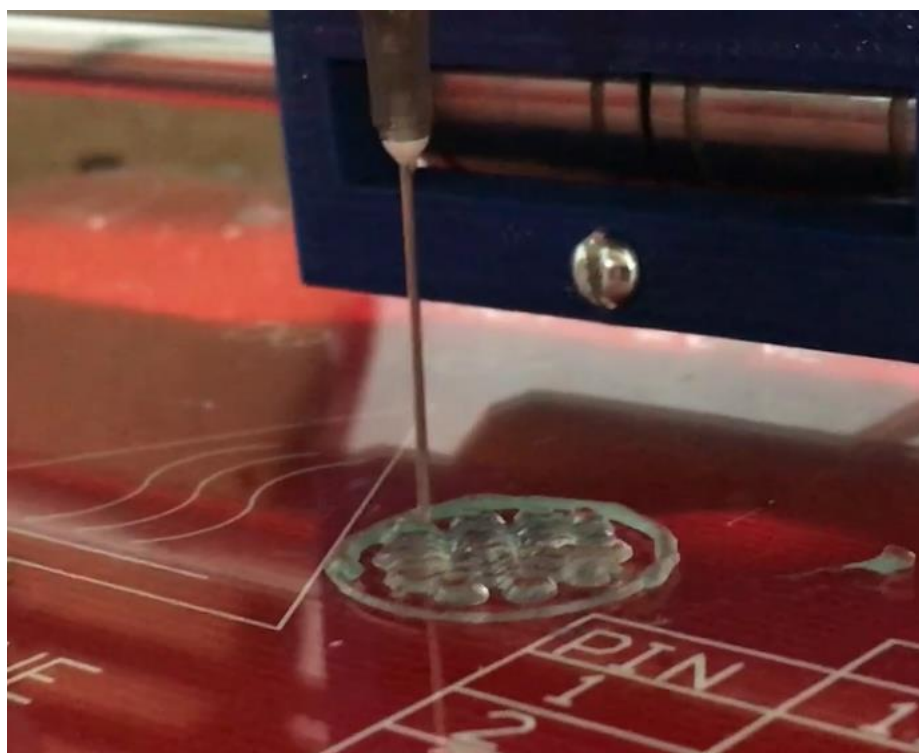
Utilizando o cabeçote de microextrusão por pistão desenvolvido nesse trabalho foram selecionados os hidrogéis seguindo os dados mostrados pela reologia, onde observou-se que os hidrogéis GG/LAP-90/10 e GG/LAP-50/50, possuem características



ideias para bioimpressão 3D, conforme a tabela dos parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade dos estudos de Ostwald-de Waele Bakarich et al. (BAKARICH et al., 2014; OSTWALD, 1913).

Para validação dos hidrogéis e da bioimpressora, visando possíveis aplicações em engenharia tecidual, foi realizada a impressão de um *scaffold*, sem a utilização de um reticulante, para avaliar se a estrutura sofreria colapso. O *scaffold* foi projetado na forma de um cilindro, com o diâmetro de 10,75 mm e espessura de 5 mm, e fatiado com o software Slic3r, com a configuração apresentada previamente pelo autor (Fig.22). A amostra GG/LAP-50/50, ao ser impressa, colapsou no meio da impressão. O *scaffold* impresso utilizando o hidrogel GG/LAP-90/10 (figura 22) demonstrou estabilidade estrutural semelhante a hidrogéis de diversos compósitos aos que vem sendo relatados na literatura (LEPPINIEMI et al., 2017; MOUSER et al., 2016; TALLIA, 2016; WU et al., 2018).

**Figura 22:** Impresso em impressora *home made* usando cabeçote de microextrusão



Fonte: Própria

## 5. CONCLUSÃO

A bioimpressão 3D tem ganho uma grande atenção dos pesquisadores e sua tecnologia tem gerado grande expectativa nos resultados de pesquisa para a aplicação na engenharia de tecidual e na medicina regenerativa. Entretanto, para uma melhor difusão da tecnologia é necessário que as bioimpressoras sejam acessíveis para pesquisadores e universidades.

Neste trabalho, uma bioimpressora 3D foi projetada e construída utilizando o processo de microextrusão por pistão através da adaptação de uma impressora comercial FDM.

Hidrogéis compósitos baseados em goma de gelana e laponita foram desenvolvidos. As análises morfológicas e estruturais dos hidrogéis comprovaram a formação dos compósitos, nos quais a laponita encontrou-se homoganeamente dispersa na matriz de GG.

As análises reológicas mostraram hidrogéis menos rígidos com a adição da LAP nos géis de GG, além de apresentarem resultados que demonstram quais hidrogéis são ideais para a bioimpressão 3D. A bioimpressora construída demonstrou-se uma opção versátil, de baixo custo em comparação com as disponíveis no mercado e uma tecnologia capaz de atender ambientes acadêmicos e de pesquisa. Os testes iniciais de impressão dos hidrogéis preparados demonstram a potencialidade de ambos, bioimpressora e hidrogéis GG/LAP para a fabricação de protótipos tridimensionais para estudos na área de biomedicina e engenharia tecidual. No geral, esses resultados ampliam o possível uso de GG-LAP como um biomaterial. Além disso, o trabalho abre uma janela de oportunidades para o estudo mais amplo da obtenção de hidrogéis e biotintas utilizando o sistema GG/LAP, assim como o estudo de outros hidrogéis produzidos em nosso grupo na área de bioimpressão e engenharia tecidual.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADROVER, A. et al. Gellan gum/laponite beads for the modified release of drugs: Experimental and modeling study of gastrointestinal release. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, 2019.

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

AKIRA, M.; LUIS, D. Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, 2018.

ARDUINO. **No Title**. Disponível em: <<http://www.arduino.cc>>. Acesso em: 15 maio. 2018.

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

BACELAR, A. H. et al. Recent progress in gellan gum hydrogels provided by functionalization strategies. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 37, p. 6164–6174, 2016.

BAKARICH, S. E. et al. Three-dimensional printing fiber reinforced hydrogel composites. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 18, p. 15998–16006, 2014.

BARRON, J. A. et al. Application of laser printing to mammalian cells. **Thin Solid Films**, v. 453–454, p. 383–387, 2004.

BARRON, J. A.; SPARGO, B. J.; RINGEISEN, B. R. Biological laser printing of three dimensional cellular structures. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, v. 79, n. 4–6, p. 1027–1030, 2004.

BERTASSONI, L. E. et al. Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels. **Biofabrication**, v. 6, n. 2, 2014.

BILLIET, T. et al. The 3D printing of gelatin methacrylamide cell-laden tissue-engineered constructs with high cell viability. **Biomaterials**, v. 35, n. 1, p. 49–62, 2014.

BOERE, K. W. M. et al. Biofabrication of reinforced 3D-scaffolds using two-component hydrogels. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 46, p. 9067–9078, 2015.

BOHANDY, J.; KIM, B. F.; ADRIAN, F. J. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. **Journal of Applied Physics**, v. 60, n. 4, p. 1538–1539, 1986.

BRODSKY, J. L.; ANDREWS, D. W. Ac ce pte d M us cri pt Ac ce pte d M us pt. 2011.

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

CABRAL, J.; MORATTI, S. C. Hydrogels for biomedical applications. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 15, p. 1877–1888, 2011.

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

CAMPBELL, P. G. et al. Engineered spatial patterns of FGF-2 immobilized on fibrin direct cell organization \$. v. 26, p. 6762–6770, 2005.

CHRISEY, D. B. The power of direct writing. **Science**, v. 289, n. 5481, p. 879–881, 2000.

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

COUTINHO, D. F. et al. Modified Gellan Gum hydrogels with tunable physical and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 31, n. 29, p. 7494–7502, 2010.

COX, S. C. et al. 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 47, p. 237–247, 2015.

CUI, X. et al. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. **Tissue Engineering - Part A**, v. 18, n. 11–12, p. 1304–1312, 2012.

DASH, M. et al. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

DATTA, P. et al. Bone tissue bioprinting for craniofacial reconstruction. **Biotechnology**

**and Bioengineering**, v. 114, n. 11, p. 2424–2431, 2017.

DÁVILA, J. L.; D'ÁVILA, M. A. Laponite as a rheology modifier of alginate solutions: Physical gelation and aging evolution. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1–8, 2017.

DAWSON, J. I. et al. Clay gels for the delivery of regenerative microenvironments. **Advanced Materials**, v. 23, n. 29, p. 3304–3308, 2011.

DAWSON, J. I.; OREFFO, R. O. C. Clay: New opportunities for tissue regeneration and biomaterial design. **Advanced Materials**, v. 25, n. 30, p. 4069–4086, 2013.

DE COPPI, P. et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 100–106, 2007.

DEMIRCI, U.; MONTESANO, G. Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 9, p. 1139–1145, 2007.

DEMIRTAŞ, T. T.; IRMAK, G.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, 2017.

DHARIWALA, B. et al. Rapid Prototyping of Tissue-Engineering Constructs , Using. **Rapid Prototyping of Constructs**, v. 10, n. 9, p. 1316–1322, 2004.

DINCA, V. et al. Directed three-dimensional patterning of self-assembled peptide fibrils. **Nano Letters**, v. 8, n. 2, p. 538–543, 2008.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337–4351, 2003.

DUAN, B. et al. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101 A, n. 5, p. 1255–1264, 2013.

EWALD, P. P. **The Principles of X-ray Diffraction**. Disponível em: <<https://www.iucr.org/publ/50yearsofxraydiffraction/full-text/principles>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

FANG, Y. et al. Rapid generation of multiplexed cell cocultures using acoustic droplet ejection followed by aqueous two-phase exclusion patterning. **Tissue Engineering - Part**

**C: Methods**, v. 18, n. 9, p. 647–657, 2012.

FERGUSON, R. E. H.; RINKER, B. The use of a hydrogel sealant on flexor tendon repairs to prevent adhesion formation. **Annals of Plastic Surgery**, v. 56, n. 1, p. 54–58, 2006.

GAHARWAR, A. K. et al. Bioactive silicate nanoplatelets for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Advanced Materials**, v. 25, n. 24, p. 3329–3336, 2013.

GALVIS, V. et al. Potential use of thermoreversible hydrogel (poloxamer 407) to protect the corneal endothelium and the posterior capsule during phacoemulsification. **Journal of Cataract and Refractive Surgery**, v. 45, n. 3, p. 389, 2019.

GAO, G. et al. Organ Bioprinting: Are We There Yet? **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2018.

GHOBRIL, C.; GRINSTAFF, M. W. The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: A tutorial. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 7, p. 1820–1835, 2015.

GIORDANO, R. A. et al. Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 8, n. 1, p. 63–75, 1997.

GOLDMANN, T.; GONZALEZ, J. S. DNA-printing: Utilization of a standard inkjet printer for the transfer of nucleic acids to solid supports. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 42, n. 3, p. 105–110, 2000.

GONG, J. P. Friction and lubrication of hydrogels - Its richness and complexity. **Soft Matter**, v. 2, n. 7, p. 544–552, 2006.

GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Gelation of gellan gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 7, n. 5, p. 371–393, 1987.

GRAY, E. et al. Estimation of nasal tip support using computer-aided design and 3-dimensional printed models. **JAMA Facial Plastic Surgery**, v. 18, n. 4, p. 285–291, 2016.

GRIFFITHS, PETER R.; DE HASETH, J. A. **Fourier transform infrared spectrometry**. 171. ed. [s.l: s.n.].

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

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

GUDAPATI, H.; DEY, M.; OZBOLAT, I. A comprehensive review on droplet-based bioprinting: Past, present and future. **Biomaterials**, v. 102, p. 20–42, 2016.

GUILLEMOT, F. et al. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2494–2500, 2010.

GUILLOTIN, B.; GUILLEMOT, F. Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 183–190, 2011.

GUNASEKERA, D. H. A. T. et al. Three dimensional ink-jet printing of biomaterials using ionic liquids and co-solvents. **Faraday Discussions**, v. 190, p. 509–523, 2016.

GUVENDIREN, M.; LU, H. D.; BURDICK, J. A. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. **Soft Matter**, v. 8, n. 2, p. 260–272, 2012.

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

HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 223–236, 2012.

HIGHLEY, C. B. **3D Bioprinting in Medicine**. [s.l: s.n.].

HOPP, B. et al. Survival and proliferative ability of various living cell types after laser-induced forward transfer. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 11–12, p. 1817–1823, 2005.

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

HUNT, N. C.; GROVER, L. M. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 6, p. 733–742, 2010.

JANSSON, P.-E.; LINDBERG, B.; SANDFORD, P. A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate**

**Research**, p. 135–139, 1983.

JEN, A. C.; WAKE, M. C.; MIKOS, A. G. Review: Hydrogels for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, n. 4, p. 357–364, 1996.

JIN, Y. et al. Self-Supporting Nanoclay as Internal Scaffold Material for Direct Printing of Soft Hydrogel Composite Structures in Air. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 20, p. 17456–17465, 2017.

JOSHI, Y. M. et al. Rheological behaviour of aqueous suspensions of laponite: New insights into the ageing phenomena. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 464, n. 2090, p. 469–489, 2008.

KAMALI, P. et al. The Current Role of Three-Dimensional Printing in Plastic Surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 137, n. 3, p. 1045–1055, 2016.

KERIQUEL, V. et al. In vivo bioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: Preliminary study in mice. **Biofabrication**, v. 2, n. 1, 2010.

KIM, J. E.; KIM, S. H.; JUNG, Y. Current status of three-dimensional printing inks for soft tissue regeneration. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 13, n. 6, p. 636–646, 2016.

KOCH, L. et al. Laser Printing of Skin Cells and Human Stem Cells. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 5, p. 847–854, 2010.

KOIVISTO, J. T. et al. Mechanically Biomimetic Gelatin-Gellan Gum Hydrogels for 3D Culture of Beating Human Cardiomyocytes. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 23, p. 20589–20602, 2019.

KOLESKY, D. B. et al. Three-dimensional bioprinting of thick vascularized tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 12, p. 3179–3184, 2016.

LEPPINIEMI, J. et al. 3D Printable Bioactivated Nanocellulose-Alginate Hydrogels. 2017.

LI, T. et al. Impact of bone marrow mesenchymal stem cell immunomodulation on the osteogenic effects of laponite. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–18, 2018.



MAHDAVINIA, G. R. et al. Synthesis and characterization of hydroxypropyl methylcellulose-g-poly(acrylamide)/LAPONITE® RD nanocomposites as novel magnetic- and pH-sensitive carriers for controlled drug release. **RSC Advances**, v. 5, n. 55, p. 44516–44523, 2015.

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

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

MATOS, J. R.; MACHADO, L. D. B. Técnicas de caracterização de polímeros. In: **Análise térmica - termogravimetria**. In: **CANEVALORO JUNIOR, S. V. Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: [s.n.]. p. 209–228.

MIRONOV, V. et al. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2164–2174, 2009.

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Rheological and thermal studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, n. 2–3, p. 109–119, 1996.

MORRISON, F. A. Understanding rheology. **Topics in Chemical Engineering**, 2001.

MOUSER, V. H. M. et al. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, p. 1–13, 2016.

MURPHY, R. et al. Degradable 3D-Printed Hydrogels Based on Star-Shaped Copolypeptides. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 7, p. 2691–2699, 2018.

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

NAKAMURA, M. et al. Biocompatible inkjet printing technique for designed seeding of individual living cells. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 11–12, p. 1658–1666, 2005.

NECHYPORCHUK, O. et al. Cellulose Nanofibril-Based Coatings of Woven Cotton

Fabrics for Improved Inkjet Printing with a Potential in E-Textile Manufacturing. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 6, p. 4793–4801, 2017.

NOOR, N. et al. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. **Advanced Science**, v. 6, n. 11, 2019.

NOROTTE, C. et al. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5910–5917, 2009.

O'NEILL, M. A.; SELVENDRAN, R. R.; MORRIS, V. J. Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, v. 124, n. 1, p. 123–133, 1983.

OKAMOTO, T.; SUZUKI, T.; YAMAMOTO, N. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using Bubble Jet technology. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 438–441, 2000.

OLIVEIRA, J. T. et al. Gellan gum: A new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 93, n. 3, p. 852–863, 2010.

ORÉFICE, RODRIGO LAMBERT; PEREIRA, MARIVALDA DE MAGALHÃES; MANSUR, H. S. *Biomateriais: fundamentos e aplicações*. 2006.

OSTWALD, W. ET AL. Colloids and their viscosity. **Transactions of the Faraday Society**, v. 91, n. 2264, p. 69, 1913.

OVIEDO, I. R. et al. Design of a physical and nontoxic crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 57, n. 12, p. 1095–1103, 2008.

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

OZBOLAT, I. T.; MONCAL, K. K.; GUDAPATI, H. Evaluation of bioprinter technologies. **Additive Manufacturing**, v. 13, p. 179–200, 2017.

PACELLI, S. et al. Injectable and photocross-linkable gels based on gellan gum methacrylate: A new tool for biomedical application. **International Journal of Biological**

**Macromolecules**, v. 72, p. 1335–1342, 2015.

PACELLI, S. et al. Gellan gum methacrylate and laponite as an innovative nanocomposite hydrogel for biomedical applications. **European Polymer Journal**, v. 77, p. 114–123, 2016.

PACELLI, S. et al. Design of a tunable nanocomposite double network hydrogel based on gellan gum for drug delivery applications. **European Polymer Journal**, v. 104, p. 184–193, 2018.

PATEL, N. R.; GOHIL, P. P. International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. **International Journal of Emerging Technology and Advancing Engineering**, v. 2, n. 4, p. 91–101, 2012.

PEREIRA, D. R. et al. Injectable gellan-gum/hydroxyapatite-based bilayered hydrogel composites for osteochondral tissue regeneration. **Applied Materials Today**, v. 12, p. 309–321, 2018.

PHILLIPPI, J. A. et al. Microenvironments Engineered by Inkjet Bioprinting Spatially Direct Adult Stem Cells Toward Muscle- and Bone-Like Subpopulations. **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 127–134, 2008.

PICONE, C. S. F.; DA CUNHA, R. L. Interactions between milk proteins and gellan gum in acidified gels. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 5, p. 502–511, 2010.

QUINN, F. X.; HATAKEYAMA, T. The Conformational Properties of Gellan G u m Hydrogels Hirohisa Yoshida Masato Takahashi Hyoe Hatakeyama. **Polymer Gels and Networks**, v. 1, p. 93–114, 1993.

RAJAN, N. et al. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2753–2758, 2007.

REPRAP. **RepRap**. Disponível em: <<https://reprap.org/mediawiki/index.php?title=RepRap&oldid=186891>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

RUZICKA, B.; ZACCARELLI, E. A fresh look at the Laponite phase diagram. **Soft Matter**,

v. 7, n. 4, p. 1268–1286, 2011.

SAUNDERS, R. E.; GOUGH, J. E.; DERBY, B. Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing. **Biomaterials**, v. 29, n. 2, p. 193–203, 2008.

SCHUURMAN, W. et al. Bioprinting of hybrid tissue constructs with tailorable mechanical properties. **Biofabrication**, v. 3, n. 2, 2011.

SELIK TAR, D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. **Science**, v. 336, n. 6085, p. 1124–1128, 2012.

SHEN, M. et al. Rheology and adhesion of poly(acrylic acid)/Laponite nanocomposite hydrogels as biocompatible adhesives. **Langmuir**, v. 30, n. 6, p. 1636–1642, 2014.

SHIM, J. H. et al. Development of a hybrid scaffold with synthetic biomaterials and hydrogel using solid freeform fabrication technology. **Biofabrication**, v. 3, n. 3, 2011.

SIGAUX, N. et al. 3D Bioprinting: principles, fantasies and prospects. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 120, n. 2, p. 128–132, 2019.

SILVA-CORREIA, J. et al. Biocompatibility evaluation of ionic- and photo-crosslinked methacrylated gellan gum hydrogels: In vitro and in vivo study. **Advanced Healthcare Materials**, v. 2, n. 4, p. 568–575, 2013.

SKARDAL, A.; ATALA, A. Biomaterials for Integration with 3-D Bioprinting. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 43, n. 3, p. 730–746, 2015.

SMITH, C. M. et al. Three-Dimensional BioAssembly Tool for Generating Viable Tissue-Engineered Constructs. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 9–10, p. 1566–1576, 2004.

SMITH, C. M. et al. Characterizing Environmental Factors That Impact the Viability of Tissue-Engineered Constructs Fabricated by a Direct-Write Bioassembly Tool. **Tissue Engineering**, v. 0, n. 0, p. 070108042223001, 2007.

SPILLER, K. L.; MAHER, S. A.; LOWMAN, A. M. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 17, n. 4, p. 281–299, 2011.

SUNDARAM, P. A. **Metallic Biomaterials Classification of biomaterials**. Disponível em: <<http://slideplayer.com/slide/7790234/>>. Acesso em: 24 maio. 2018.

SUNDARRAJAN, P. et al. One pot synthesis and characterization of alginate stabilized semiconductor nanoparticles. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 33, n. 10, p. 3218–3224, 2012.

TALLIA, F. 3-D printed flexible hybrids for tissue regeneration. **Department of Materials 3-D**, n. November, 2016.

TEKIN, E.; SMITH, P. J.; SCHUBERT, U. S. Inkjet printing as a deposition and patterning tool for polymers and inorganic particles. **Soft Matter**, v. 4, n. 4, p. 703–713, 2008.

THOMPSON, D. W.; BUTTERWORTH, J. T. The nature of laponite and its aqueous dispersions. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 151, n. 1, p. 236–243, 1992.

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

ULBRICH, C. B. L. Inspeção por digitalização em aplicações de prototipagem rápida na medicina. **Tese de doutorado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.**, p. 283, 2007.

VANKOEVERING, K. K.; HOLLISTER, S. J.; GREEN, G. E. Advances in 3-dimensional printing in otolaryngology a review. **JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 143, n. 2, p. 178–183, 2017.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 51–54, 2010.

WANG, F.; WEN, Y.; BAI, T. The composite hydrogels of polyvinyl alcohol–gellan gum–Ca<sup>2+</sup> with improved network structure and mechanical property. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 268–275, 2016.

WILLIAMS, D. F. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. **Elsevier Science Limited**, 1987.

WU, B. M. et al. Solid free-form fabrication of drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 40, n. 1–2, p. 77–87, 1996.

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

X. CUI, T. BOLAND, D. D. D'LIMA, M. K. L. No Title. In: **Recent Pat. Drug Delivery Formul.** [s.l: s.n.]. p. 272.

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

XU, T. et al. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by the inkjet printing method. **Biomaterials**, v. 27, n. 19, p. 3580–3588, 2006.

XU, T. et al. High-Throughput Production of Single-Cell Microparticles Using an Inkjet Printing Technology. **Journal of Manufacturing Science and Engineering**, v. 130, n. 2, p. 021017, 2008.

XU, T. et al. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications. **Biofabrication**, v. 5, n. 1, 2013.

XU, W. et al. Three-Dimensional Printing of Wood-Derived Biopolymers: A Review Focused on Biomedical Applications. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 5, p. 5663–5680, 2018.

YAMAMOTO, M. et al. Generation of Stable Co-Cultures of Vascular Cells in a Honeycomb Alginate Scaffold. **Tissue Engineering Part A**, v. 16, n. 1, p. 299–308, 2009.

ZHANG, W. et al. Cartilage repair and subchondral bone migration using 3d printing osteochondral composites: A one-year-period study in rabbit trochlea. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ZHAO, L. Z. et al. Recent advances in clay mineral-containing nanocomposite hydrogels. **Soft Matter**, v. 11, n. 48, p. 9229–9246, 2015.

ZOPF, D.A., HOLLISTER, S.J., NELSON, M.E., OHYE, R.G. & GREEN, G. E. Bioresorbable airway splint created with a three-dimensional printer. **N. Engl. J. Med.** **368**, p. 2043–2045, 2013.