

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS**  
**Programa de Pós-Graduação em Química**



Dissertação de Mestrado

**Hidrogéis de carboximetilcelulose/amido fabricados por impressão 3D  
para uso como substratos para cultivo celular**

**Matheus da Silva Gularte**

Pelotas, 2023.

**Matheus da Silva Gularte**

**Hidrogéis de carboximetilcelulose/amido fabricados por impressão 3D  
para uso como substratos para cultivo celular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Pelotas, 2023.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Química

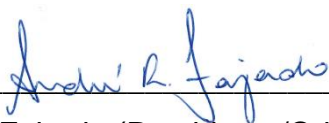
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação de Mestrado


**Hidrogéis de carboximetilcelulose/amido fabricados por impressão 3D  
para uso como substratos para cultivo celular**

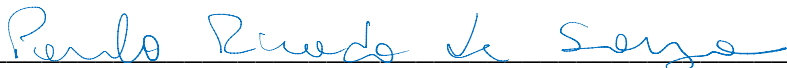
Elaborada por  
**Matheus da Silva Gularte**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. André Ricardo Fajardo (Presidente/Orientador) - PPGQ/UFPel

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Bianchini - PPGQ/UFPel

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Ricardo de Souza - UFSM

*Dedico esta dissertação a todos aqueles  
que tiveram ao meu lado e me  
incentivaram em cada etapa dessa jornada.  
Especialmente aos meus pais,  
Andréia da Silva Gularte e João Luis Lopes Gularte,  
por todo amor e oportunidade única de estudar.*

G971h Gularte, Matheus da Silva

Hidrogéis de carboximetilcelulose/amido fabricados  
por impressão 3D para uso como substratos para  
cultivo celular / Matheus da Silva Gularte ; André  
Ricardo Fajardo, orientador. — Pelotas, 2023.

85 f.

Dissertação (Mestrado) — Química, Centro de  
Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos,  
Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Biomateriais. 2. *Scaffold*. 3. Manufatura aditiva. 4.  
Biotintas. 5. Engenharia de tecidos. I. Fajardo, André  
Ricardo, orient. II. Título.

CDD : 574.19218

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha gratidão a Deus e a Ogum por sua proteção e orientação ao longo de toda minha jornada acadêmica e pessoal.

Sou profundamente grato ao meu orientador, Prof. Dr. André R. Fajardo, por acreditar em meu potencial desde o primeiro semestre da faculdade e por me proporcionar inúmeras oportunidades ao longo desses anos juntos. Sua orientação dedicada, paciência e conhecimento foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório LaCoPol, onde tive o privilégio de realizar minha pesquisa, por oferecer um ambiente acolhedor e estimulante para o aprendizado e crescimento profissional. Quero expressar minha gratidão a todos os colegas do laboratório que fizeram parte dessa trajetória.

Agradeço especialmente a meus pais, Andréia da Silva Gularte e João Luis Lopes Gularte, por me proporcionarem uma oportunidade única e privilegiada de estudar. Seu apoio incondicional, incentivo constante e os sacrifícios feitos em prol da minha formação tornaram possível a realização dos meus objetivos e aspirações na área acadêmica.

À minha querida avó, Zulce Maldema Furtado da Silva, agradeço por me acolher no quartinho durante meus estudos, tornando possível dedicar-me ao conhecimento sem nenhuma preocupação.

Agradeço também pelo apoio e incentivo de minha irmã, Winie da Silva Gularte, durante nossas sessões de maratonas das séries da Marvel todas as quartas-feiras. Sua presença constante e nossa parceria em meio aos momentos desafiadores foram verdadeiros pilares de apoio e diversão.

Ao meu grande amigo Rafael Almeida Mota, um verdadeiro gremista, que esteve sempre ao meu lado, me apoiando incondicionalmente.

E não posso deixar de mencionar minha namorada, Taís Dias Domingues, cujo apoio incondicional, compreensão e incentivo foram essenciais ao longo deste processo. Sua presença trouxe equilíbrio e força para superar os obstáculos e alcançar este importante marco em minha vida acadêmica.

Por fim, gostaria de reconhecer a Capes como um órgão de fomento na pesquisa, que desempenhou um papel crucial na realização deste trabalho.

*“A educação é a arma mais poderosa que  
você pode usar para mudar o mundo.”*

*Nelson Mandela*

## RESUMO

Gularte, Matheus da Silva. **Hidrogéis de carboximetilcelulose/amido fabricados por impressão 3D para uso como substratos para cultivo celular.** 2023. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

O uso de hidrogéis como biomateriais tem crescido consideravelmente nas últimas décadas e com o auxílio de processos de manufatura aditiva, novos materiais com formas e geometrias complexas têm sido produzidos para uso como *scaffolds*. Como contribuição a esse campo de aplicação, este estudo formulou uma biotinta de carboximetilcelulose (CMC) e amido (St) utilizando-a para impressão 3D de hidrogéis, visando seu uso posterior como *scaffolds* para o cultivo celular. As biotintas CMC/St aditivadas com 15% (m/m) de ácido cítrico (reticulante) apresentaram propriedades reológicas vantajosas, garantindo uma boa capacidade de impressão. Imagens de microscopia eletrônica de varredura revelaram que os hidrogéis impressos possuem uma estrutura com poros duplos, com dimensões relativamente grandes ( $336,6 \pm 32,5 \mu\text{m}$ ) e microporos uniformemente distribuídos de tamanho médio ( $60,3 \pm 18,9 \mu\text{m}$ ). Plasma rico em plaquetas (PRP) foi adsorvido nos hidrogéis como estratégia para aumentar sua atividade biológica. O PRP na superfície dos hidrogéis resultou em alterações na porosidade e nas propriedades térmicas dos mesmos, indicando sua incorporação. Junto com as análises de caracterização, os testes de estabilidade ratificaram a reticulação dos hidrogéis CMC/St, evidenciando sua notável estabilidade em ambientes aquosos, meios de cultivo celular e solução tampão fosfato (PBS) com pH 7,4. Análises mecânicas revelaram que o PRP não alterou significativamente a rigidez dos materiais, enquanto os hidrogéis CMC/St intumescidos em PBS apresentaram um módulo de elasticidade 72% maior em comparação com os hidrogéis contendo PRP (CMC/St-PRP). Por fim, os hidrogéis CMC/St apresentaram uma alta taxa de intumescimento (cinética), alcançando um máximo de 136% em PBS em apenas 5 min, o que é associado a natureza hidrofílica da matriz e a sua morfologia porosa. Todas essas características são atraentes para que os hidrogéis CMC/St possam ser no futuro testados como *scaffolds* para aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

**Palavras-chave:** Biomateriais, *scaffold*, manufatura aditiva, biotintas, carboximetilcelulose, amido, materiais reticulados, engenharia de tecidos.



## ABSTRACT

Gularte, Matheus da Silva. **3D Printed hydrogels of carboxymethylcellulose/starch as scaffolds for cell culture**. 2023. 86 p. Dissertation (Master Degree in Chemistry) – Chemistry Post-Graduation Program. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

The use of hydrogels as biomaterials has significantly grown in recent decades, and with the aid of additive manufacturing processes, new materials with complex shapes and geometries have been produced for use as scaffolds. As a contribution to this research field, a bioink of carboxymethylcellulose (CMC) and starch (St) was formulated and used for 3D printing of hydrogels, which will be tested as scaffolds for cell culture. The CMC/St bioink, supplemented with 15% (w/w) citric acid (crosslinking agent), showed favorable rheological properties, ensuring a good printing capability. Scanning electron microscopy images revealed that the printed hydrogels have a dual-porous structure, with relatively large pores ( $336.6 \pm 32.5 \mu\text{m}$ ) and uniformly distributed micropores of medium size ( $60.3 \pm 18.9 \mu\text{m}$ ). Platelet-rich plasma (PRP) was adsorbed on the hydrogels as a strategy to enhance their biological activity. The presence of PRP on the hydrogel surface resulted in changes in porosity and thermal properties, indicating its incorporation. Alongside characterization analyses, stability tests confirmed the crosslinking of the CMC/St hydrogels and demonstrated their high stability in water, cell culture medium, and phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4. Mechanical analyses revealed that PRP did not significantly alter the material's stiffness, while CMC/St hydrogels swollen in PBS showed a 72% increase in elastic modulus compared to PRP-containing hydrogels (CMC/St-PRP). Finally, the CMC/St hydrogels exhibited a high swelling rate (kinetics), reaching a maximum of 136% in PBS in just 5 minutes, which is attributed to the hydrophilic nature of the matrix and its porous morphology. All these features are appealing for potential future testing of CMC/St hydrogels as scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine applications.

**Keywords:** Biomaterials, scaffold, additive manufacturing, bioinks, carboxymethylcellulose, starch, crosslinked materials, tissue engineering.

## Lista de Figuras

Figura 1: Esquema geral do processo de fabricação e aplicação de scaffolds por tecnologia de impressão 3D. (Adaptado de Cheng et al., 2021) .....	23
Figura 2: Ilustração esquemática das técnicas de (A) impressão por extrusão, (B) por jato de tinta, (C) assistida por laser e (D) estereolitografia. (Adaptado de Jang et al., 2016) .....	25
Figura 3: Esquema do desenvolvimento de bioscaffolds 3D autônomos e sua morfologia macroporosa e microporosa interconectada a partir da biotinta de CMC contendo CNF. (Adaptado de Mohan et al., 2020) .....	27
Figura 4: Mecanismo de reação de reticulação de cadeias de St com AC. ....	29
Figura 5: Representação da estrutura da celulose. ....	31
Figura 6: Representação da estrutura da CMC. ....	32
Figura 7: Estrutura química do amido de milho constituindo os polímeros naturais amilopectina e amilose. A amilopectina é um polímero ramificado, enquanto a amilose é um polímero linear formando uma hélice. ....	33
Figura 8: Fluxograma de trabalho. ....	38
Figura 9: Teste de filamento para as biotintas aditivadas com 0% (a), 15% (b), 20% (c) e 25% (d) (m/m) de AC. ....	46
Figura 10: Avaliação da primeira camada impressa com as biotintas aditivadas com 0% (a), 15% (b), 20% (c) e 25% (d) (m/m) de AC. ....	46
Figura 11: Resultados de empilhamento de 6 camadas para os hidrogéis impressos com biotintas aditivadas com 0% (a,a') e 15% (b,b') (m/m) de AC. ....	47
Figura 12: Dados de viscosidade em relação à tensão de cisalhamento para a biotinta sem AC (0%) (a) e com 15% (m/m) (b) de AC, realizada a 22°C, sob uma taxa de cisalhamento de 3 Hz. ....	48
Figura 13: Imagens fotográficas das amostras de hidrogel fabricadas: CMC/St Lio (a,a'), CMC/St (b,b') e CMC/St-PRP (c, c'). ....	50
Figura 14: Imagens obtidas por MEV mostrando a superfície e a parte interna dos hidrogéis CMC/St Lio (a, a'), CMC/St (b, b') e CMC/St-PRP (c, c'), respectivamente. ....	52
Figura 15: Espectros de FTIR dos (a) compostos puros (CMC, St e AC) e dos (b) hidrogéis CMC/St Lio, CMC/St e CMC/St-PRP. ....	54

Figura 16: Curvas TGA (a) e DTG (b) para AC, St e CMC.....	56
Figura 17: Curvas TGA (a) e DTG (b) para CMC/St Lio, CMC/St e CMC/St-PRP. .....	58
Figura 18: Imagens fotográficas dos hidrogéis (a) CMC/St Lio e (b) CMC/St re- intumescidos em água após o teste do iodo. ....	59
Figura 19: Imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio (a,a') e CMC/St (b,b') submetidos ao teste de estabilidade em água destilada. ....	60
Figura 20: Imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio (a,a') e CMC/St (b,b') submetidos ao teste de estabilidade em DMEM (1% m/v). ....	62
Figura 21: Imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio (a) e CMC/St (b) submetidos ao teste de estabilidade PBS pH 7,4. Imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio (a') e CMC/St (b') após compressão. ....	63
Figura 22: Perda de massa dos hidrogéis CMC/St Lio e CMC/St incubados em PBS (pH 7,4) à 37 °C em função do tempo.....	64
Figura 23: Curvas de tensão em relação a dois ciclos de compressão para os hidrogéis CMC/St-PBS e CMC/St-PRP.....	65
Figura 24: Curvas Intumescimento para os hidrogéis CMC/St em PBS (pH 7,4), DMEM e PRP à 37 °C. ....	69

### **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Avaliação da capacidade de impressão proporcional ao polímero...	44
Tabela 2: Avaliação da quantidade de AC, printabilidade e propriedades dos scaffolds após a impressão.....	44
Tabela 3: Valores referentes aos parâmetros mecânicos calculados com base nas curvas de tensão. ....	66

## Lista de Abreviaturas

3D: Tridimensional

3DP: Impressão 3D

AC: Ácido cítrico

CEME-Sul/FURG: Centro de Microscopia Eletrônica do Sul da Universidade Federal do Rio Grande

CMC: carboximetilcelulose

CMC/St Lio: Hidrogel impresso liofilizado e não reticulado

CMC/St: Hidrogel impresso e reticulado

CMC/St-PBS: Hidrogel intumescido em tampão PBS

CMC/St-PRP: Hidrogel carregados com PRP

CNF: celulose nanofibrilada

DHT: Tratamento térmico desidrotermal (do inglês, *dry heating treatment*)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DRX: Difração de raios-X

DS: Grau de substituição

DTG: Termogravimetria derivada

*E*: Módulo de elasticidade

FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

MEC: Matriz extracelular

MEV: Microscópio eletrônico de varredura

PRP: Plasma rico em plaquetas

St: Amido

TGA: Análise termogravimétrica

UV: Ultra violeta

# Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>3. Revisão da Literatura .....</b>	<b>19</b>
3.1 Hidrogéis como biomateriais .....	19
3.2 <i>Scaffolds</i> .....	20
3.3 Impressão 3D .....	23
3.4 Biotintas.....	27
3.5 Carboximetilcelulose (CMC).....	30
3.6 Amido (St) .....	32
<b>4. Materiais e Métodos .....</b>	<b>36</b>
4.1 Reagentes .....	36
4.2 Procedimentos experimentais .....	36
4.2.1 Preparo e caracterização das biotintas CMC/St .....	36
4.2.2 Impressão dos hidrogéis CMC/St .....	37
4.2.3 Preparo do PRP.....	38
4.2.4 Preparo dos hidrogéis CMC/St carregados com PRP .....	39
4.3 Caracterização dos hidrogéis .....	39
4.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	39
4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	39
4.3.3 Análise termogravimétrica (TGA) .....	39
4.3.4 Análises de propriedades mecânicas .....	40
4.3.5 Grau de intumescimento .....	40
4.3.6 Estabilidade.....	41
4.3.7 Teste do iodo.....	41

<b>5. Resultados e discussão.....</b>	<b>43</b>
5.1 Caracterização da biotinta CMC/St .....	43
5.2 Caracterização dos hidrogéis .....	48
5.3 Estudos de estabilidade dos hidrogéis impressos .....	59
5.4 Propriedades mecânicas .....	65
5.5 Intumescimento do hidrogel CMC/St.....	67
5.6 Comparativo com a literatura .....	69
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>71</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>73</b>

## 1. Introdução

Os hidrogéis são, por definição, materiais poliméricos reticulados que têm a capacidade de reter grandes quantidades de água em sua estrutura mesmo sob pressão. Esses materiais são formados por uma rede tridimensional (3D) de polímeros hidrofílicos que interagem com as moléculas de água por meio de ligações não covalentes (Chai et al., 2017). Devido a essas características, os hidrogéis são amplamente utilizados em diversas aplicações em diferentes áreas do conhecimento, (medicina, agricultura, alimentos, indústrias de cosméticos, entre outras). Por apresentarem estruturas e as propriedades que podem mimetizar aquelas encontradas nos tecidos biológicos, vários tipos de hidrogéis, são adequados e atraentes para uso em aplicações biomédicas (Bashir et al., 2020).

De modo geral, os hidrogéis podem ser sintetizados a partir de diversos polímeros (naturais e sintéticos) e de uma grande variedade de metodologias e processos, incluindo diversas técnicas de preparação adotadas, como reticulação física, reticulação química, polimerização por enxerto e reticulação por radiação (Chamkouri, 2021; Ullah et al., 2015). Mais recentemente, a impressão 3D (3DP) passou a fazer parte dessas metodologias permitindo a fabricação de estruturas 3D altamente precisas e personalizadas, o que os torna ideais para aplicações em engenharia de tecidos e regeneração de tecidos (Mallakpour et al., 2021). Além disso, hidrogéis impressos também pode ser usada para criar modelos de tecidos e órgãos para fins de pesquisa, testes e desenvolvimento de medicamentos.

Um dos pontos cruciais para viabilizar a impressão de hidrogéis é a obtenção de biotintas que tenham características adequadas ao processo. O uso de polissacarídeos na formulação de biotintas para a 3DP de hidrogéis constitui uma área de pesquisa em rápido crescimento, pois estes permitem fabricar materiais com maior biocompatibilidade, sustentáveis e ecologicamente corretos (Islam et al., 2020). Além disso, os polissacarídeos têm propriedades biológicas únicas, como a capacidade de interagir com proteínas e células, tornando-os



ideais para aplicações biomédicas e para a produção de hidrogéis para esse segmento.

A 3DP utilizando biotintas à base de polissacarídeos pode ser realizada por meio de várias técnicas como, por exemplo, a extrusão direta (Zamboulis et al., 2022). Neste caso, o uso de éteres de celulose, como a carboximetilcelulose (CMC) se destaca em processos de extrusão por fusão a quente, devido à sua capacidade de amolecer com a temperatura, em contraste com os termoplásticos que fundem. Além disso, a solubilidade em água torna esses derivados da celulose, ideais para construir arquiteturas plásticas com padrões delicados internos e externos (Butler et al., 2020). Em suma, a 3DP de hidrogéis utilizando biotintas à base de polissacarídeos é uma área de pesquisa promissora, com potencial para criar materiais biocompatíveis, sustentáveis e ecologicamente correto. Tais materiais podem atender uma variedade de aplicações na área da saúde, por exemplo, sendo utilizados como substratos (*scaffolds*, em inglês) para o cultivo e crescimento celular (Butler et al., 2020).

No entanto, ainda há desafios a serem superados, como a limitação da resolução de impressão e a dificuldade em controlar a estrutura e a composição do material impresso. Aspectos relacionados as características biológicas dos hidrogéis também necessitam de aprimoramento. Nesse sentido, esse trabalho propõe utilizar uma biotinta preparada a partir de misturas de CMC e amido (St) como alternativa para 3DP de hidrogéis para uso como *scaffolds* para cultivo celular. A boa compatibilidade entre o derivado de celulose e o amido, a possibilidade de reticulação com ácido cítrico (AC), e as propriedades físico-químicas da biotinta formulada podem viabilizar tanto a produção dos hidrogéis quanto sua posterior aplicação. Ainda, plasma rico em plaquetas (PRP) foi utilizado fonte de fatores de crescimento (Butler et al., 2020; Diaz-Gomez et al., 2022), os quais foram incorporados aos hidrogéis impressos como estratégia para aumentar a atividade biológica dos mesmos. Por fim, as amostras de hidrogel fabricadas foram caracterizadas em termos de suas propriedades físico-químicas, morfológicas, mecânicas e de intumescimento. Ainda, ensaios *in vitro* foram feitos para avaliar a estabilidade dos hidrogéis. Em suma, os hidrogéis CMC/St apresentaram um notável potencial como *scaffolds* para aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, sendo uma alternativa atrativa a essas aplicações.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Fabricar hidrogéis de CMC/St quimicamente reticulados com AC por 3DP com características e propriedades adequadas para uso como *scaffolds* no cultivo celular.

### **2.2 Objetivos específicos**

- i. Desenvolver e caracterizar biotintas de CMC e St com printabilidade adequada;
- ii. Otimizar a arquitetura 3D do hidrogel e os parâmetros de impressão;
- iii. Carregar PRP nos hidrogéis fabricados;
- iv. Caracterizar as propriedades físico-químicas, morfológicas, mecânicas e de intumescimento dos hidrogéis fabricados;
- v. Avaliar a estabilidade dos hidrogéis em diferentes meios;
- vi. Realizar ensaios preliminares para viabilizar a aplicação como *scaffold*.

### **3. Revisão da Literatura**

#### **3.1 Hidrogéis como biomateriais**

Hidrogéis são estruturas 3D formadas por cadeias poliméricas hidrofílicas reticuladas, que permitem a absorção de grandes quantidades de água e a expansão extensiva em meios aquosos (Sánchez-Cid et al., 2022). De maneira geral, é possível classificar os hidrogéis em duas categorias de acordo com a natureza da ligação entre as redes poliméricas que compõem a sua estrutura, sendo elas hidrogéis fisicamente ou quimicamente reticulados (Sikdar et al., 2021). No caso dos hidrogéis fisicamente reticulados, a sua estruturação depende principalmente de interações fracas e temporárias, como entrelaçamentos moleculares, ligações iônicas, forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, que podem ser alteradas por mudanças físicas, como temperatura e pH, e não modificam a estrutura química do hidrogel (Sharma & Tiwari, 2020). Por outro lado, os hidrogéis quimicamente reticulados são caracterizados por interações permanentes e fortes entre suas cadeias poliméricas, já que são conectados por ligações covalentes (Catoira et al., 2019).

Devido às suas características inerentes, os hidrogéis têm sido aplicados em diversas áreas. Em particular, esses materiais têm grande potencial para aplicações biomédicas como, na engenharia de tecidos, liberação de medicamentos, materiais auto cicatrizantes, biossensores e bandagens hemostáticas (Floren et al., 2016; Xavier et al., 2015). Comparados a outros biomateriais, hidrogéis podem apresentar vantagens como aumento da biocompatibilidade, biodegradabilidade ajustável, resistência mecânica adequada e estrutura porosa (Chai et al., 2017; Revete et al., 2022). Ainda, dependendo da aplicação desejada, os hidrogéis podem ser projetados para responder a vários estímulos no corpo, como mudanças no pH, força iônica e temperatura (Sánchez-Cid et al., 2022).

Para ilustrar, hidrogéis são considerados como alternativas ideais para a cicatrização de queimaduras e feridas cirúrgicas e necróticas devido à sua capacidade de transferir vapor e oxigênio para o local da ferida, resultado de seu alto teor de água (Kalirajan et al., 2021). Além disso, os hidrogéis são apropriados para feridas secas, pois não precisam de líquido para se transformarem em géis. Os hidrogéis também são atrativos na área de liberação

de medicamentos devido à sua configuração porosa controlável que facilita a difusão de moléculas dentro do gel, essencial para a aplicação na liberação de medicamentos (Kalirajan et al., 2021). Devido à sua alta relação superfície-volume, hidrogéis são capazes de absorver e dissolver mesmo drogas com baixa solubilidade (Lai & He, 2016). Regeneração e reparação de tecidos são outras aplicações dos hidrogéis, especialmente para hidrogéis injetáveis, aplicáveis para transplante celular e regeneração de tecidos esqueléticos, como ossos, cartilagens e músculos. Devido à sua capacidade de mimetizar tecidos biológicos, os hidrogéis também podem conter fatores de crescimento, que são proteínas essenciais para estimular o desenvolvimento das células e auxiliar no processo de reparação e regeneração de tecidos (Egawa et al., 2011). Quando aplicados nesse nicho específico, os hidrogéis podem atuar como uma plataforma 3D que imita o ambiente do tecido real e facilita a aderência e proliferação das células (Chahal et al., 2019). Materiais com essa funcionalidade/atuação são conhecidos como *scaffolds* e suas principais características serão descritas na próxima seção.

### **3.2 Scaffolds**

*Scaffolds* são estruturas 3D que servem como substratos para cultivo celular *in vitro* ou como suporte para o crescimento e regeneração de tecidos *in vivo*. Esses materiais são essenciais para apoiar as células *ex vivo* com um ambiente propício, semelhante às suas condições naturais *in vivo*. Antes do implante no corpo, os *scaffolds* podem ser semeados com as células desejadas e incorporados com fatores de crescimento tecidual para melhorar a funcionalidade celular. Essas estruturas, por sua vez, são projetadas para mimetizar a matriz extracelular (MEC) do tecido nativo, fornecendo suporte mecânico e bioquímico para as células (Dutta et al., 2017).

Os *scaffolds* devem ser biocompatíveis e não tóxicos para os tecidos e órgãos no corpo, além de possuírem propriedades mecânicas adequadas para o local tratado após o implante. Eles também são frequentemente carregados com células, fatores de crescimento e medicamentos, pois estes podem estabelecer uma combinação sinérgica, melhorando significativamente as taxas de retenção celular no tecido local e servir como portadores de fatores de

crescimento e medicamentos (X. Liu et al., 2022). Além disso, os *scaffolds* devem atender aos requisitos mecânicos da região tratada após serem implantados (Cai et al., 2015). Outra exigência que deve ser cumprida pelos *scaffolds* é a sua biodegradação progressiva durante o processo de regeneração celular enquanto o novo tecido está sendo formado (Aldana & Abraham, 2017). A biodegradabilidade dos *scaffolds* evita a necessidade de remoção do material e previne possíveis efeitos colaterais decorrentes de resíduos deixados no corpo. Portanto, os *scaffolds* devem ter algumas propriedades físico-químicas e mecânicas específicas para alcançar a difusão celular e a formação de tecido 3D (Eltom et al., 2019).

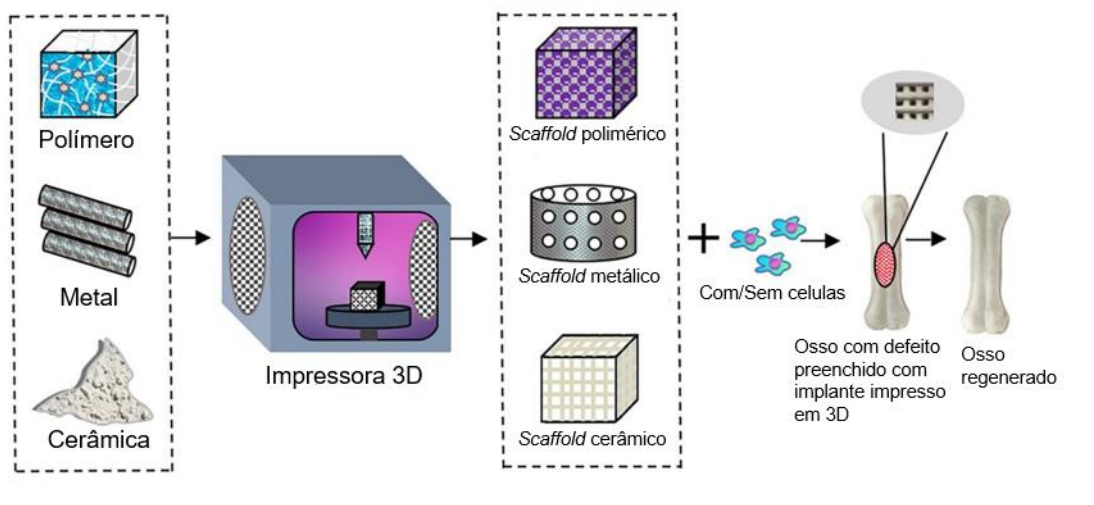
Conforme já mencionado, os *scaffolds* têm sido amplamente utilizados em estudos de engenharia de tecidos, onde são usados como suporte para o crescimento de células e tecidos *in vitro*, bem como em estudos pré-clínicos e clínicos para o desenvolvimento de terapias regenerativas. Eles têm o potencial de fornecer soluções terapêuticas eficazes e personalizadas para uma ampla gama de doenças e lesões, incluindo perda óssea, lesões de cartilagem e defeitos na pele (Cunniffe & O'Brien, 2011).

Os materiais mais comuns usados para construir *scaffolds* incluem hidrogéis, polímeros sintéticos, proteínas e materiais compósitos. Dependendo da origem dos materiais utilizados para fabricar o *scaffold*, surgem preocupações relacionadas à biocompatibilidade, composição e produtos de decomposição dessas matrizes. Embora uma ampla variedade de materiais tenha sido avaliada para um *scaffold*, foi relatado que alguns materiais não suportam o crescimento celular dentro dos *scaffolds* (Heydari et al., 2020). Hidrogéis são frequentemente usados porque possuem excelente capacidade de retenção de água e flexibilidade, imitando muitas características do microambiente celular nativo (Kalirajan et al., 2021). Polímeros sintéticos como, por exemplo o polianidrido, policaprolactona, poliéter-éter-cetona, poliácido lático e poliácido glicólico, são frequentemente escolhidos devido à sua estabilidade mecânica e controle preciso sobre a arquitetura do *scaffold* (Pina et al., 2019). As macromoléculas naturais, como ácido hialurônico, fibrina, colágeno e celulose, possuem boa compatibilidade biológica, baixa imunogenicidade e osteocondutividade e são usadas para imitar a MEC natural. No entanto, *scaffolds* a base dessas macromoléculas sofrem de taxas de degradação livre e baixa estabilidade

mecânica. Os materiais compósitos, por sua vez, são frequentemente utilizados para combinar diferentes propriedades físicas e mecânicas em um único *scaffold* (Krishani et al., 2023).

Os *scaffolds* com microporos aleatórios são empregados na engenharia de tecidos há muito tempo (Dutta et al., 2017). Existem diversas técnicas convencionais utilizadas para a fabricação desse tipo de material, como a fundição de solvente com lixiviação de partículas, espuma de gás, malhas de fibras ou união de fibras, separação de fases, moldagem por fusão, secagem por congelamento de emulsão, fundição de solução e *freeze-drying* (Do et al., 2015). Os métodos convencionais têm várias limitações, pois geralmente não são capazes de obter um controle preciso sobre a arquitetura interna do *scaffold*, de produzir um tamanho preciso de poros, geometria de poros e alto nível de interconectividade o que pode afetar sua resistência mecânica, área efetiva de superfície para o crescimento celular e fluxo de nutrientes (Bahraminasab, 2020). Além disso, as técnicas convencionais podem ter uma distribuição não adequada de células, devido às imprecisões inerentes no processo de semeadura manual de células. Isso pode se tornar problemático, já que as células precisam ser dispostas com precisão de acordo com a necessidade e função do tecido, como células endoteliais alinhando para formar vasos ou osteoblastos formando aglomerados mineralizados (Do et al., 2015).

O desenvolvimento da tecnologia de 3DP é vista como uma solução avançada para superar as limitações dos métodos convencionais na fabricação de *scaffolds* citados acima, o que pode levar à criação de suportes de matriz que podem promover melhor a regeneração de tecido funcional. Recentemente, tem havido uma tendência em utilizar a 3DP como uma técnica de prototipagem rápida para fabricar estruturas porosas em microescala com as complexidades desejadas, permitindo uma verdadeira engenharia do *scaffold* (Mani et al., 2022). Esses métodos envolvem a criação de objetos 3D usando uma abordagem de deposição camada por camada. Técnicas desse tipo têm sido empregadas com sucesso em engenharia de tecidos para desenvolver *scaffolds* baseados em materiais poliméricos duros e hidrogéis, conforme ilustrado na **Figura 1** (Eltom et al., 2019).



**Figura 1:** Esquema geral do processo de fabricação e aplicação de scaffolds por tecnologia de impressão 3D. (Adaptado de Cheng et al., 2021)

### 3.3 Impressão 3D

A tecnologia de 3DP tem se mostrado uma ferramenta promissora para a fabricação de *scaffolds* com alta precisão e exatidão, criando estruturas 3D biomiméticas detalhadas e precisas (Bozkurt & Karayel, 2021; Shokouhimehr et al., 2021). Os métodos utilizados atualmente para essa finalidade envolvem um processo camada por camada, que inclui, mas não se limita a, impressão direta em 3D, modelagem por deposição fundida, estereolitografia e sinterização a laser seletiva. Os *scaffolds* produzidos por meio dessas técnicas podem variar em tamanho, desde milímetros a nanômetros (Mani et al., 2022).

As vantagens do uso da 3DP na produção de *scaffolds* incluem a capacidade de fabricar estruturas com formas complexas capazes de imitar MEC, criando um microambiente ideal para células se fixarem, proliferarem, se distribuírem e se diferenciarem, com potencial para formar tecido funcional (Celikkin et al., 2017). Além disso, a técnica permite a fabricação de *scaffolds* mais precisos e complexos com menor trabalho manual, em comparação com os métodos convencionais, que geralmente envolvem processos manuais demorados e trabalhosos (Dutta et al., 2017). A 3DP também oferece a possibilidade de personalização dos *scaffolds* para atender às necessidades específicas de cada paciente, o que pode levar a uma maior eficácia no tratamento de lesões e doenças (Shokouhimehr et al., 2021). A 3DP apresenta

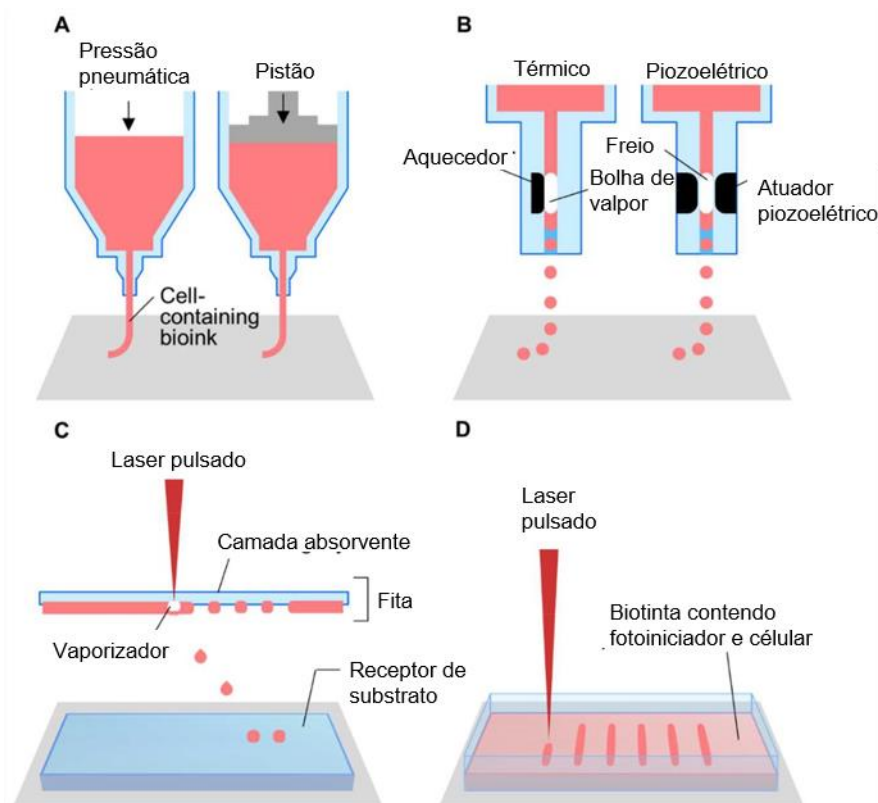
ainda outra vantagem que é a habilidade de produzir estruturas já embebidas com células, fazendo com que as mesmas tenham uniforme no *scaffold*, fator crucial para a regeneração de tecidos. No entanto, a disponibilidade de biomateriais constituídos de hidrogéis com estabilidade e propriedades adequadas para a 3DP de *scaffolds* ainda é limitada, dependendo da tecnologia de impressão utilizada (Murphy & Atala, 2014). Embora várias tecnologias de 3DP possam imprimir o mesmo material, a composição do material imprimível, conhecido como "formulações de tinta", pode diferir significativamente. Para ser imprimível, as tintas 3D devem exibir uma resposta viscoelástica bem controlada, resistir a tensões compressivas de forças capilares e ter encolhimento mínimo durante a secagem para evitar deformação ou rachaduras no objeto (Dai et al., 2019). Além disso, o tempo de produção pode ser maior à medida que o design do *scaffold* se torna mais preciso e complexo. Contudo, a evolução e aprimoramento contínuo da 3DP e o uso de materiais híbridos e múltiplas tecnologias de impressão, a produção de *scaffolds* mais complexos e eficientes pode ser alcançada (Ambrosi & Pumera, 2016).

Dentre as técnicas utilizadas, a impressão direta em 3D é mais vantajosa em relação a outras técnicas devido à sua alta precisão e rapidez na fabricação de *scaffolds* (Dai et al., 2019). Nessa técnica, os materiais são depositados diretamente na plataforma de impressão, sem a necessidade de preparar camadas intermediárias. Isso permite a fabricação de estruturas complexas com alta resolução, possibilitando a produção de *scaffolds* com formas variadas, desde as simples até as mais complexas. Essas características tornam a impressão direta em 3D uma técnica muito vantajosa para a produção de *scaffolds* em comparação com outras técnicas que podem ser mais limitadas em termos de precisão e flexibilidade (Mandrycky et al., 2016).

Essencialmente, a 3DP de tecidos utilizando biotinta permite a fabricação de tecidos moles em três dimensões que combinam biomateriais, células vivas e fatores de crescimento, maximizando a imitação das características de tecidos naturais. Esse método é conhecido como bioimpressão e a tinta, nesse caso, é chamada de biotinta. Existem quatro principais categorias de bioimpressão 3D de tecidos (**Figura 2**): Impressão por jato de tinta, impressão assistida por laser, impressão por extrusão e estereolitografia (W. Jia et al., 2016; Mandrycky et al., 2016). A técnica de impressão por extrusão é baseada na extrusão de líquidos



(pasta, solução) de uma seringa pressurizada através de uma agulha para uma solução com densidade controlada. Os materiais são extrudados em forma de longas linhas ou pontos para criar estruturas complexas.

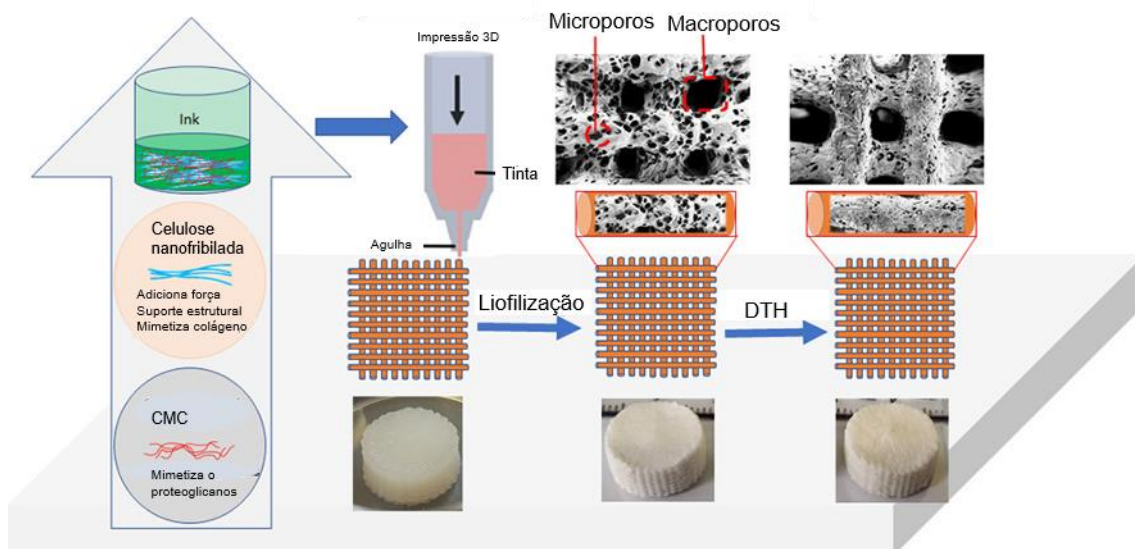


**Figura 2:** Ilustração esquemática das técnicas de (A) impressão por extrusão, (B) por jato de tinta, (C) assistida por laser e (D) estereolitografia. (Adaptado de Jang et al., 2016)

A bioimpressão permite a medicina personalizada ao aproveitar a forma técnica do crescimento celular, utilizando a transferência de materiais para desenvolver um padrão biológico e montagem de materiais relevantes, células, moléculas, tecidos e biomateriais biodegradáveis com uma estrutura prescrita para alcançar algumas funções biológicas (Eltom et al., 2019). Existem dois tipos de bioimpressão: construções acelulares e celulares. A bioimpressão acelular envolve a produção do biomaterial como *scaffold* sem o uso de células vivas durante o processo de impressão. Em contraste, a bioimpressão celular integra células vivas e outros bioagentes com o material durante a produção para fabricar construções de tecido vivo. As condições e a otimização dos parâmetros na construção dessas construções variam dependendo da presença ou ausência de células vivas e substâncias biológicas. A bioimpressão acelular pode oferecer

maior complexidade e precisão de forma do que a celular, devido a condições de fabricação menos restritivas (Tallapaneni et al., 2021).

Os polímeros representam uma importante categoria de materiais com potencial para uso na bioimpressão 3D de *scaffolds* para engenharia de tecidos. Os materiais depositados para a formação do *scaffold* podem ser reticulados ou polimerizados por meio de calor, luz ultravioleta ou soluções aglutinantes. Utilizando essa tecnologia, hidrogéis impressos podem ser preparados para engenharia de tecidos otimizados conforme necessário (Mani et al., 2022). Além disso, uma abordagem promissora é o uso de biotintas, que são formulações específicas contendo ou não células vivas, biomateriais e outros componentes necessários para o processo. O desenvolvimento de biotintas adequadas é essencial para o sucesso da bioimpressão, garantindo propriedades físico-químicas adequadas, biocompatibilidade, atendendo às necessidades específicas de cada aplicação (Gungor-Ozkerim et al., 2018). Por exemplo, Mohan et al. (2020) desenvolveram *scaffolds* acelulares com morfologia espacialmente estruturada, macroporos e microporos interconectados, utilizando uma combinação de técnicas de 3DP direta e liofilização (**Figura 3**). A biotinta utilizada foi à base de CMC e celulose nanofibrilada (CNF). O *scaffold* pós liofilizado foi submetido a um tratamento de desidrotermia, no qual aumentou significativamente a dureza superficial, o módulo de indentação, a resistência à compressão e a estabilidade dimensional dos *scaffolds*, em comparação com materiais não tratados. Vale ressaltar que não foram observadas diferenças nos espectros de caracterização química, sugerindo que o aumento das propriedades mecânicas e da estabilidade dimensional é baseado na reticulação física de grupos funcionais na interface entre CMC e CNF. Os *scaffolds* reticulados apresentaram alta proliferação, viabilidade e adesão de células osteoblásticas derivadas de tecido ósseo humano. Além disso, não houve a necessidade de quaisquer reticulantes adicionais, tornando os *scaffolds* degradáveis e atraentes para regeneração de tecido ósseo (Mohan et al., 2020).



**Figura 3:** Esquema do desenvolvimento de bioscaffolds 3D autônomos e sua morfologia macroporosa e microporosa interconectada a partir da biotinta de CMC contendo CNF. (Adaptado de Mohan et al., 2020)

### 3.4 Biotintas

As biotintas desempenham um papel fundamental na bioimpressão, oferecendo um ambiente propício para o desenvolvimento de células vivas. Essas biotintas consistem em materiais biocompatíveis que protegem as células do estresse durante o processo de impressão (Zennifer et al., 2021). Embora a presença de células seja comum na composição das biotintas, é importante destacar que nem todas as biotintas precisam necessariamente conter células incorporadas. Em alguns casos, as biotintas podem ser compostas apenas por biomateriais que fornecem suporte estrutural e propriedades bioativas, permitindo a posterior incorporação de células após a impressão (Donderwinkel et al., 2017).

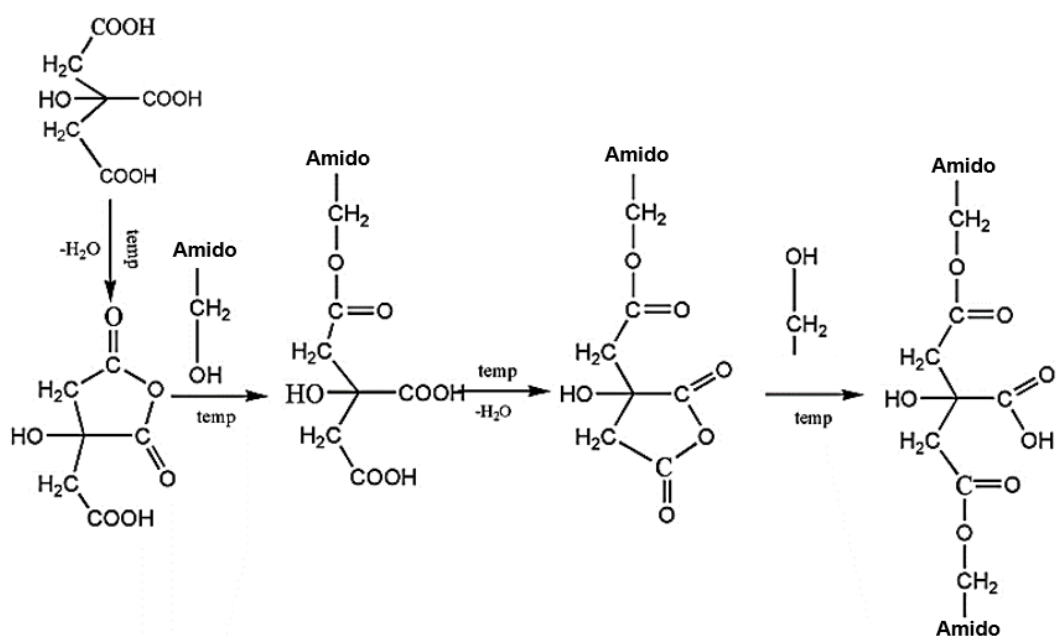
As biotintas podem ser compostas por polímeros naturais, sintéticos ou híbridos, com requisitos fundamentais. Os requisitos biológicos de uma biotinta ideal incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade e citocompatibilidade, que incluem adesão celular, viabilidade, migração, proliferação, diferenciação e maturação. A escolha das biotintas deve ser baseada em propriedades físico-químicas adequadas, como viscosidade, tensão superficial e concentração (W. Sun et al., 2020).

Ao utilizar a impressão baseada em extrusão, as biotintas devem possuir características viscoelásticas e de cisalhamento, para que os *scaffolds* possam

ser impressos com uma melhor resolução, integridade mecânica e com alta capacidade e fidelidade de impressão. A biotinta também deve endurecer imediatamente após a impressão de maneira citocompatível para formar um complexo estruturalmente estável com integridade mecânica. Essa transição sol-gel instantânea *in situ* melhora a estabilidade mecânica, mantendo o tamanho e a forma da construção impressa (W. Sun et al., 2020). A resistência mecânica da construção também depende da porosidade do suporte e de sua interconectividade, o que ajuda na troca de nutrientes e gases necessários para a sobrevivência e maturação celular (Hospodiuk et al., 2017). Por fim, é preferível que a estrutura do suporte deve ser degradada pelo corpo para permitir a integração de novos tecidos (Yue et al., 2016). O processo de impressão baseada em extrusão envolve o uso de um sistema pneumático pressurizado que empurra a biotinta através da agulha. No entanto, este método tem uma desvantagem para biotintas celulares, já que o estresse de cisalhamento criado pelos bicos de tamanhos variados pode ter um efeito prejudicial na viabilidade das células que estão sendo impressas (W. Sun et al., 2020).

Existem quatro principais tipos de materiais utilizados como biotintas: hidrogéis, microcarregadores, agregados de células e componentes de matriz descelularizada (Dzobo et al., 2019; Ozbolat & Hospodiuk, 2016). Os hidrogéis são frequentemente usados como biotintas. A natureza hidrofílica desses polímeros permite que o gel inche em um ambiente com alto teor de água, proporcionando suporte estrutural para as células e permitindo a encapsulação celular em 3D quando ocorre a gelificação do hidrogel (Munaz et al., 2018). No entanto, uma desvantagem dos hidrogéis é sua fraca resistência mecânica, o que pode afetar a forma e a função do objeto impresso, dependendo da aplicação (Donderwinkel et al., 2017). O sucesso da impressão depende principalmente das propriedades reológicas do hidrogel e do método de reticulação utilizado, que pode ser físico ou químico. No caso de biotintas a base de polissacarídeos a reticulação pode ser feita, por exemplo, utilizando agentes de reticulação como o  $\text{CaCl}_2$ , luz UV, glutaraldeído e o ácido cítrico (AC) (Chimene et al., 2020; Ji et al., 2020; Piola et al., 2022; Schmid et al., 2022; Zamboulis et al., 2022). O AC, por sua vez, é uma substância orgânica não tóxica para produzir scaffolds reticulados (Štiglic et al., 2022). Seu processo de reticulação é realizado através de um tratamento térmico conhecido como

desidrotermal (DHT, do inglês *dry heating treatment*) em um estado seco. Nesse método, o scaffold é exposto a temperaturas elevadas sem a presença de água. O calor desencadeia uma reação de reticulação aonde ocorre a reação com grupos funcionais presentes nos polímeros do *scaffold*, como hidroxilas, carboxilas ou grupos aminos, formando ligações covalentes entre as cadeias poliméricas (**Figura 4**). O uso do AC tem como principal vantagem sua biocompatibilidade, caráter não tóxico e origem orgânica. Além de sua abordagem simples e eficiente para obter a reticulação pelo método DHT, eliminando a necessidade de utilizar produtos químicos adicionais ou realizar etapas de processamento complexas (Lim, 2022). Além desses aspectos mencionados acima, várias propriedades, como fração gel, viscosidade, calibre da agulha, estresse de cisalhamento, propriedades da rede e tempo de fabricação, também afetam a printabilidade e a sobrevivência celular (Kyle et al., 2017).



**Figura 4:** Mecanismo de reação de reticulação de cadeias de St com AC. (Uliniuc et al., 2013)

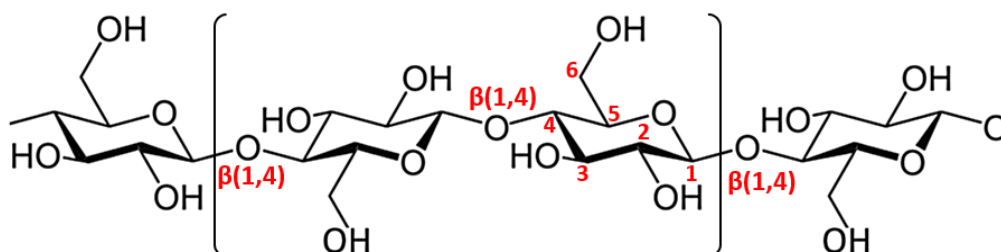
A CMC e o St são dois exemplos de polímeros comumente usados na formulação de biotintas (Habib et al., 2018; Kyle et al., 2017). A CMC é um polissacarídeo derivado da celulose, que é solúvel em água e forma um hidrogel quando em contato com líquidos. Essa propriedade torna a CMC uma escolha

popular para a formulação de biotintas, pois ajuda a criar uma estrutura suporte onde consegue manter as células no lugar durante o processo de impressão e pós impressão (Maver et al., 2020). Já o St é outro polissacarídeo encontrado em plantas e sementes, que também pode ser utilizado na formulação de biotintas. O St tem propriedades hidrofílicas que ajudam a aumentar a viscosidade da biotinta, o que pode melhorar a capacidade de impressão da biotinta e a retenção das células (Butler et al., 2020). Além disso, tanto a CMC quanto o St são materiais biocompatíveis, o que significa que eles são menos propensos a causar uma resposta imune negativa ou a morte celular, principalmente quando aliados à biomoléculas e/ou fatores de crescimento celular. Ambos esses polissacarídeos também podem ser modificados quimicamente para ajustar suas propriedades físicas e químicas para se adequarem melhor à finalidade desejada (Cochis et al., 2018; Mancha Sánchez et al., 2020).

### 3.5 Carboximetilcelulose (CMC)

Nos últimos anos, os polissacarídeos naturais têm se tornado um tema de grande interesse entre os pesquisadores devido às suas propriedades desejáveis, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, boa formação de gel e estabilidade pós-impressão (Kanwar & Vijayavenkataraman, 2021). Cientistas têm estudado a bioatividade e biocompatibilidade de muitos tipos diferentes de polissacarídeos, como a quitosana, dextrana, ácido hialurônico, celulose, alginato e goma xantana. A celulose é o polímero natural mais abundante e renovável da Terra, composto por glicose, e é amplamente utilizado em diversas aplicações industriais e biomédicas. Trata-se de um polissacarídeo linear que fornece suporte mecânico às células de plantas, bactérias, algas e fungos, sendo um componente estrutural essencial (Xie et al., 2018; Zennifer et al., 2021). A celulose possui uma estrutura química composta por uma unidade anidra de moléculas de D-glicose ligadas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1,4)$  (**Figura 5**). O carbono anomérico não redutor (C1) é encontrado em uma das extremidades da cadeia, enquanto a forma hemiacetal redutora da D-glicopirranose (C4) é localizada na outra extremidade. A ligação  $\beta$  faz com que a cadeia de celulose gire 180 graus,

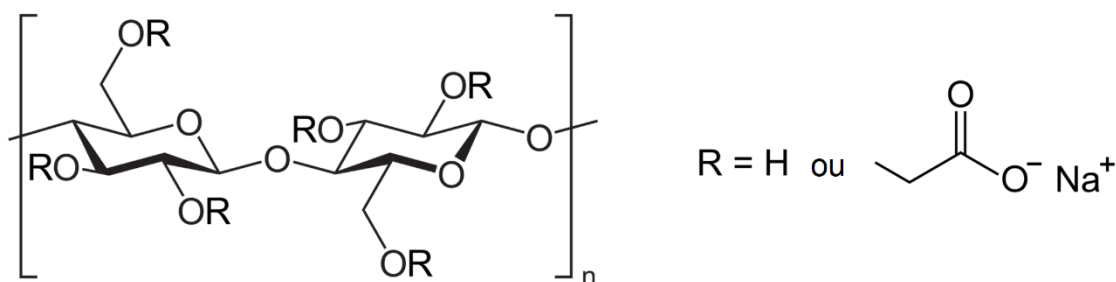
resultando em três grupos –OH reativos (posições C6, C2 e C3) em uma única unidade de glicose que podem formar fortes ligações de hidrogênio intermoleculares com cadeias adjacentes (Dai et al., 2019; Heinze et al., 2018).



**Figura 5:** Representação da estrutura da celulose.

As fortes ligações de hidrogênio intermoleculares entre as fibrilas individuais de celulose permitem que ela seja semicristalina, rígida e insolúvel em água, formando longas fibras paralelas. No entanto, as modificações químicas dos grupos hidroxila na celulose demonstraram aumentar significativamente sua solubilidade, tornando-a mais versátil para várias aplicações. Além disso, essas modificações têm sido eficazes na melhoria do processamento e manuseio da celulose, permitindo sua adaptação para aplicações específicas (Chen et al., 2018). CMC é um derivado da celulose obtido por meio de modificação química. O CMC pode ser produzido por métodos de síntese simples e com matérias-primas acessíveis, o que é a principal razão para o grande potencial de mercado em larga escala do CMC em comparação com outros derivados da celulose. A modificação da CMC consisti na substituição do grupo hidroxila nas cadeias de glicopirranose da celulose por grupos carboximetil ( $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ ), conforme a **Figura 6** (Roy et al., 2018). A presença desses grupos confere ao CMC diversas propriedades notáveis, como alta hidrofilicidade, boas propriedades mecânicas, capacidade de formação de hidrogéis controlados quimicamente e biocompatibilidade. Por conta dessas características, o CMC é bastante utilizado nessa categoria de materiais (Zennifer et al., 2021). Devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, a CMC tem sido proposta para várias aplicações na área da bioquímica. Além disso, o CMC pode ser facilmente reticulado e convertido em hidrogéis usando vários métodos físicos e químicos, tornando-a um material promissor para biotintas em aplicações na engenharia de tecidos. Muitas pesquisas têm se

concentrado na síntese de tintas CMC buscando boa estabilidade e eficiência durante e após a impressão (Mallakpour et al., 2021; Zennifer et al., 2021).



**Figura 6:** Representação da estrutura da CMC.

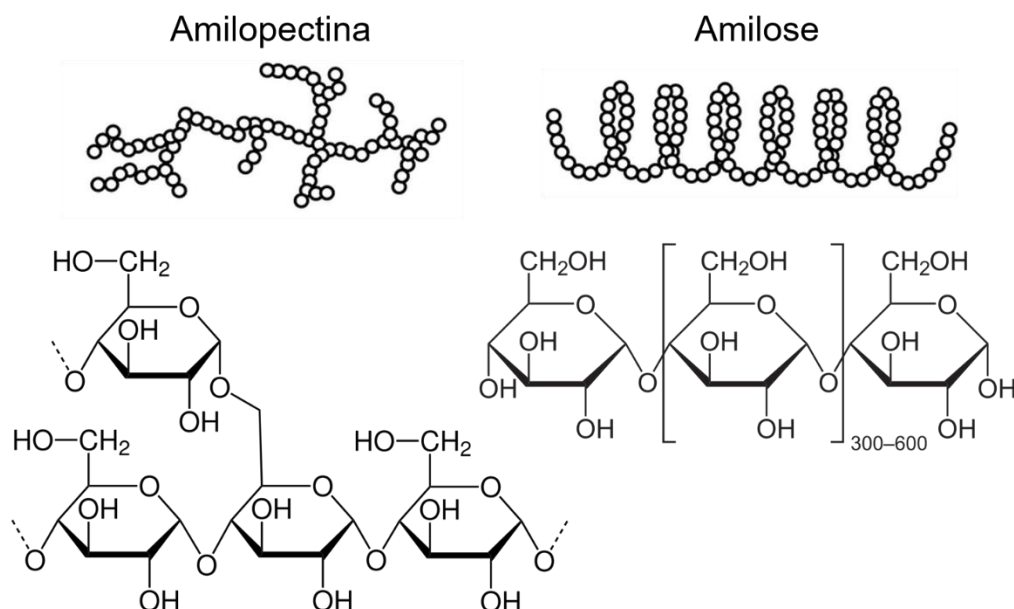
### 3.6 Amido (St)

O St é o principal polissacarídeo de reserva das plantas, que se apresenta na forma de grânulos discretos de amilose e amilopectina. A amilose é um polímero linear que compõe de 20 a 30% do grânulo de St. O teor de amilose no St de milho, por exemplo, varia de 25 a 28% em diferentes genótipos. (Apriyanto et al., 2022). O St é composto por cadeias longas de unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha(1,4)$ , com um grau de polimerização que varia de  $3 \times 10^2$  a  $1 \times 10^4$ . Ele é encontrado na forma de grânulos de amilose e amilopectina (**Figura 7**). A amilopectina é uma molécula ramificada, que compõe 70–80% do grânulo, com cadeias de glicose unidas por ligações do tipo  $\alpha(1,4)$  e ligações  $\beta(1,6)$ , com um grau de polimerização de cerca de  $10^8$ . Quando aquecido na presença de água, o St passa pelo processo de gelatinização, no qual os grânulos incham, a amilopectina é liberada e há perda de birrefringência (Palanisamy et al., 2020).

As propriedades do St dependem de características físicas e químicas, como tamanho e distribuição do grânulo e relação amilose/amilopectina. O conteúdo de amilose no St varia dependendo da fonte botânica, bem como das condições climáticas e do tipo de solo durante o crescimento. Por isso, é evidente que as exigências das propriedades do St são muito diferentes para diversas aplicações (Ogunsona et al., 2018). As propriedades físico-químicas dos amidos nativos, em muitos casos, não são ideais para processamento adicional, e esforços são necessários para adaptá-los para uso industrial específico. Os grânulos de St nativos são insolúveis em água, em grande parte inertes e, também, resistentes à hidrólise enzimática. Eles também tendem a ser bastante



retrogradados em relação às mudanças de pH, temperatura e forças de cisalhamento. Assim, frequentemente é necessário modificar o St para melhores características físicas e funcionais (Siroha et al., 2019).



**Figura 7:** Estrutura química do amido de milho constituindo os polímeros naturais amilopectina e amilose. A amilopectina é um polímero ramificado, enquanto a amilose é um polímero linear formando uma hélice.

Diferentes técnicas são utilizadas para a modificação do St, incluindo métodos químicos, físicos, enzimáticos e genéticos, seja individualmente ou em combinação. As modificações físicas têm sido amplamente exploradas devido à sua simplicidade, sustentabilidade ambiental e ausência de uso de produtos químicos (Q. Wang et al., 2020). A pré-gelatinização é um dos métodos de modificação física mais comumente utilizados que pode melhorar a absorção e capacidade de expansão do St em água fria, resultando em maior viscosidade e propriedades espessantes do sistema (H. Ma et al., 2022).

A técnica de pré-gelatinização é um tipo de modificação física em Amidos, realizada através de aquecimento e cisalhamento mecânico. A modificação pré-gelatinizada é obtida através do aquecimento adequado, seguido de secagem e moagem. O objetivo é produzir o St com solubilidade instantânea em água fria e capacidade de espessamento/gelificação (He et al., 2020). O St pré-gelatinizado, também conhecido como St "instantâneo", pode ser dissolvido em água em temperaturas abaixo da gelatinização dos Amidos nativos (Hong & Liu, 2018). A

propriedade de intumescimento é um parâmetro importante das propriedades de hidratação do St, que é significativamente afetado pela interação entre as cadeias de St amorfo e cristalino. Durante a gelatinização, a estrutura cristalina do St é interrompida devido à quebra de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, resultando em mudanças na capacidade de ligação do St com a água (Ye et al., 2018). O St pré-gelatinizado tem poder de intumescimento e solubilidade significativamente maiores em água fria do que o St nativo. Isso pode ser porque o processo de pré-gelatinização leva ao enfraquecimento de ligações de hidrogênio intramoleculares e à diminuição da interação entre moléculas de amilose e amilopectina e entre cadeias de amilopectina. Contudo, o St pré-gelatinizado, como um tipo de St fisicamente modificado, é considerado seguro e ecologicamente correto, tornando-o mais facilmente aceito. Consequentemente, o uso de St pré-gelatinizado em *scaffolds* apresentam um grande potencial na pesquisa (dos Santos et al., 2019).

Os biomateriais derivados de St têm sido propostos como uma alternativa viável para aplicações biomédicas, incluindo o uso como *scaffolds* para cultivo celular. Até o momento, o amido tem sido principalmente explorado como material biomédico em sistemas de liberação de medicamentos e na fabricação de hidrogéis. Dentre as diversas aplicações do St, pesquisas demonstram um potencial para o desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecidos. Assim como a maioria dos polímeros naturais, o St pode orientar o crescimento e desenvolvimento celular devido à sua estrutura altamente organizada (Omedi et al., 2019). O St apresenta propriedades reológicas únicas que o tornam um material adequado para o desenvolvimento de biotintas usadas na 3DP. As propriedades das tintas de St têm mostrado potencial para esse fim devido ao seu comportamento pseudoplástico. Esse comportamento permite que elas fluam através de uma ponteira sob pressão, mas se solidifiquem quando a pressão é removida. Além disso, as propriedades de impressão e a taxa de degradação das biotintas contendo St, resultam em um aumento na concentração de glicose no meio de cultura. A glicose é uma fonte primária de energia para as células neuronais e um aumento na sua concentração pode promover o crescimento celular (Ye et al., 2016). Contudo, as propriedades dos materiais à base de St impressos em 3D nem sempre atenderam às expectativas (Kyle et al., 2017). Por exemplo, as tintas à base de St muitas vezes têm baixa

resistência ao calor, pressão e corte, e tendem a sofrer retrogradação durante o armazenamento, características indesejáveis para muitas aplicações industriais. Além disso, as propriedades dos materiais à base de St impressos em 3D são altamente sensíveis aos procedimentos de processamento, incluindo tipos de impressora 3D, parâmetros de operação da impressora, formulações de tinta e condições ambientais. Por esta razão, pesquisadores têm investigado métodos para superar esses desafios. Estudos preliminares mostram que a utilização do St na preparação de *scaffolds* requerem a utilização de outros materiais para melhorar as propriedades mecânicas e químicas desses suportes (Koski et al., 2018). Neste caso, o uso da CMC pode trazer estabilidade e printabilidade as biotintas compostas destes dois polímeros.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Reagentes

- Carboximetilcelulose (CMC) com grau de substituição igual a 0,5 (P.A., Synth, Brasil);
- Amido pré-gelatinizado de milho (doadado pelo LabGrãos/UFPel);
- Ácido cítrico (P.A., Synth, Brasil);
- Solução tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 (P.A., Synth, Brasil);
- Cloreto de sódio (NaCl) (P.A., Synth, Brasil);
- Ácido clorídrico 37% (HCl) (P.A., Synth, Brasil);
- Hidróxido de Sódio (NaOH) (P.A., Synth, Brasil);
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (P.A., Sigma-Aldrich, Brasil).

### 4.2 Procedimentos experimentais

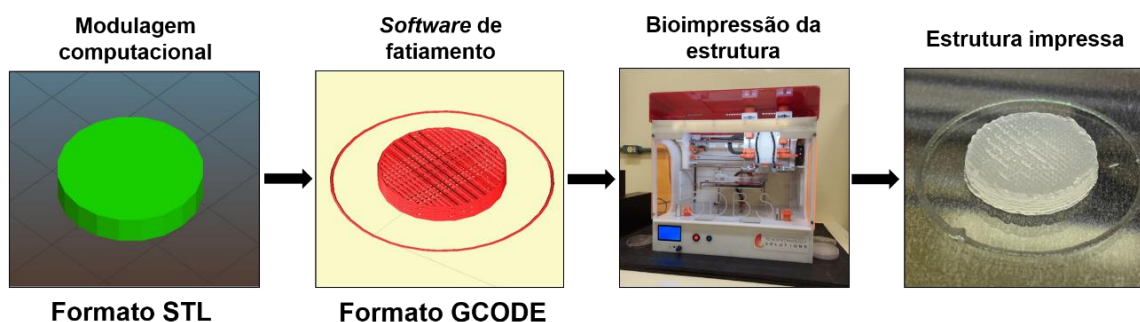
#### 4.2.1 Preparo e caracterização das biotintas CMC/St

Dispersões aquosas de CMC/St em proporções mássicas diferentes (**Tabela 1**) foram preparadas misturando manualmente em um almofariz os polímeros com água (10 mL). Essas dispersões foram termicamente tratadas à 120 °C por 20 min. Após uma avaliação preliminar, apenas a dispersão da entrada 5 (**Tabela 1**) foi selecionada para posterior aditivação com o AC (reticulante). Nesse caso, as quantidades de AC adicionadas à dispersão CMC/St selecionada são descritas na **Tabela 2**.

A viscosidade das dispersões de CMC/St (com e sem AC) foram caracterizadas, em triplicata, usando um reômetro rotativo Brookfield RST-CPS (Brookfield Engineering, EUA) equipado com um rotor (*spindle*) S-25. O reômetro foi acoplado a um controlador de temperatura Peltier PTR-I, no qual fixou-se a temperatura em 22 °C utilizada na impressão. A viscosidade de cada dispersão foi registrada variando livremente a tensão de cisalhamento e fixando a taxa de cisalhamento em 3 Hz. Esse último parâmetro foi fixado para simular as condições de impressão utilizadas. A printabilidade (parâmetro qualitativo relacionado à qualidade do filamento impresso) das dispersões preparadas também foi avaliada usando o teste de queda de filamento e o teste de geometria da forma dos poros (Gillispie et al., 2020; Paxton et al., 2017).

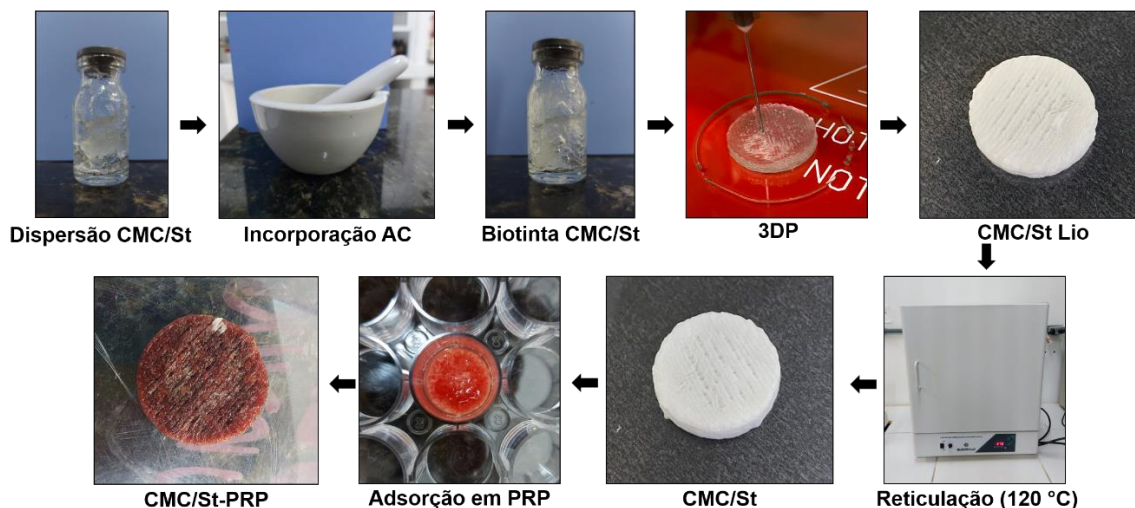
#### 4.2.2 Impressão dos hidrogéis CMC/St

Inicialmente, o projeto do hidrogel foi criado utilizando o software Slic3r em um arquivo CAD e, em seguida, convertido para o formato STL, o que possibilitou a separação da estrutura em camadas para a impressão 3D. Essa etapa de fatiamento foi realizada através do software gráfico Prontface, conforme mostrado no **Esquema 1**.



**Esquema 1:** Etapas envolvidas no processo de bioimpressão 3D.

As biotintas CMC/St estéreis imediatamente após a incorporação do AC foram depositadas em seringas de impressão de 5 mL e extrusadas a 22 °C através de uma agulha cônica 22G (0,41 mm de diâmetro interno) a uma taxa de alimentação de 30% e velocidade de deposição de 30% em relação ao projeto. Os hidrogéis foram fabricados em formato cilíndrico, com 6 camadas, medindo 17,62 mm de diâmetro e 3,48 mm de altura. Essas impressões foram realizadas em um padrão hachurado de 90°, utilizando uma impressora 3D GENESIS (3DBS, Brasil). Imediatamente após a impressão, os hidrogéis foram congelados a -20 °C em um freezer e liofilizados por 24 h à -55 °C (Liofilizador LS 3000 B, TERRONI, Brasil). Os hidrogéis liofilizados foram então reticulados por tratamento térmico a 120 °C por 7 min e armazenados à temperatura ambiente (**Figura 8**).



**Figura 8:** Fluxograma de trabalho.

#### 4.2.3 Preparo do PRP

Para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), foi seguido o protocolo descrito por Vendramin et al. (2006), com modificações. Resumidamente, foi coletada uma quantidade variável (a depender do volume final desejado de PRP) de sangue, armazenados em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio. Após a coleta, ocorre uma primeira centrifugação em 400 rpm por 10 min, onde há a separação do sangue em 3 partes: Plasma (que contém pouca quantidade de plaquetas), interfase (que contém células nucleadas e a maior quantidade de plaquetas) e a porção vermelha do sangue, composta majoritariamente de eritrócitos. Aspira-se a totalidade das duas primeiras fases e transfere-se o material a um tubo cônico tipo Falcon, o qual uma quantidade pequena de eritrócitos acaba por ser aspirado juntamente com as duas primeiras fases por conta do processo manual de aspiração, caracterizando a cor vermelha do PRP. Após, uma segunda centrifugação, que se dá em 800 rpm, acaba formando novamente as 3 fases, porém formando um botão eritrocitário no fundo do tubo, e uma porção grande de plasma, chamado de plasma pobre em plaquetas. Desse plasma, é retirado em torno de 2/3 do volume total, sendo suspenso através de agitação manual (vórtex), o volume final de plasma, obtendo-se o PRP (Vendramin et al., 2006).

#### **4.2.4 Preparo dos hidrogéis CMC/St carregados com PRP**

Os hidrogéis CMC/St impressos foram colocados individualmente em placas de 24 poços e incubados com 1,5 mL de PRP ( $277 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu\text{L}$ ) ativado por 30 min (tempo estabelecido após testes posteriores) a 22 °C. As amostras CMC/St-PRP foram usados imediatamente após a preparação.

### **4.3 Caracterização dos hidrogéis**

#### **4.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

Espectros de FTIR foram obtidos utilizando um equipamento da marca Shimadzu, modelo IR-Affinity-1 (Japão). Para as análises, foram preparadas pastilhas contendo as amostras sólidas previamente trituradas e misturadas a KBr anidro. As análises foram realizadas em um intervalo de comprimento de onda de 450 a 3800  $\text{cm}^{-1}$  com uma resolução de 2,0  $\text{cm}^{-1}$  e 128 varreduras por amostra.

#### **4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A avaliação morfológica das amostras CMC/St Lio, CMC/St e CMC/St-PRP foram realizadas a partir de imagens obtidas com auxílio de um MEV da marca JEOL, modelo JSM-6610LV (EUA). Para obter as imagens, a porção superficial de cada amostra fraturada (utilizando  $\text{N}_{2(l)}$ ) foi primeiramente revestida com uma fina camada de Au utilizando um metalizador DentonVacuum, modelo Desky (EUA). Posteriormente, as imagens foram capturadas a partir das regiões de superfície e de fratura das amostras com uma aceleração potencial de 15 kV. Essas análises e procedimentos foram feitos no CEME-Sul da FURG.

#### **4.3.3 Análise termogravimétricas (TGA)**

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas no equipamento SDT Q600, da marca TA Instruments, modelo TA60 (EUA) em uma faixa de temperatura de 30 a 500 °C, sob um fluxo de  $\text{N}_{2(g)}$  de 20 mL/min, a uma taxa de

aquecimento de 10 °C/min. Amostras com peso de 4,0 mg foram pesadas previamente e, então, colocadas em um portador de amostras de platina.

#### 4.3.4 Análises de propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos hidrogéis CMC/St e CMC/St-PRP foram investigadas utilizando um Texturômetro TA. XT Plus Extra Lab (Reino Unido). Essas análises foram feitas no modo compressão, utilizando as seguintes condições: Velocidade pré-teste: 2 mm/s; velocidade teste: 0,5 mm/s; e até a deformação: 129%. As amostras de CMC/St possuíam formato cilíndrico com dimensões de 20,6 x 3,6 mm (diâmetro x altura). Já as amostras CMC/St-PRP tinham dimensões de 20,4 x 3,7 mm. Para cada hidrogel um total de 3 corpos de prova foram avaliados.

Foi realizada uma regressão linear nessa fração, resultando no cálculo do módulo de elasticidade ( $E$ ), que é determinado pelo ângulo dessa reta. A densidade de reticulação foi calculada usando a **Equação 1**, conforme descrito no trabalho de (Chung & Washburn, 2012).

$$N = \frac{E}{3k_B T} \quad (1)$$

Onde,  $N$  ( $1/m^3$ ) é a densidade efetiva de reticulação,  $E$  (kPa) é o módulo de elasticidade,  $k_B$  (J/K) é a constante de Boltzmann e  $T$  (K) é a temperatura absoluta.

#### 4.3.5 Grau de intumescimento

A capacidade de intumescimento dos hidrogéis CMC/St foram avaliadas utilizando PBS, DMEM e PRP. Para isso, as amostras foram colocadas individualmente em placas de 24 poços contendo 1,5 mL de PBS (pH 7,4), DMEM (1 % m/v) ou PRP ativado ( $277 \times 10^3$  plaquetas/ $\mu$ L) e incubadas a 37 °C por 12 h. Em tempos pré-estabelecidos, os hidrogéis foram retirados da solução, o excesso de fluido foi removido cuidadosamente e o peso e as dimensões de cada amostra foram registrados usando uma balança analítica e um paquímetro,



respectivamente. O procedimento experimental foi realizado em triplicata para cada amostra. A partir das massas em função do tempo, o grau de intumescimento foi calculado utilizando a **Equação 2**.

$$\text{Grau de intumescimento (\%)} = \frac{m_w - m_d}{m_d} \times 100 \quad (2)$$

Onde,  $m_d$  (g) é a massa do hidrogel seco e  $m_w$  (g) a massa do hidrogel intumescido em um intervalo de tempo  $t$ .

#### 4.3.6 Estabilidade

A estabilidade das amostras de hidrogel fabricadas foi avaliada a partir da perda de massa das mesmas após incubação em tampão PBS (pH 7,4). Para isso, um hidrogel completo, impresso com um peso de 80 mg, foi submerso no meio de incubação e mantido a uma temperatura de 37 °C por até 21 dias. Após esse período, as amostras foram recuperadas, lavadas com água destilada, liofilizadas e pesadas novamente. O percentual de perda de massa foi calculado utilizando a **Equação (3)**:

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

onde  $m_f$  e  $m_i$  são os valores de massa das amostras após e antes da incubação em PBS. Esse experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.3.7 Teste do iodo

Para o teste do iodo, primeiramente, os hidrogéis CMC/St Lio e CMC/St intumescidos foram submetidos a um processo de desidratação/intumescimento usando água e etanol como solventes. Em seguida, os hidrogéis desidratados foram imersos em uma solução alcoólica de iodo com concentração de 0,1

mmol/L a uma temperatura de 25 °C até que ocorresse a desidratação completa. Durante esse processo, foi observado que as amostras encolheram e adquiriram uma coloração marrom, indicando a absorção de iodo pelas matrizes de hidrogel. Posteriormente, os hidrogéis desidratados foram imersos em água para serem re-intumescidos. Após cerca de 12 h, os hidrogéis foram observados e fotografados em suas respectivas soluções a fim de avaliar o seu comportamento e a distribuição do St em suas matrizes.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Caracterização da biotinta CMC/St

Nesse trabalho foram fabricados hidrogéis por 3DP utilizando uma biotinta de CMC/St. A CMC foi selecionada devido à sua habilidade de gerar tintas/biotintas passíveis de impressão e de suas propriedades bioativas, incluindo a capacidade de promover a migração celular (Singh & Ramakrishna, 2017). Tais características são interessantes considerando a possível aplicação dos hidrogéis fabricados como *scaffolds*. Já o St foi escolhido pois esse apresenta biocompatibilidade, facilidade de processamento e ajuste da rigidez mecânica tanto da biotinta quanto da matriz de hidrogel. Além disso, o ajuste da rigidez mecânica oferecem um suporte adequado para o crescimento e diferenciação celular (Zhuang et al., 2021). Dentre os parâmetros relevantes à presente proposta, temos o grau de substituição (DS) da CMC, o qual influencia diretamente às propriedades físico-químicas e biológicas da biotinta (Shui et al., 2017; Zennifer et al., 2021). O grau de substituição está intrinsecamente relacionado à proporção de grupos carboximetilado ancorados nas unidades de glicose presentes na CMC, exercendo uma influência significativa sobre a estrutura, rigidez e bioatividade desses compostos (X. Zhu et al., 2021). No presente estudo, utilizou-se uma CMC com DS igual a 0,5.

Como primeira etapa, foram realizados estudos para avaliar a concentração e proporção dos polissacarídeos CMC/St na biotinta considerando parâmetros como extrudabilidade, fidelidade no formato do filamento e reprodutibilidade. O conjunto desses parâmetros foi utilizado para definir qualitativamente a printabilidade das biotintas. Dentre as várias amostras testadas, a biotinta com composição descrita na entrada 5 da **Tabela 1** foi a única selecionada para o uso posterior devido à sua excelente capacidade de impressão. É importante destacar que as biotintas com concentrações mais elevadas de CMC/St, ou seja, com maior viscosidade, apresentaram desempenho semelhante, porém exigiram maior tempo e pressão de extrusão, chegando ao limite da capacidade da impressora utilizada.

**Tabela 1:** Avaliação da capacidade de impressão proporcional ao polímero.

Entrada	Quantidade CMC (%) (m/v)	Quantidade St (%) (m/v)	Razão CMC/St	Printabilidade
1	4,0	0,0	1:0	Não adequada
2	2,0	5,0	1:2,5	Não adequada
3	1,2	7,0	1:5,8	Não adequada
4	2,8	3,0	1:1,1	Não adequada
5	3,5	3,0	1:0,8	Adequada
6	4,2	3,0	1:0,7	Adequada

A seleção de materiais com alta printabilidade desempenha um papel crucial no êxito da 3DP, uma vez que impacta diretamente na qualidade e nas propriedades finais dos hidrogéis. Materiais com boa printabilidade devem exibir características como viscosidade apropriada para a extrusão, capacidade de manter a forma desejada após a deposição, aderência adequada entre as camadas impressas e estabilidade estrutural durante todo o processo de impressão (Kyle et al., 2017; Naghieh & Chen, 2021). Após a etapa de impressão, os materiais fabricados foram liofilizados, visando preservar sua estrutura 3D enquanto a água era removida. Posteriormente, os hidrogéis foram reticulados para aumentar sua resistência mecânica. O AC foi selecionado como um agente de reticulação, considerado seguro e ecologicamente correto, capaz de modular a integridade do hidrogéis (Štiglic et al., 2022). Dessa forma, diferentes quantidades de AC (**Tabela 2**) foram adicionadas à biotinta de composição igual à entrada 5 da **Tabela 1**.

**Tabela 2:** Avaliação da quantidade de AC, printabilidade e propriedades dos scaffolds após a impressão.

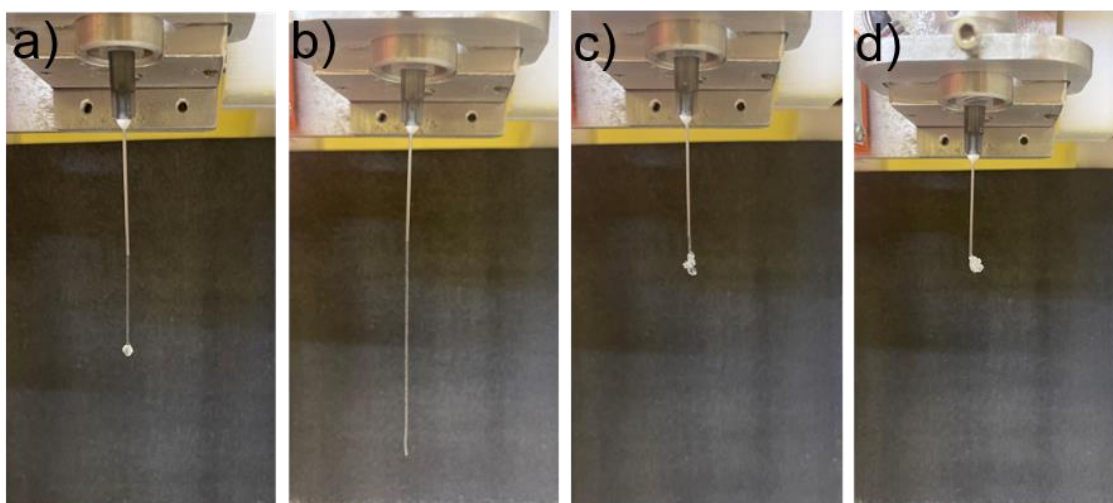
Entrada	Quantidade de AC (%) (m/m) <sup>a</sup>	Printabilidade	Forma e estrutura
1	0	Adequada	Sem fidelidade de forma
2	15	Adequada	Muito boa
3	20	Adequada	Sem fidelidade de forma
4	25	Não adequada	-

<sup>a</sup> Percentual em relação à massa total de CMC/St na biotinta.

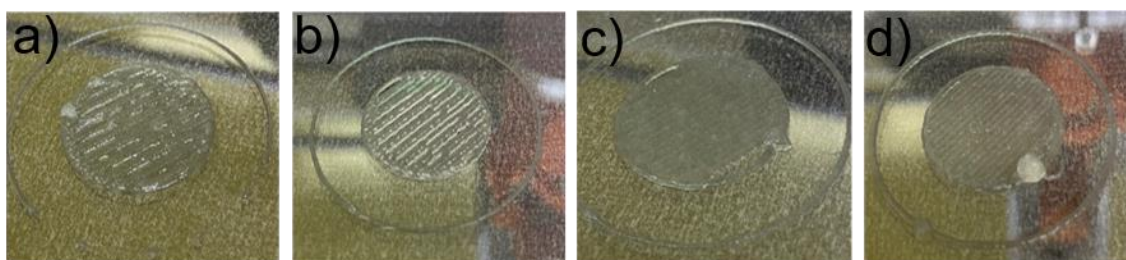
Os parâmetros de design do hidrogel foram predefinidos no software Slic3r no formato SLT, após a realização de testes que levaram à seleção do design mais adequado. Nesse processo, foram estabelecidos o espaçamento entre os filamentos, a orientação dos mesmos e a espessura da camada. A biotinta foi caracterizada em termos de seu comportamento de fluxo e propriedades físicas. Por fim, os parâmetros do processo de impressão, como altura da seringa em relação à mesa, temperatura, taxa de fluxo e velocidade, foram determinados experimentalmente, levando em consideração simultaneamente os parâmetros relacionados ao desenho do hidrogel. O mecanismo de reticulação utilizando AC foi estudado após a etapa de impressão, uma vez que ocorre posteriormente à deposição do material (Naghieh & Chen, 2021).

Os testes preliminares desempenham um papel importante na avaliação da capacidade de impressão da biotinta, atendendo a dois requisitos fundamentais para a bioimpressão por extrusão. O primeiro requisito é a capacidade da biotinta em formar filamentos cilíndricos consistentes, garantindo a deposição precisa do material. O segundo requisito é a habilidade de empilhar camadas sucessivas para formar estruturas coerentes, onde a primeira camada desempenha um papel crucial, exigindo fidelidade de forma e estabilidade. Esses testes preliminares fornecem uma avaliação rápida e eficaz da capacidade da biotinta de atender a esses requisitos, sendo essenciais para o sucesso da bioimpressão por extrusão (Paxton et al., 2017). Conforme ilustrado na **Figura 9**, a adição de 15% (m/m) de AC à composição da biotinta resultou na fabricação de hidrogéis com uma estrutura claramente definida nas 6 camadas impressas, alta precisão de impressão e uma altura ilimitada dentro dos parâmetros de teste. Já os testes de queda do filamento demonstraram que a biotinta com 15% (m/m) de AC possui características de gel adequadas após a extrusão, produzindo um filamento consistente, contínuo e com uma extremidade lisa no bocal da seringa. No entanto, à medida que a concentração de AC aumentou ( $> 20\%$  m/m), foi observado uma excessiva gelatinização, resultando na formação de gotículas na ponta do bocal da seringa e impedindo a formação de um filamento contínuo. Como resultado, a formação de macroporos entre as camadas não pôde ser observada, uma vez que os filamentos se fundiam à mesa de impressão, perdendo sua estrutura e

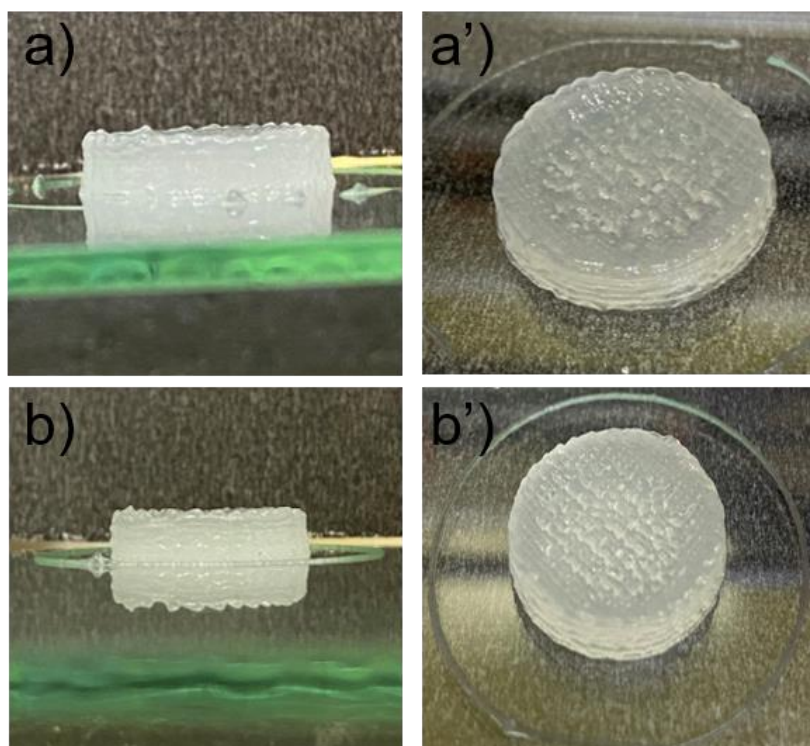
colapsando (**Figura 10**). Essa mesma observação foi feita para a amostra fabricada com a biotinta sem AC. No entanto, foi observado um leve colapso na estrutura durante a impressão, mesmo sendo possível realizar a impressão completa (**Figura 11**). Comparando as biotintas com 0 e 15% (m/m) de AC fica evidente que a adição do reticulante é essencial não apenas para a reticulação do material após a liofilização. A reticulação confere estabilidade para aplicações futuras, mas também é fundamental para obter as propriedades ideais de impressão da biotinta.



**Figura 9:** Teste de filamento para as biotintas aditivadas com 0% (a), 15% (b), 20% (c) e 25% (d) (m/m) de AC.



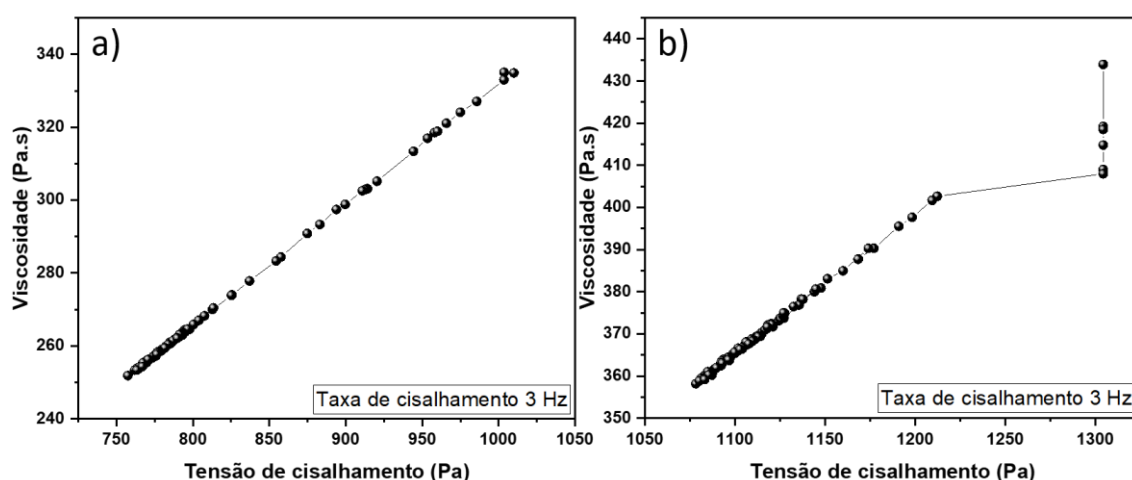
**Figura 10:** Avaliação da primeira camada impressa com as biotintas aditivadas com 0% (a), 15% (b), 20% (c) e 25% (d) (m/m) de AC.



**Figura 11:** Resultados de empilhamento de 6 camadas para os hidrogéis impressos com biotintas aditivadas com 0% (a,a') e 15% (b,b') (m/m) de AC.

Complementarmente a observações com relação a printabilidade das biotintas, análises de viscosidade foram realizadas. De modo geral, essas análises foram realizadas a fim de acompanhar o comportamento viscosimétrico das biotintas durante o processo de impressão (Amorim et al., 2021). Os resultados das medições da viscosidade de cisalhamento das biotintas com 0% e 15% (m/m) de AC em relação à variação da tensão de cisalhamento, com uma taxa fixa de 3 Hz, são apresentados na **Figura 12**. Ambas as biotintas exibiram um comportamento semelhante, ou seja, a viscosidade aumenta com o aumento da tensão aplicada. Foi observado que a adição de 15% (m/m) de AC resultou em um aumento significativo na viscosidade da biotinta. Além disso, essa formulação demonstrou ser a mais resistente a tensões mais elevadas em comparação com a tinta sem AC. Essa característica proporciona uma maior margem de trabalho sem atingir o limite da biotinta. Esse aumento de viscosidade é crucial para formar estruturas homogêneas com geometrias de poros precisas, semelhantes a quadrados ideais, independentemente do tamanho dos poros (J. Jia et al., 2014). Como resultado dessas análises, as

dispersões de CMC/St aditivadas com 15% (m/m) de AC foram selecionadas a etapa de impressão dos hidrogéis. É importante destacar que a sobrevivência e a multiplicação das células em estruturas bioimpressas produzidas por extrusão são favorecidas quando as células são expostas a níveis mínimos de estresse, embora isso possa variar dependendo do tipo de célula (Masri et al., 2022). No entanto, vale destacar que nosso objetivo é criar um suporte acelular e adicionar as células somente após a conclusão da fabricação do suporte. Dessa forma, não há necessidade de nos preocuparmos com estudos relacionados aos efeitos da extrusão da tinta sobre as células.



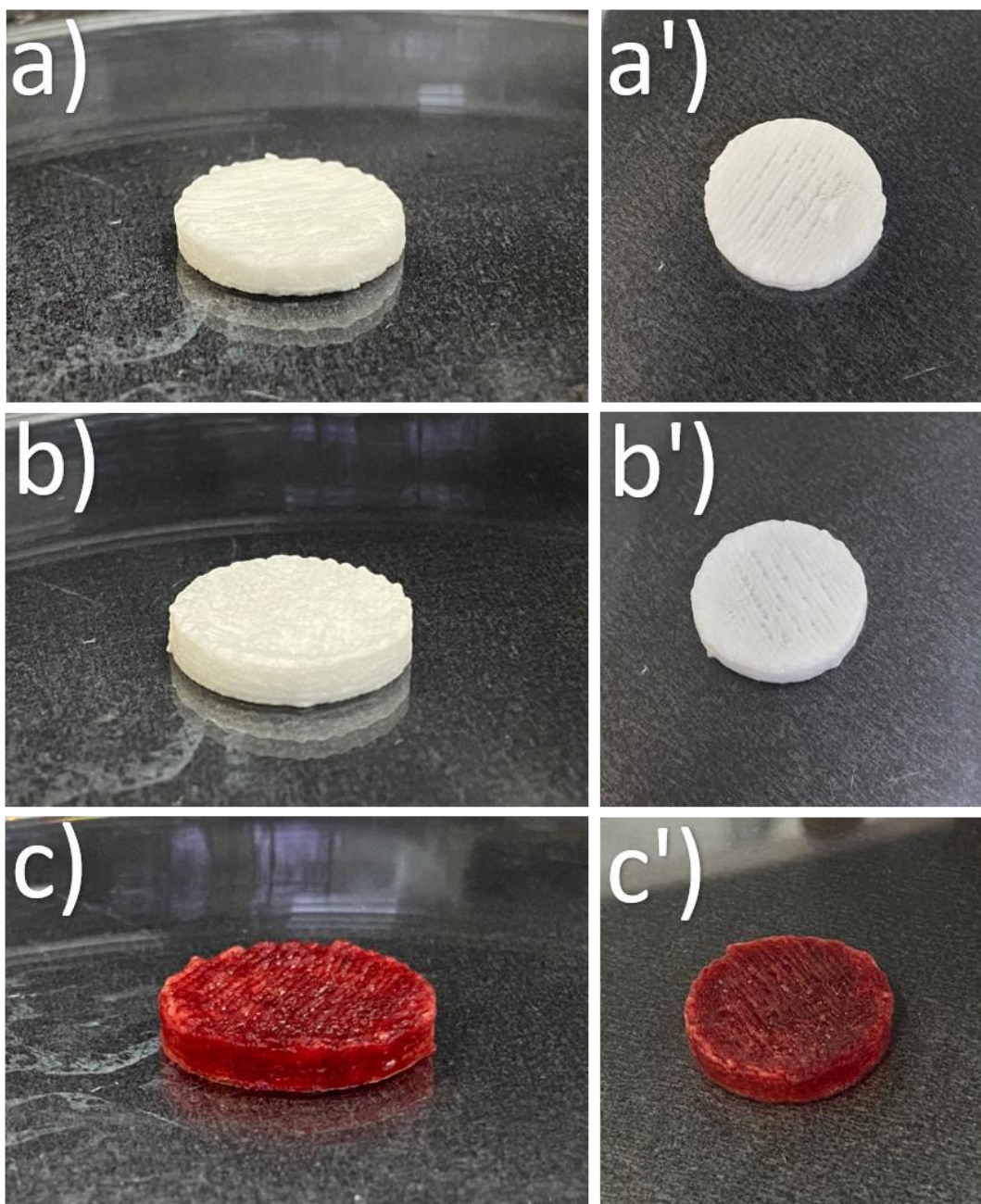
**Figura 12:** Dados de viscosidade em relação à tensão de cisalhamento para a biotinta sem AC (0%) (a) e com 15% (m/m) (b) de AC, realizada a 22°C, sob uma taxa de cisalhamento de 3 Hz.

## 5.2 Caracterização dos hidrogéis

Os hidrogéis foram fabricados no formato cilíndrico, com um diâmetro de 17,62 mm, altura de 3,48 mm. Utilizou-se um padrão hachurado de 90° durante a 3DP, conforme o desenho definido no software de impressão. As estruturas resultantes mostraram uma alta fidelidade de impressão em relação ao modelo 3D original. Após a impressão, os hidrogéis foram submetidos ao processo de liofilização para preservar sua estrutura 3D durante a remoção da água e, em seguida, foram reticulados para aumentar sua resistência mecânica. Esperava-se que o processo de liofilização promovesse a desidratação do AC, resultando na formação de espécies reativas de anidrido (Diaz-Gomez et al., 2022; Mohan



et al., 2020; Štiglic et al., 2022). Os hidrogéis foram reticulados por meio de uma reação de esterificação, na qual os grupos hidroxila da CMC e do St reagiram com os grupos carboxílicos do AC. Após investigações iniciais, um tempo de reticulação de 7 min a 120 °C foi determinado como adequado para obter amostras com propriedades de intumescimento e uma estrutura flexível capaz de se adaptar a aplicação alvo (*scaffolding*). A **Figura 13** apresenta imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio, CMC/St e CMC/St-PRP após o processo de liofilização e reticulação por tratamento térmico. A reticulação não afetou as propriedades de diâmetro e altura dos hidrogéis, que se mantiveram aproximadamente em 17,62 mm e 3,48 mm, respectivamente. Isso indica que a reticulação não causou alterações nessas características da amostra. Além disso, não foi observada nenhuma mudança de cor significativa após a reticulação do hidrogel. No entanto, é importante mencionar que a observação de uma coloração avermelhada no hidrogel após a adsorção do PRP pode estar relacionada a diferentes fatores (**Figura 13c,c'**). Uma possível explicação é a interação entre os componentes presentes no PRP e a matriz do hidrogel. A presença de hemoglobina, que confere a cor vermelha ao sangue, pode ser uma das causas dessa coloração avermelhada. O PRP contém uma pequena quantidade de hemácias (glóbulos vermelhos), e durante a adsorção no hidrogel, essas hemácias podem ficar retidas ou aderir à sua superfície. Isso pode resultar na liberação de hemoglobina e consequentemente na tonalidade avermelhada observada no hidrogel (Leonardi et al., 2020; Sadeghi-Ataabadi et al., 2017).

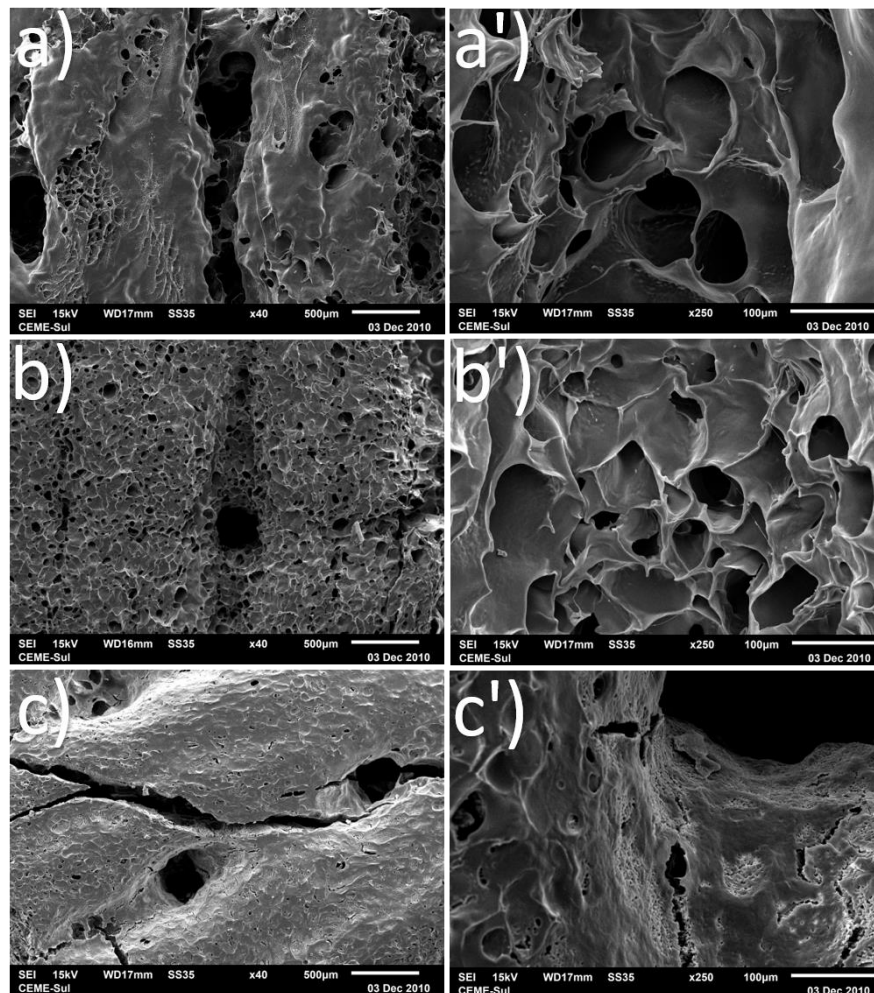


**Figura 13:** Imagens fotográficas das amostras de hidrogel fabricadas: CMC/St Lio (a,a'), CMC/St (b,b') e CMC/St-PRP (c, c').

A morfologia dos hidrogéis impressos foi avaliada utilizando imagens obtidas por MEV a partir da superfície e da região fraturada dos mesmos (**Figura 14**). Ainda, o tamanho dos poros dos hidrogéis foram avaliados utilizando as imagens obtidas por MEV e o software Size Meter®. Essas análises permitiram determinar o efeito da reticulação e do carregamento de PRP (CMC/St-PRP) na estrutura dos hidrogéis. Os resultados obtidos mostraram que os hidrogéis

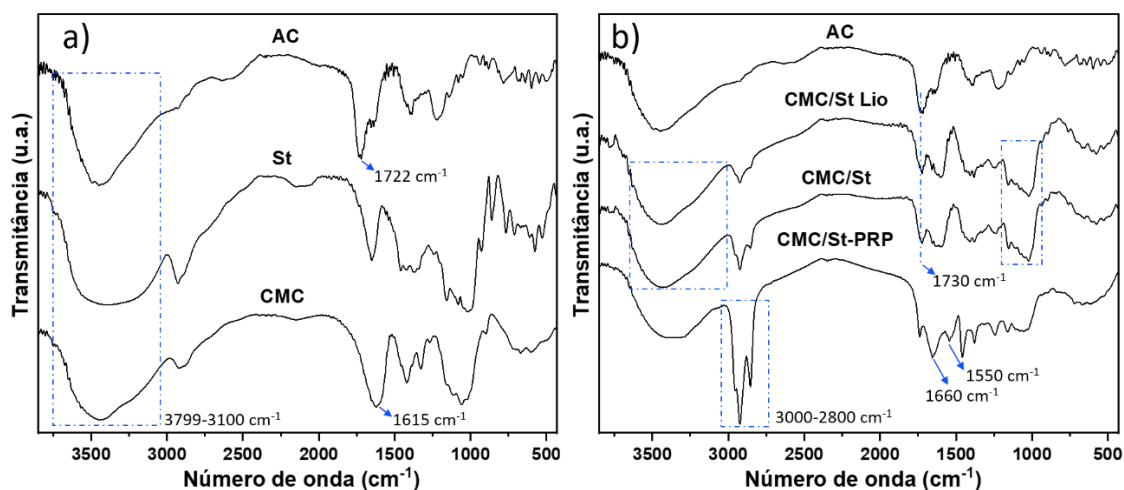
CMC/St Lio apresentaram uma porosidade superficial significativamente alta. A **Figura 14a,a'** ilustra a morfologia de superfície porosa do material, onde é possível observar a presença de poros duplos. Os poros grandes, com tamanho médio de aproximadamente  $452,6 \pm 52,0 \mu\text{m}$ , são resultado do padrão de impressão utilizado. Além disso, a presença de microporos também foi observada, onde esses apresentaram tamanho médio de  $78,9 \pm 33,7 \mu\text{m}$ . Os microporos se mostraram menos homogêneos, o que pode ser atribuído ao processo de liofilização (Guastaferro et al., 2021). Em relação à porosidade interna, o CMC/St Lio mostrou uma distribuição mais homogênea de poros, com tamanho médio de  $78,2 \pm 14,2 \mu\text{m}$  (H. Sun et al., 2020). Isso indica que a estrutura interna do material também apresenta poros de tamanho adequado e bem distribuídos. Após o processo de reticulação, observou-se que a superfície do CMC/St apresentou uma estrutura mais homogênea em comparação com a amostra não reticulada. A **Figura 14b,b'** mostra que a superfície reticulada exibiu poros grandes, com tamanho médio de  $336,6 \pm 32,5 \mu\text{m}$ , e microporos igualmente distribuídos ao longo do material, com tamanho médio de  $60,3 \pm 18,9 \mu\text{m}$ . Essa homogeneidade na distribuição dos poros é um indicativo de uma estrutura mais estável e consistente (Hu et al., 2019; Sornlar et al., 2021). No que se refere aos poros internos, eles mantiveram um padrão de homogeneidade, apresentando um tamanho médio de  $50,2 \pm 17,6 \mu\text{m}$ . Isso indica que a reticulação não alterou significativamente a estrutura interna do material em relação à distribuição de poros. Esses resultados sugerem que o processo de reticulação afetou a morfologia da superfície do CMC/St, aumentando o tamanho dos poros, mas manteve a homogeneidade e a distribuição dos poros internos. Além disso, o processo de reticulação contribuiu para a formação de uma estrutura porosa mais homogênea tanto na superfície quanto no interior do hidrogel CMC/St. Isso é vantajoso para aplicações biomédicas, pois uma distribuição homogênea de poros pode facilitar a difusão de nutrientes, a adesão celular e a formação de tecidos ao redor do *scaffold* (Zaszczyńska et al., 2021). Na **Figura 14c,c'**, é possível observar o efeito do PRP na estrutura porosa do *scaffold* CMC/St. O hidrogel CMC/St-PRP apresentou uma diminuição significativa na porosidade de superfície em comparação com CMC/St. Essa redução pode ser atribuída ao intumescimento dos filamentos durante o período de imersão na solução de PRP. É importante

ressaltar que o preparo da amostra, no qual o material foi congelado e liofilizado após a adsorção das plaquetas, pode ter causado uma mudança no material. Esse processo pode ter levado a alterações na estrutura dos poros, resultando em uma menor porosidade de superfície. Essas mudanças podem ter implicações na interação da matriz do hidrogel com as células e na capacidade de difusão de nutrientes e fatores de crescimento no ambiente circundante (Qian et al., 2020). Portanto, esses resultados ressaltam a importância de considerar o efeito do PRP na arquitetura porosa do hidrogel ao projetar aplicações biomédicas (Z. Liu et al., 2017).



**Figura 14:** Imagens obtidas por MEV mostrando a superfície e a parte interna dos hidrogéis CMC/St Lio (a, a'), CMC/St (b, b') e CMC/St-PRP (c, c'), respectivamente.

A espectroscopia de FTIR foi utilizada para caracterizar os materiais precursores (CMC, St e AC) e os hidrogéis impressos antes e depois da reticulação e após a adsorção do PRP. O espectro de FTIR da CMC (**Figura 15a**) apresentou uma banda alargada na região de 3700–3100  $\text{cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação O-H de hidroxilas. As bandas na região de 3000–2800  $\text{cm}^{-1}$  estão associadas ao estiramento C-H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  (Capanema et al., 2018; Reddy & Yang, 2010). Para a CMC, as ligações C=O dos grupos carboxilatos ( $-\text{COO}^-$ ) apresentaram bandas referente ao estiramento assimétrico em 1615  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto o estiramento simétrico é observado em 1419  $\text{cm}^{-1}$  e 1326  $\text{cm}^{-1}$ , se sobrepondo à banda de água adsorvida em torno de 1630–1650  $\text{cm}^{-1}$  (Lima et al., 2020). A forma ácida da CMC não foi detectada devido à ausência das bandas características dos grupos carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ), normalmente observadas em 1715–1730  $\text{cm}^{-1}$  e 1240–1250  $\text{cm}^{-1}$ , que são atribuídas ao estiramento assimétrico da ligação C=O e estiramento da ligação C-O, respectivamente (Ghorpade et al., 2017). As bandas relativas aos estiramentos da ligação C-O de álcoois primários e secundários foram detectadas em 1110  $\text{cm}^{-1}$  (C2–OH), 1060  $\text{cm}^{-1}$  (C3–OH), 1024  $\text{cm}^{-1}$  e 995  $\text{cm}^{-1}$  (C6–OH). As ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  entre unidades de glicose da CMC foram observadas pela banda em 897  $\text{cm}^{-1}$  (Ghorpade et al., 2017). Para o St, a banda alargada centrada em 3256  $\text{cm}^{-1}$  é devido ao estiramento das ligações O-H. Em 2856  $\text{cm}^{-1}$  nota-se uma banda atribuída ao estiramento das ligações C-H, em 1335  $\text{cm}^{-1}$  uma banda devido à deformação das ligações C-H. Na faixa de número de onda entre 1149 e 998  $\text{cm}^{-1}$  observa-se bandas correspondes à vibração de estiramento das ligações C-O e C-O-C dos anéis glicosídicos do amido (Supare & Mahanwar, 2022). Em relação ao AC, o espectro de FTIR exibiu uma banda alargada referente ao estiramento O-H em torno de 3380  $\text{cm}^{-1}$ , uma banda referente ao estiramento C=O em 1722  $\text{cm}^{-1}$  e bandas referente ao estiramento da ligação C-OH em 1084  $\text{cm}^{-1}$  e *rocking* dos grupos  $\text{CH}_2$  em 786  $\text{cm}^{-1}$ . A observação dessas bandas corrobora trabalhos prévios que também caracterizaram o AC por FTIR (Sánchez-Ferrero et al., 2015).



**Figura 15:** Espectros de FTIR dos (a) compostos puros (CMC, St e AC) e dos (b) hidrogéis CMC/St Lio, CMC/St e CMC/St-PRP.

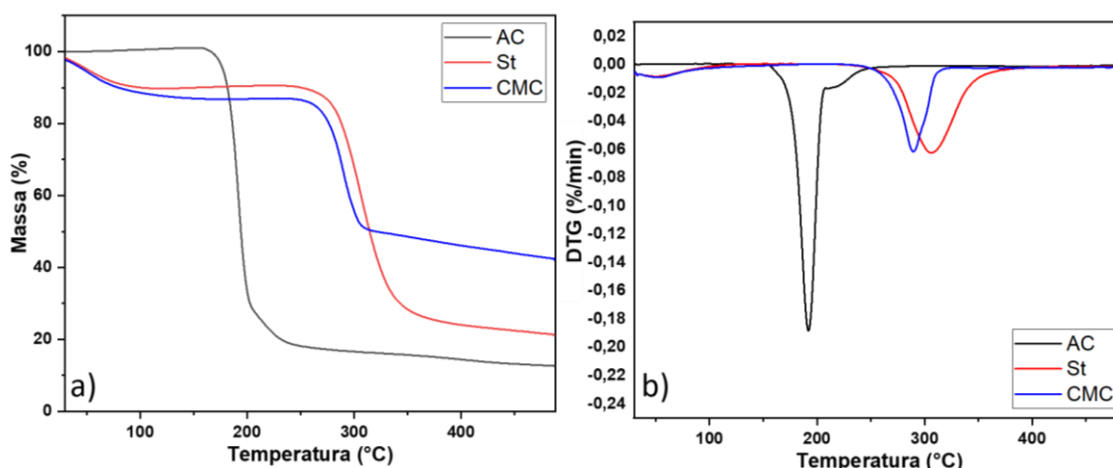
Conforme observado na **Figura 15b**, os espectros de FTIR dos hidrogéis antes e depois da reticulação mantiveram as bandas características dos grupos  $\text{COO}^-$  (bandas em  $1592\text{ cm}^{-1}$ ,  $1416\text{ cm}^{-1}$  e  $1324\text{ cm}^{-1}$ ) e exibiram também bandas referentes aos  $\text{COOH}$  (bandas em  $1730\text{ cm}^{-1}$  e  $1243\text{ cm}^{-1}$ ) (Lima et al., 2020). Ambos os grupos são provenientes da CMC e coexistiram no hidrogel, ao contrário do CMC puro, devido à substituição de  $\text{Na}^+$  por  $\text{H}^+$  nas cadeias poliméricas do CMC durante a acidificação promovida pelo AC (Capanema et al., 2018). O processo de reticulação ocorre por meio da formação de ligações diéster covalentes entre os grupos carboxila do agente de reticulação (AC) e os grupos hidroxila presentes em ambos os polissacarídeos (Raucci et al., 2015). O espectro do hidrogel reticulado (CMC/St) apresentou uma diminuição relativa na intensidade da banda referente ao estiramento O-H de hidroxilas em aproximadamente  $3433\text{ cm}^{-1}$ . Essa mudança foi confirmada avaliando a relação entre transmitância da banda em  $3433\text{ cm}^{-1}$  e a transmitância da banda de referência em  $898\text{ cm}^{-1}$  ( $A_{898}$ ) correspondente às ligações glicosídicas  $\beta(1,4)$  (Capanema et al., 2018). O mesmo procedimento foi realizado para as bandas relacionadas aos álcoois primários e secundários. Neste caso, a reação com AC deveria envolver uma diminuição na intensidade das bandas correspondentes aos álcoois primários (bandas de absorção na região de  $1075\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ ) em comparação com os álcoois secundários (bandas na região de  $1150\text{--}1075\text{ cm}^{-1}$ ), o que foi observado. A banda de  $1022\text{ cm}^{-1}$  foi comparada com a banda em

1080  $\text{cm}^{-1}$ . Conforme avaliado, o espectro obtido para o hidrogel CMC/St mostrou uma redução de 25% em comparação com a banda observada para o hidrogel CMC/St Lio, sugerindo uma diminuição nos álcoois primários devido ao processo de reticulação (Diaz-Gomez et al., 2022). Além disso, um aumento na banda em 1242  $\text{cm}^{-1}$  no espectro CMC/St pode ser atribuído à contribuição do estiramento C=O das ligações de éster formadas (Zhuang et al., 2021). No geral, as alterações nos espectros de FTIR na região de 1700  $\text{cm}^{-1}$ , região característica de observação do estiramento C=O de ésteres são leves devido à sobreposição com as bandas referentes aos grupos carboxilato do CMC (Capanema et al., 2018; Diaz-Gomez et al., 2022; Mohan et al., 2020). A presença de PRP nos *scaffolds* de CMC foi evidenciada por meio da detecção de bandas referentes aos grupos de amida I e II em 1660 e 1550  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Ainda, há um alargamento da banda na região 3300–3500  $\text{cm}^{-1}$  em comparação com outras bandas no mesmo espectro que não sofreram variação. Essa mudança pode ser relacionada à contribuição do estiramento dos N–H dos grupos amino no PRP (Braga et al., 2020). Outra alteração observada diz respeito as bandas na região de 3000–2800  $\text{cm}^{-1}$ , que estão associadas ao estiramento C–H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ . Nessa região, foi observado um aumento nas intensidades dessas bandas, o que pode ser atribuído às cadeias laterais de aminoácidos presentes no PRP (Rohman et al., 2019). A presença de grupos eletronegativos no PRP pode facilitar a interação com a matriz do hidrogel, principalmente por ligações de hidrogênio (S. Zhu et al., 2022).

Análises térmicas (TGA/DTG) foram realizadas para avaliar o comportamento térmico e eventuais interações entre nos compostos utilizados na fabricação dos hidrogéis e dos próprios hidrogéis impressos. Na **Figura 16**, as curvas TGA da CMC e do St apresentaram duas etapas distintas de perda de massa em função do aumento da temperatura. A primeira etapa para ambos os polissacarídeos ocorreu na faixa de temperatura de 50–180 °C e pode ser associada à remoção de água fracamente ligada as cadeias dos mesmos. A evaporação inicial de água é um processo comum em materiais de origem natural, como os polímeros à base de fibras naturais (Tuan Mohamood et al., 2021). Para a CMC, o segundo estágio de perda de massa é atribuído à quebra da estrutura da celulose presente na CMC e à liberação de dióxido de carbono



(CO<sub>2</sub>) devido ao processo de descarboxilação (Pettignano et al., 2019). Por meio da curva DTG (**Figura 16b**), foi possível identificar que a etapa referente a degradação térmica da CMC tem uma temperatura máxima de 289 °C, corroborando outros estudos (de Britto & Assis, 2009). Para o St, a segunda perda de massa ocorreu na faixa de temperatura de 254–355 °C devido à eliminação de grupos hidroxila e à despolimerização das cadeias de principais. Acima de 350 °C, ocorre à decomposição e carbonização do St (Ferraz et al., 2019). Conforme apurado na curva DTG, a temperatura máxima da decomposição do St se dá em 306 °C. As curvas TGA/DTG obtidas para o AC revelaram um único estágio de perda de massa, com um máximo em 212 °C atribuído a decomposição térmica desse ácido orgânico (Uranga et al., 2019).

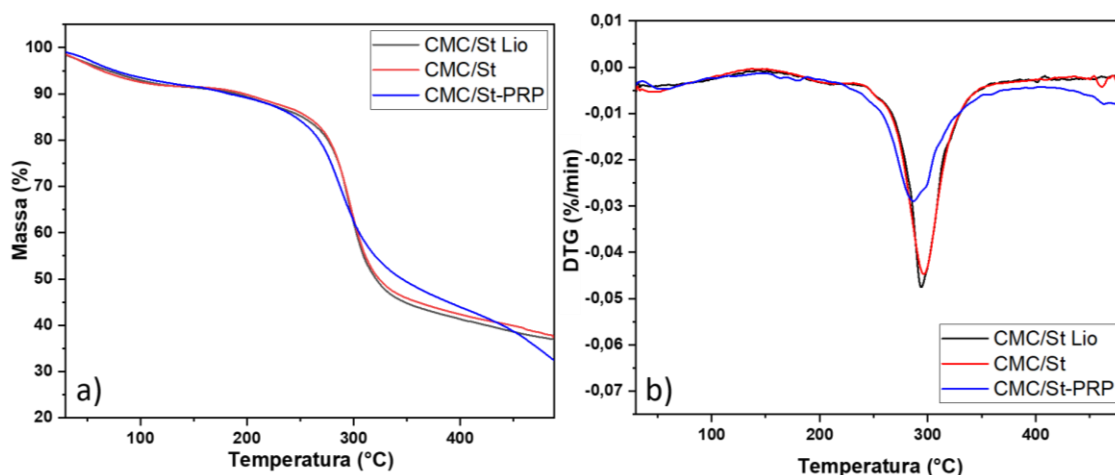


**Figura 16:** Curvas TGA (a) e DTG (b) para AC, St e CMC.

A **Figura 17** apresenta as curvas TGA/DTG obtidas para os hidrogéis impressos. De maneira geral, todas as amostras apresentaram três estágios de perda de massa. O primeiro estágio se dá entre 30 e 120 °C está relacionado à remoção da água livre adsorvida, que se encontra na superfície ou nas camadas externas dos hidrogéis. Nota-se que o percentual de perda de massa relativo a esse evento é praticamente o mesmo para todas as amostras, o que sugere que os processos de reticulação e posterior adsorção da PRP não altera a hidrofilicidade aparente dos hidrogéis. O segundo estágio, com um máximo de temperatura próximo à 240 °C, está relacionado à vaporização da água aprisionada nas camadas internas, que requer mais tempo para ser liberada dos



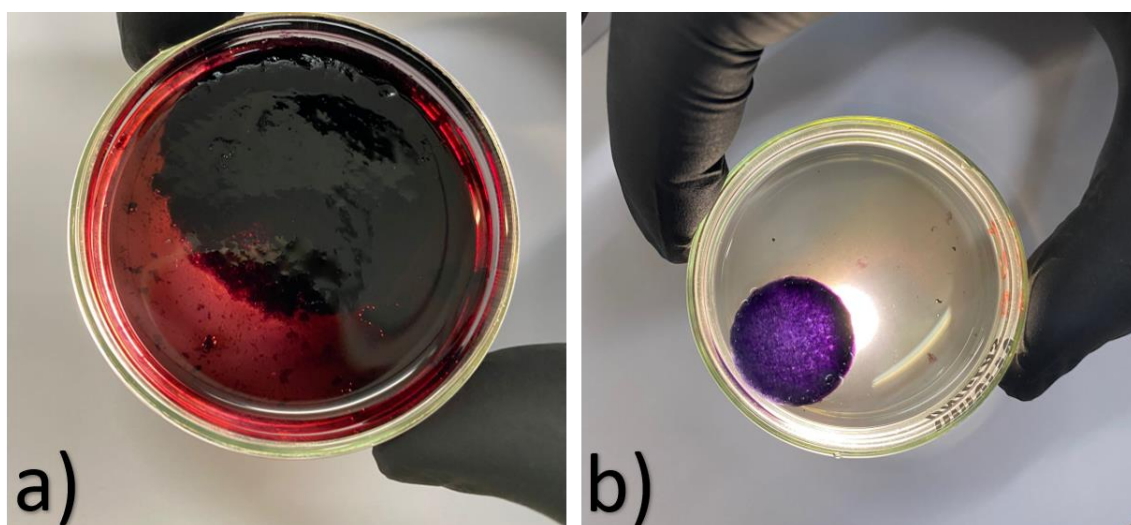
hidrogéis (Lima et al., 2020). O terceiro estágio de perda de massa foi observado na faixa de temperatura 250 e 500 °C e corresponde à degradação térmica e decomposição dos polissacarídeos utilizados na fabricação dos hidrogéis (CMC e St (Gharekhani et al., 2017). A observação de um único pico nas curvas DTG para essa etapa indica uma boa compatibilidade entre os dois polissacarídeos. É importante também destacar que todas as amostras exibiram curvas de perda de massa semelhantes. Essa consistência nas curvas sugere que as amostras possuem comportamentos térmicos próximos e que as mudanças na estrutura e na composição dos hidrogéis não tiveram um impacto significativo nas etapas de degradação térmica observadas. Os estágios de perda de massa podem ser melhor analisados nas curvas DTG. Observou-se que a temperatura máxima correspondente ao segundo estágio foi ligeiramente maior para o hidrogel reticulado (298 °C), em comparação com o hidrogel CMC/St Lio. Essa pequena diferença de aproximadamente 5 °C pode indicar uma maior resistência intermolecular devido às interações entre os componentes, a qual resulta do processo de reticulação. Isso sugere que a presença do AC pode fortalecer as ligações entre as moléculas, resultando em uma maior estabilidade térmica do material (Li et al., 2019). O alto teor de massa residual (~37%) observado ao final do aquecimento para os hidrogéis CMC/St Lio e CMC/St pode estar associado à formação de anidrido por meio da associação das cadeias de CMC e St, resultando na eliminação de moléculas de água, quebra de cadeias de copolímeros e destruição da estrutura da rede reticulada. Uma vez que a reação de reticulação entre os polímeros e o AC forma anidrido cíclico e ligações éster entre as cadeias de polímero, a presença elevada de cinzas é justificada por essa reação (Wu et al., 2019). A incorporação do PRP resultou em uma diminuição nos valores de temperatura máxima relacionados ao segundo estágio de perda de massa, conforme observado na respectivas curvas DTG. A temperatura máxima foi reduzida para 286 °C. Essa diminuição pode indicar que a presença do PRP afeta a estabilidade térmica do material, possivelmente devido a interações ou modificações químicas causadas pelos componentes presentes no plasma com a matriz do hidrogel.



**Figura 17:** Curvas TGA (a) e DTG (b) para CMC/St Lio, CMC/St e CMC/St-PRP.

A fim de avaliar a compatibilidade entre CMC e St presente no material e sua estabilidade em meio aquoso, utilizou-se o teste do iodo como método de marcação da rede de St no hidrogel. Esse teste possibilitou a análise da estrutura dos hidrogéis em relação à homogeneidade do sistema, incluindo a presença e distribuição do St na matriz polimérica (Guilherme et al., 2012). A coloração resultante da reação do iodo com o St é uma indicação visual da presença de St na amostra. Essa reação é caracterizada pela formação de uma coloração intensamente preto-azulada quando a cadeia de amilose do St reage com o ânion triiodeto ( $I_3^-$ ). O mecanismo envolvido na formação desse complexo ocorre devido à interação entre o St e o  $I_3^-$ . O St contém grupos hidroxila ( $-OH$ ) que possuem pares de elétrons disponíveis para interagir com o iodo. Nesse complexo, as moléculas de amido envolvem as moléculas de iodo, formando uma estrutura estável através de ligações de hidrogênio. Essa formação do complexo resulta na coloração intensamente preto-azulada característica desse teste (Cochran et al., 2008). Como o teste do iodo é comumente utilizado, mas não é tão comum para materiais à base de água, como os hidrogéis, adotamos uma abordagem semelhante àquela descrita por Guilherme et al. (2012) para realizar o teste. Durante esse processo, foi observado que as amostras encolheram e adquiriram uma coloração marrom, indicando a absorção de iodo pelos hidrogéis. Posteriormente, os hidrogéis desidratados foram imersos em água para serem re-intumescidos. A **Figura 18** apresenta os resultados do teste após 12 h. Com base nesses resultados, podemos chegar a duas conclusões

importantes. Em primeiro lugar, pode-se observar que o hidrogel CMC/St manteve sua estrutura estável em água destilada, ao contrário do hidrogel CMC/St Lio, que perdeu completamente sua estrutura na presença desse solvente, devido à ausência de reticulação. Além disso, vale ressaltar que o St presente na estrutura 3D do hidrogel está distribuído de forma homogênea. Esse resultado indica não apenas a eficiência das propriedades da tinta utilizada, mas também a precisão do processo de impressão do hidrogel.

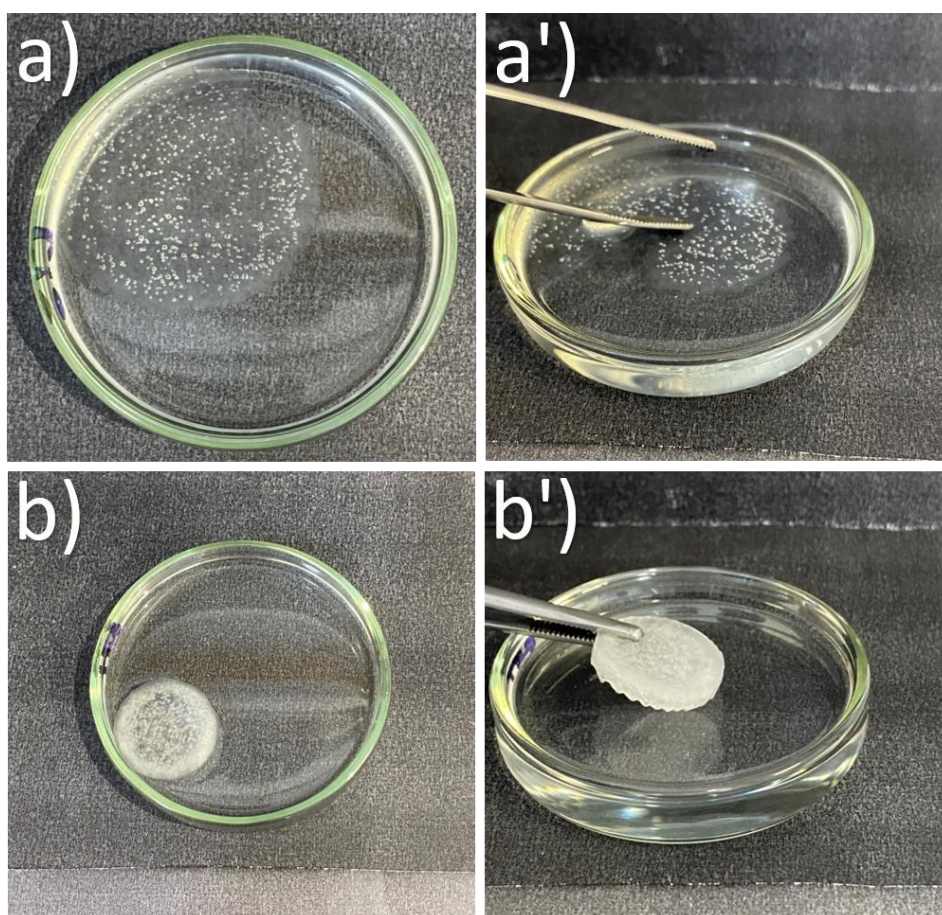


**Figura 18:** Imagens fotográficas dos hidrogéis (a) CMC/St Lio e (b) CMC/St re-intumescidos em água após o teste do iodo.

### 5.3 Estudos de estabilidade dos hidrogéis impressos

A estabilidade dos hidrogéis aplicados como *scaffolds* em ambientes biológicos é uma preocupação fundamental no desenvolvimento de biomateriais para aplicações biomédicas. A capacidade do *scaffold* em manter sua integridade estrutural e propriedades físicas é crucial para o sucesso de implantes, cultura celular e regeneração tecidual (Badekila et al., 2021). Nesse contexto, os hidrogéis CMC/St Lio e CMC/St foram submetidos a testes de estabilidade em água destilada, DMEM e fluido simulado PBS pH 7,4, a fim de avaliar seu comportamento e desempenho nessas condições. Além disso, procurou-se confirmar o impacto da reticulação na estabilidade dos hidrogéis, relacionando os resultados com as análises de caracterização dos materiais. Com relação aos resultados obtidos para os hidrogéis reticulado e não reticulado,

verificou-se que a reticulação proporcionou uma maior estabilidade estrutural nos três meios testados. A **Figura 19** apresenta as características estruturais após um período em contato (4 semanas) com água destilada. O hidrogel CMC/St apresentou uma maior resistência à degradação em água destilada após 4 semanas de teste. Por outro lado, o hidrogel CMC/St Lio dissolveu-se completamente em aproximadamente 12 h após imersão em água destilada. Essa melhoria na estabilidade está relacionada à formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais dos polissacarídeos, o que intensifica as interações moleculares e aumenta a resistência do material (Dobaj Štiglic et al., 2021).



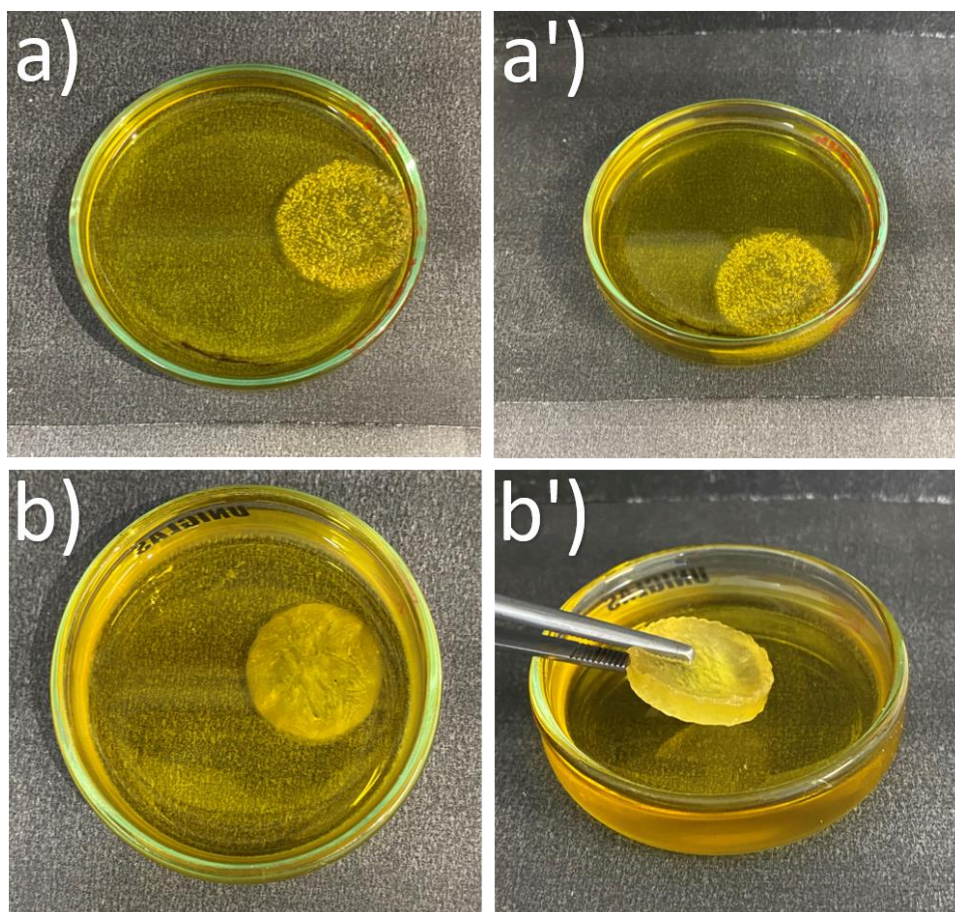
**Figura 19:** Imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio (a,a') e CMC/St (b,b') submetidos ao teste de estabilidade em água destilada.

Esse resultado preliminar é fundamental, uma vez que o hidrogel estará em contato com fluidos biológicos, como sangue, PRP, meios de cultivo celular

e fluidos corporais, nos quais ele precisa manter sua integridade estrutural e propriedades físicas ao longo do tempo (Dsouza et al., 2022; Larrea-Wachtendorff et al., 2022). A estabilidade em água também desempenha um papel crucial na prevenção da degradação prematura do material, como observado no caso de CMC/St Lio, o que justifica o processo de reticulação.

A estabilidade das amostras de hidrogel em meio de cultura DMEM foi semelhante à observada teste anterior em água destilada (**Figura 20**). Pode-se observar que o CMC/St manteve sua estrutura intacta pós 4 semanas em solução de meio de cultura. Por outro lado, o hidrogel de CMC/St Lio apresentou completa dissolução após 24 horas de imersão no meio de cultura, o que está em concordância com os resultados de reticulação, indicando uma maior estabilidade do material. É de extrema importância que o *scaffold* suporte as condições que simulam o ambiente celular, garantindo a compatibilidade e interação adequada com as células (F. Wang et al., 2023). O meio de cultura, como o DMEM contém nutrientes, fatores de crescimento e outros componentes essenciais para o crescimento e viabilidade das células. Portanto, é importante que o hidrogel mantenha sua estabilidade estrutural nesse meio de cultura (Reiss et al., 2021). Pode-se observar que os hidrogéis CMC/St, quando imersos no meio de cultura, absorveram o líquido, resultando em uma mudança de cor para uma tonalidade laranja, proveniente do meio de cultura utilizado (DMEM). Esse fenômeno indica a capacidade de absorção do meio de cultura pelos hidrogéis, mantendo sua estrutura 3D. No entanto, é importante ressaltar que, para aplicações na engenharia de tecidos, é desejável evitar a absorção excessiva do meio de cultura, a fim de preservar a forma e a estrutura do hidrogel. A capacidade de intumescimento, que será discutida posteriormente, desempenha um papel importante nesse aspecto. Portanto, é necessário encontrar um equilíbrio entre a absorção do meio de cultura e a manutenção da forma e estrutura do hidrogel para aplicações específicas na engenharia de tecidos (L. Ma et al., 2023).

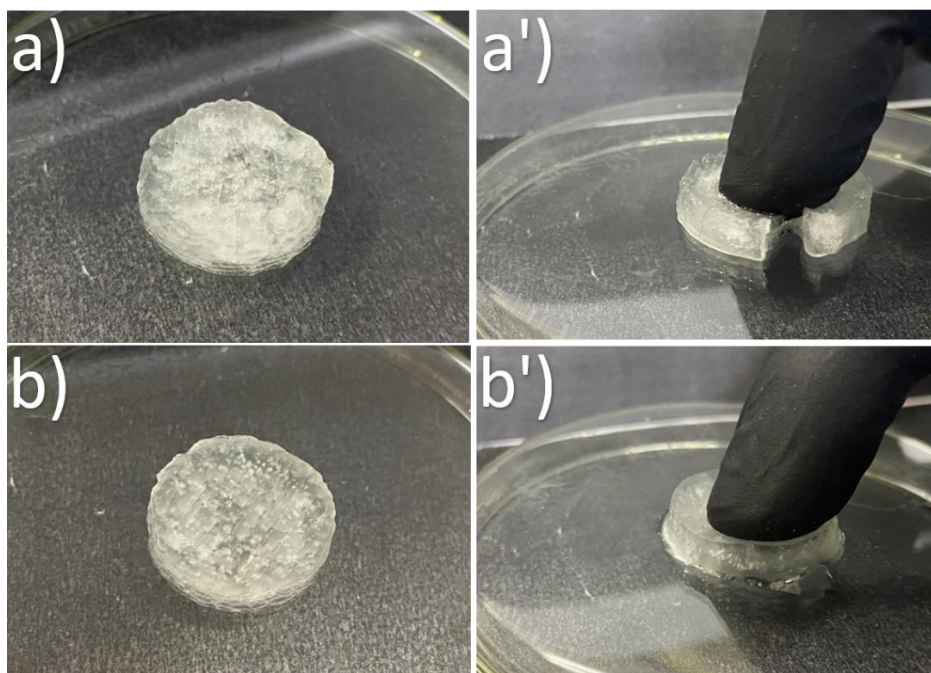




**Figura 20:** Imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio (a,a') e CMC/St (b,b') submetidos ao teste de estabilidade em DMEM (1% m/v).

A estabilidade dos hidrogéis em PBS (pH 7,4) foi avaliada para verificar o comportamento mecânico dos materiais em condições que mimetizam os fluidos do corpo (Khan et al., 2021). Isso é importante para garantir que o hidrogel seja adequado para suportar a função desejada e manter sua integridade estrutural durante o uso. A **Figura 21** apresenta imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio e CMC/St imersos em PBS. Comparativamente aos outros meios, ambos hidrogéis apresentaram comportamento diferente. Essa diferença está diretamente relacionada às propriedades físico-químicas do material e à interação com o meio em que está imerso (Diaz-Gomez et al., 2022). Ao contrário da água, que solubiliza a estrutura do hidrogel não reticulado rompendo as interações moleculares, foi observado que tanto CMC/St Lio e o CMC/St mantiveram sua estrutura após 4 semanas de imersão em PBS. Isso indica que o meio contendo íons e uma composição iônica semelhante aos fluidos biológicos desempenha um papel importante na estabilidade dos hidrogéis. Os

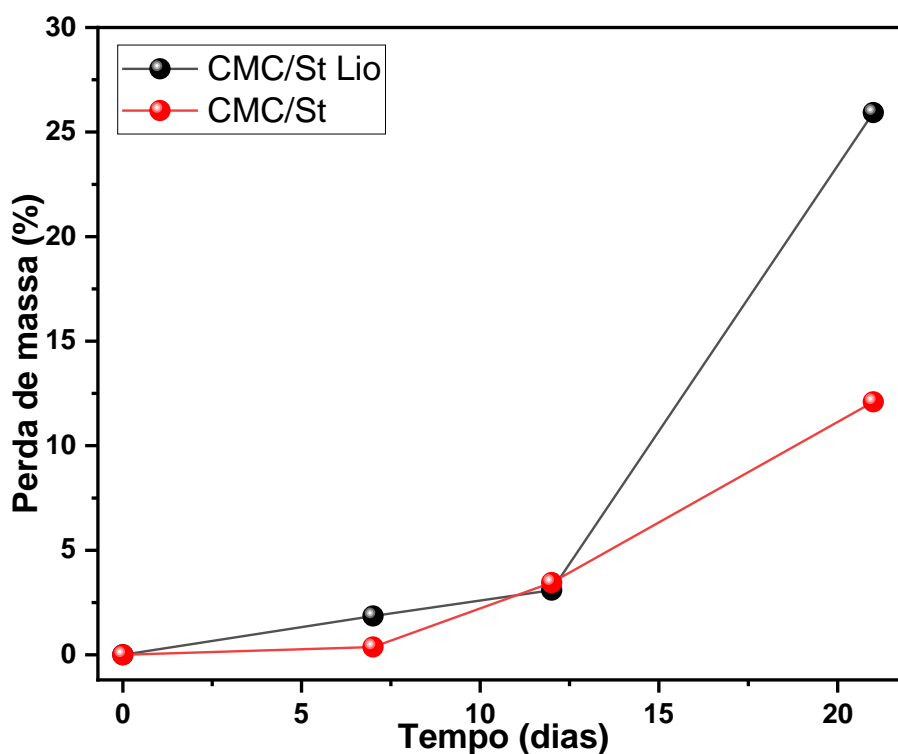
íons presentes no PBS podem interagir com os grupos funcionais dos polissacarídeos da matriz polimérica, formando ligações iônicas ou eletrostáticas. Essas interações contribuem para a manutenção das cadeias poliméricas unidas, impedindo sua dissolução completa e conferindo estabilidade estrutural ao hidrogel (Berradi et al., 2023). A estabilidade estrutural dos hidrogéis foi avaliada qualitativamente conforme observado nas imagens fornecidas nas **Figuras 21a' e 21b'**. Observa-se que a estabilidade de manuseio do hidrogel CMC/St Lio é significativamente inferior quando comparada ao CMC/St. Quando submetido a uma força compressiva qualitativa, o material não reticulado apresentou imediata ruptura de sua estrutura, enquanto o hidrogel reticulado permaneceu estável, mesmo sob solicitação mecânica. Esta observação corrobora que a reticulação confere ao hidrogel maior resistência e estabilidade estrutural, resultado da estabilidade proporcionada pela reticulação (Everett & Mathioudakis, 2018).



**Figura 21:** Imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio (a) e CMC/St (b) submetidos ao teste de estabilidade PBS pH 7,4. Imagens fotográficas dos hidrogéis CMC/St Lio (a') e CMC/St (b') após compressão.

Verificou-se que ambos os materiais apresentaram um comportamento semelhante em relação à estabilidade durante as duas primeiras semanas (14

dias) (**Figura 22**). Durante esse período, não houve uma perda significativa de massa, incluindo para o CMC/St Lio, devido à interação iônica mencionada anteriormente (Berradi et al., 2023). Após 21 dias, observou-se um comportamento mais diferenciado entre as duas amostras. Os hidrogéis apresentaram uma menor perda de massa em comparação com os hidrogéis CMC/St Lio. Esse comportamento está diretamente relacionado à reticulação, que confere maior estabilidade ao material (Mohan et al., 2020; Štiglic et al., 2022). Além disso, a interação iônica mencionada anteriormente não foi capaz de manter a estrutura dos hidrogéis CMC/St Lio após 21 dias. Pode-se concluir, portanto, que os hidrogéis CMC/St possuem boa estabilidade em fluido biológico (PBS pH 7,4) e mantêm sua estrutura 3D sem qualquer indício de colapso estrutural, que é um aspecto fundamental (Štiglic et al., 2022). Além disso, é correto afirmar que essas características de estabilidade em diferentes meios e baixa degradação em PBS têm um alto potencial para serem utilizadas em experimentos *in vitro* de longo prazo, e até mesmo *in vivo* (Khan et al., 2021; Namkaew et al., 2021).

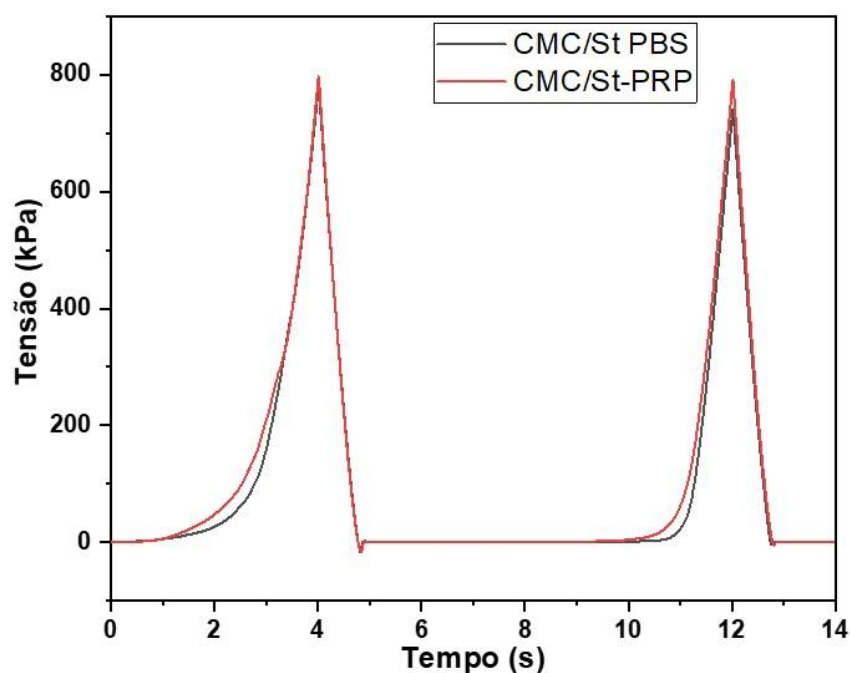


**Figura 22:** Perda de massa dos hidrogéis CMC/St Lio e CMC/St incubados em PBS (pH 7,4) à 37 °C em função do tempo.



## 5.4 Propriedades mecânicas

A partir dos ensaios de compressão algumas propriedades mecânicas, incluindo rigidez, coesividade e elasticidade, dos hidrogéis CMC/St após intumescimento em PBS e após incubação PRP por um período de 30 min. Esse tempo foi estipulado com base nas análises de intumescimento previamente realizadas e apresentadas na **Figura 23**.



**Figura 23:** Curvas de tensão em relação a dois ciclos de compressão para os hidrogéis CMC/St-PBS e CMC/St-PRP.

Observou-se um aumento discreto na rigidez do hidrogel CMC/St-PRP carregado com plasma em comparação com o hidrogel intumescido em PBS (CMC/St-PBS). No primeiro ciclo de compressão, a força máxima foi de  $798 \pm 5$  kPa para o CMC/St-PRP e  $779 \pm 18$  kPa para o CMC/St intumescido em PBS, apresentando uma diferença não significativa. No segundo ciclo de compressão, a amostra CMC/St-PRP manteve-se com valores de tensão semelhantes ao primeiro ciclo, enquanto a amostra intumescida em PBS apresentou uma diminuição de aproximadamente 40 kPa. A coesividade, representada pela área de força positiva durante a segunda compressão em relação ao primeiro ciclo, não foi significativamente alterada, com valores de  $0,750 \pm 0,11$  e  $0,722 \pm 0,1$

para CMC/St-PRP e CMC/St-PBS, respectivamente. Este parâmetro está relacionado à capacidade do material de resistir a forças de compressão e manter sua integridade estrutural. A coesividade é uma medida da força necessária para superar as ligações internas do material (Pavlovic et al., 2021). Os resultados obtidos mostraram que tanto os hidrogéis CMC/St-PBS quanto os de CMC/St-PRP apresentaram valores de coesividade relativamente próximos a 1, o que indica que os hidrogéis porosos conseguiram manter sua estrutura interna durante os esforços compressivos. Isso significa que as diferentes camadas da rede 3D estavam interligadas de forma eficaz nos pontos de contato, e os hidrogéis possuem comportamento elástico quase perfeito (Beaumont, 2020).

**Tabela 3:** Valores referentes aos parâmetros mecânicos calculados com base nas curvas de tensão.

Amostra	Resistência à compressão (kPa)	E <sub>1</sub> (kPa)	E <sub>2</sub> (kPa)	N (1/m <sup>3</sup> )
CMC/St-PRP	798 ± 5	0,075	1,93	6,3 x 10 <sup>18</sup>
CMC/St-PBS	779 ± 18	0,104	1,75	8,7 x 10 <sup>18</sup>

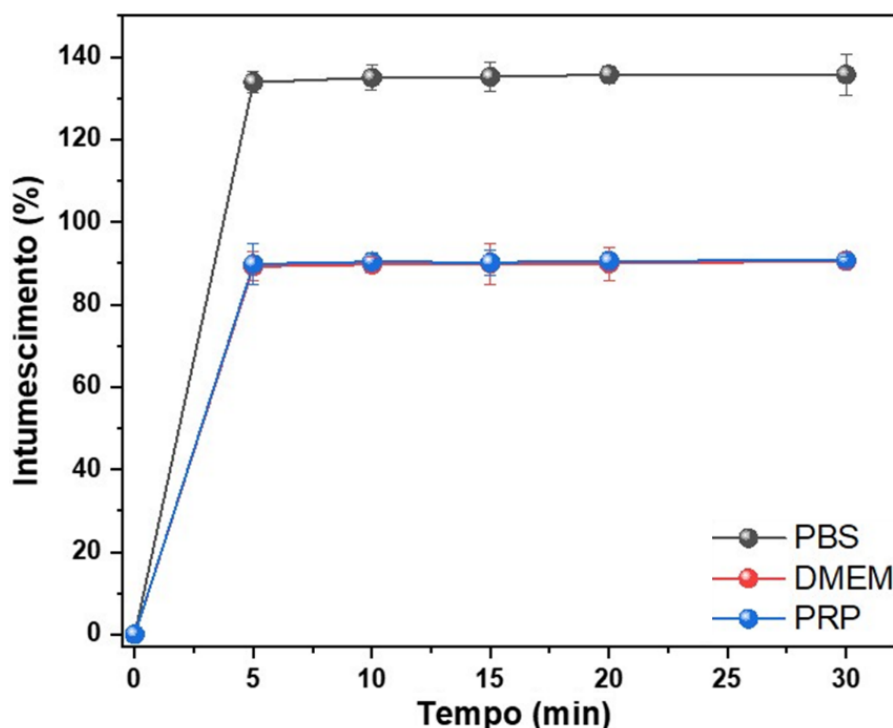
O meio em que os hidrogéis estão imersos tem um impacto significativo no módulo de elasticidade ( $E$ ) dos materiais, conforme observado na **Tabela 3**. Foi observada uma elevação de 72% no  $E$  quando comparado o hidrogel de CMC/St em PBS (denotado como CMC/St-PBS) com o CMC/St-PRP. O PRP causou uma ligeira diminuição nos módulos elásticos dos hidrogéis, indicando uma maior elasticidade nas amostras de CMC/St em PBS. Esse resultado pode ser atribuído ao efeito iônico proveniente do plasma, que demonstrou ter um efeito significativo na estabilização do material, sendo capaz até mesmo de manter a estrutura do hidrogel não reticulado (Berradi et al., 2023). É importante destacar que o PRP contém íons, sendo eles essenciais para as funções celulares, como sódio, potássio, cálcio e magnésio, além de outros grupos funcionais, como aminoácidos provenientes de proteínas e hidroxilas provenientes de carboidratos, lipídios e água. No entanto, mesmo com a

presença desses componentes no PRP, observou-se que o PBS absorvido foi capaz de induzir uma maior elasticidade em comparação ao PRP. Além disso, foi observado um aumento na densidade de reticulação dos hidrogéis quando expostos ao PBS, como evidenciado na **Tabela 3**. A maior elasticidade observada no PBS está diretamente relacionada ao aumento da densidade de reticulação, indicando uma estrutura mais compacta e menos suscetível à deformação. Ao relacionar o  $E$  para o segundo ciclo de compressão em ambas as amostras, pode-se observar uma mudança drástica, indicando uma resposta elástica amplificada. Pode-se inferir que o aumento da elasticidade nos hidrogéis está possivelmente relacionado às interações entre os filamentos impressos durante o primeiro ciclo de compressão, resultando em uma maior compactação, mantendo os filamentos possivelmente intactos (Štiglic et al., 2022; Vieira et al., 2021). Além disso, é importante considerar que a deformação aplicada durante o teste pode ter sido bastante elevada, levando as amostras quase aos seus limites. É importante ressaltar que o comportamento elástico do hidrogel pode ser modificado ao variar a arquitetura da impressão, permitindo o ajuste das propriedades elásticas de acordo com a aplicação desejada (Joseph Arockiam et al., 2022; Xu et al., 2019).

### **5.5 Intumescimento do hidrogel CMC/St**

Além das propriedades mecânicas, a avaliação da capacidade de absorção de água dos hidrogéis em meios biológicos é um parâmetro fundamental para compreender a interação entre esses materiais e as células, influenciando o comportamento de adesão celular (Ho et al., 2022). Essa avaliação fornece informações cruciais para o desenvolvimento de hidrogéis para uso como *scaffolds* que promovem uma resposta celular favorável. A otimização desses hidrogéis desempenha um papel crucial nas terapias regenerativas, permitindo o controle preciso da umidade nos hidrogéis, acúmulo excessivo de exsudato, condições que podem levar à degradação dos componentes da matriz extracelular (Everett & Mathioudakis, 2018; Ho et al., 2022). Essa abordagem é especialmente importante no cultivo celular e até mesmo no tratamento de feridas, pois possibilita o desenvolvimento de terapias mais eficientes para promover a regeneração adequada dos tecidos (Everett &

Mathioudakis, 2018). A **Figura 24** apresenta as curvas de intumescimento do hidrogel CMC/St em diferentes meios. De forma geral, o hidrogel apresentou uma cinética de intumescimento rápida em todos os meios testados, alcançando quase seu máximo de intumescimento em cerca de 5 min. Os valores máximos de intumescimento foram de aproximadamente 136% em PBS, 91% em PRP e 90%, em DMEM. Vale destacar que o intumescimento atingiu um platô após 10 min de imersão em todos os fluidos. Esse resultado pode ser explicado pelas propriedades físico-químicas do próprio PBS, que possui uma alta concentração de íons. Esses íons têm a capacidade de interagir com os grupos funcionais presentes no hidrogel, promovendo um intumescimento mais pronunciado (Berradi et al., 2023; Ferreira et al., 2018). Por outro lado, o PRP contém uma variedade de fatores de crescimento e componentes sanguíneos que podem influenciar as interações com o hidrogel de forma diferente, resultando em um intumescimento menos acentuado (Censi et al., 2020). O DMEM, por sua vez, possui uma composição mais complexa, contendo nutrientes e fatores de crescimento, que também podem influenciar as propriedades de intumescimento do hidrogel (Willems et al., 2021). Além disso, é importante mencionar que o DMEM utilizado não contém bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e apresenta um pH aproximado de 6,3, enquanto o PBS possui um pH de 7,4. O pH do meio é um fator importante a ser considerado, uma vez que um pH mais alto pode resultar em uma maior ionização dos grupos funcionais presentes no hidrogel (Khaleghi et al., 2020). Isso pode levar a interações eletrostáticas mais fortes entre o hidrogel e os íons presentes no fluido, influenciando no intumescimento observado nos diferentes meios. O resultado obtido foi bastante importante pois a absorção de fluido corporal e transferência de nutrientes e metabólitos celulares. Durante a cultura celular, por exemplo, esse resultado pode facilitar a infiltração de células nas tramas tridimensionais presentes no hidrogel. A expansão também resulta no aumento do tamanho dos poros e da porosidade total, o que leva a uma ampliação da área de superfície interna dos *scaffolds*. No entanto, um grau de intumescimento adequado é importante, visto que um intumescimento excessivo pode levar à instabilidade da estrutura e ao colapso dos poros, comprometendo a capacidade do *scaffold* de fornecer suporte mecânico e 3D para o crescimento celular.



**Figura 24:** Curvas Intumescimento para os hidrogéis CMC/St em PBS (pH 7,4), DMEM e PRP à 37 °C.

## 5.6 Comparativo com a literatura

Foi realizado um levantamento abrangente na literatura recente para comparar o desempenho de vários hidrogéis impressos para uso como *scaffolds*. Conforme mencionado anteriormente, os hidrogéis impressos em 3D desempenham um papel importante na fabricação de *scaffolds* em diferentes aplicações e utilizando diversas técnicas de impressão (Zhang et al., 2022). Estudos investigam o potencial dos *scaffolds* impressos por extrusão 3D na regeneração de tecidos específicos, como osso, cartilagem, pele e tecido nervoso (Advincula et al., 2021). É importante ressaltar que diferentes aplicações requerem propriedades específicas do material. Por exemplo, *scaffolds* para regeneração óssea exigem materiais com propriedades mecânicas elevadas (>1 MPa), que estão além das propriedades obtidas para CMC/St (aproximadamente 798 kPa) (Gao et al., 2018; Zhang et al., 2022). No entanto, a maleabilidade e as propriedades mecânicas adequadas para a regeneração de pele e outros tecidos moles podem ser uma boa alternativa (Mani et al., 2022). Uma estratégia para impressão celular foi descrita por Naghieh et al. (2018). Nesse trabalho, os autores utilizaram biotintas à base de alginato, um polímero com capacidade de

interação com íons bivalentes, promovendo gelificação rápida. Nesse sentido, os hidrogéis menos viscosos podem ser impressos de forma adequada e suportar a viabilidade de células incorporadas. A tinta CMC/St, por sua vez, permite a criação de *scaffolds* versáteis, possibilitando o desenvolvimento adaptado às necessidades celulares específicas. Além disso, a ausência de células vivas na biotinta acelular reduz o risco de danos ou perda de viabilidade celular durante o processo de impressão, tornando-o mais confiável e menos complexo de manipular em comparação com as biotintas que contêm células incorporadas (Naghieh et al., 2018). Em um estudo conduzido por Diaz-Gomez et al. (2022), *scaffolds* de CMC reticulados com AC foram desenvolvidos para uso na cicatrização de feridas diabéticas. Esses *scaffolds* também apresentaram uma população de poros duplos, sendo que os hidrogéis CMC/St produzidos neste estudo demonstraram uma porosidade cerca de 60% superior àquela observada nos materiais fabricados pelos autores. Os pesquisadores também carregaram os hidrogéis com PRP, o que resultou em uma maior porosidade devido ao intumescimento dos filamentos após a incubação. Surpreendentemente, esse resultado foi inverso para os hidrogéis CMC/St-PRP, indicando a possibilidade de melhorias no processo de preparo da análise (Diaz-Gomez et al., 2022). Além disso, os *scaffolds* preparados pelos autores foram capazes de sustentar a liberação de fatores de crescimento do PRP, mostrando-se promissores para aplicações biomédicas. Com base nesses resultados, é possível vislumbrar que os hidrogéis CMC/St também poderiam ser capazes de promover uma liberação controlada de plaquetas, ampliando suas potencialidades em aplicações terapêuticas.

## 6. Conclusão

Neste trabalho, foram fabricados com sucesso hidrogéis de CMC/St por 3DP e reticulados quimicamente com AC. Inicialmente, a biotinta de CMC/St passou por vários estudos e demonstrou excelente capacidade de impressão. Foi observado que a aditivação com 15% (m/m) de AC resultou em melhorias nas propriedades da biotinta, assegurando assim a sua printabilidade. Após a impressão, reticulação química dos hidrogéis foi feita DTH em alta temperatura, resultando em uma estrutura estável e sem alteração de cor. No entanto, a adsorção do PRP nos hidrogéis resultou em uma coloração avermelhada proveniente do próprio PRP. A análise de MEV revelou a presença de estruturas porosas bem definidas, com uma morfologia caracterizada por poros duplos. A incorporação do PRP na matriz do hidrogel resultou em uma diminuição acentuada na porosidade de superfície em comparação ao CMC/St. A espectroscopia FTIR e análise térmica TGA/DTG confirmaram a boa compatibilidade entre os polissacarídeos e a reticulação com AC. A avaliação da estabilidade dos hidrogéis em diferentes meios também confirmou a reticulação do material CMC/St e demonstrou que os hidrogéis são bastante estáveis. A caracterização mecânica dos hidrogéis revelou que a incorporação do PRP não altera significativamente a dureza dos materiais, sendo que o CMC/St-PRP apresentou um módulo de elasticidade 72% maior em comparação ao CMC/St intumescido em PBS. O hidrogel CMC/St apresentou uma cinética intumescimento rápida, alcançando um máximo de 136% em PBS (pH 7,4) após 5 min de contato. Já os hidrogéis incubados em PRP e DMEM apresentaram intumescimentos de aproximadamente 90,8% e 90,5%, respectivamente. Por fim, quando comparados à outros materiais do tipo hidrogel impressos para uso como biomateriais, o hidrogel CMC/St apresenta algumas vantagens conforme apurado. Em suma, o hidrogel CMC/St demonstrou propriedades e características inerentes que são atraentes para o uso dele como *scaffold*. Espera-se que no futuro esse hidrogel seja utilizado para aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

Como continuidade desse trabalho, alguns estudos importantes devem ser realizados a fim de viabilizar e assegurar a aplicabilidade hidrogel CMC/St como *scaffold* para o cultivo de células. Um deles é o estudo da degradação do

hidrogel em diferentes meios fisiológicos, investigando sua estabilidade e resistência à degradação enzimática específica do ambiente em que será aplicado. Além disso, é essencial conduzir estudos adicionais de citotoxicidade e viabilidade celular para avaliar a segurança e a compatibilidade do hidrogel CMC/St com as células do tecido alvo. Por fim, um aspecto promissor que já está sendo explorado é a liberação controlada de fatores de crescimento a partir do PRP incorporado ao hidrogel CMC/St. Essa estratégia pode promover a regeneração e o crescimento celular no local de implantação do *scaffold*, acelerando o processo de cicatrização e regeneração tecidual. Essas pesquisas adicionais irão fornecer informações cruciais para aprimorar o desempenho e a eficácia do hidrogel CMC/St como *scaffold*, abrindo caminho para sua aplicação clínica em diversas áreas da engenharia de tecidos.



## 7. Referências Bibliográficas

- Advincula, R. C., Dizon, J. R. C., Caldon, E. B., Viers, R. A., Siacor, F. D. C., Maalihan, R. D., & Espera, A. H. (2021). On the progress of 3D-printed hydrogels for tissue engineering. *MRS Communications*, 11(5), 539–553. <https://doi.org/10.1557/s43579-021-00069-1>
- Aldana, A. A., & Abraham, G. A. (2017). Current advances in electrospun gelatin-based scaffolds for tissue engineering applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 523(2), 441–453. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.044>
- Ambrosi, A., & Pumera, M. (2016). 3D-printing technologies for electrochemical applications. *Chemical Society Reviews*, 45(10), 2740–2755. <https://doi.org/10.1039/C5CS00714C>
- Amorim, P. A., d'Ávila, M. A., Anand, R., Moldenaers, P., Van Puyvelde, P., & Bloemen, V. (2021). Insights on shear rheology of inks for extrusion-based 3D bioprinting. *Bioprinting*, 22(January). <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00129>
- Apriyanto, A., Compart, J., & Fettke, J. (2022). A review of starch, a unique biopolymer – Structure, metabolism and in planta modifications. *Plant Science*, 318, 111223. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111223>
- Badekila, A. K., Kini, S., & Jaiswal, A. K. (2021). Fabrication techniques of biomimetic scaffolds in three-dimensional cell culture: A review. *Journal of Cellular Physiology*, 236(2), 741–762. <https://doi.org/10.1002/jcp.29935>
- Bahraminasab, M. (2020). Challenges on optimization of 3D-printed bone scaffolds. *BioMedical Engineering OnLine*, 19(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12938-020-00810-2>
- Bashir, S., Hina, M., Iqbal, J., Rajpar, A. H., Mujtaba, M. A., Alghamdi, N. A., Wageh, S., Ramesh, K., & Ramesh, S. (2020). Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers*, 12(11), 2702. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>
- Beaumont, P. W. R. (2020). The Structural Integrity of Composite Materials and Long-Life Implementation of Composite Structures. *Applied Composite Materials*, 27(5), 449–478. <https://doi.org/10.1007/s10443-020-09822-6>
- Berradi, A., Aziz, F., Achaby, M. El, Ouazzani, N., & Mandi, L. (2023). A Comprehensive Review of Polysaccharide-Based Hydrogels as Promising Biomaterials. *Polymers*, 15(13), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym15132908>
- Bozkurt, Y., & Karayel, E. (2021). 3D printing technology; methods, biomedical applications, future opportunities and trends. *Journal of Materials Research and Technology*, 14, 1430–1450. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.07.050>
- Braga, S. F., Trovatti, E., de Carvalho, R. A., de Carvalho, A. J. F., lemma, M. R. da C., & Amaral, A. C. (2020). Bioactive fibrin scaffolds for use in musculoskeletal regenerative medicine. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020190003>
- Butler, H. M., Naseri, E., MacDonald, D. S., Andrew Tasker, R., & Ahmadi, A.

- (2020). Optimization of starch- and chitosan-based bio-inks for 3D bioprinting of scaffolds for neural cell growth. *Materialia*, 12(May). <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2020.100737>
- Cai, L., Dewi, R. E., & Heilshorn, S. C. (2015). Injectable Hydrogels with In Situ Double Network Formation Enhance Retention of Transplanted Stem Cells. *Advanced Functional Materials*, 25(9), 1344–1351. <https://doi.org/10.1002/adfm.201403631>
- Capanema, N. S. V., Mansur, A. A. P., de Jesus, A. C., Carvalho, S. M., de Oliveira, L. C., & Mansur, H. S. (2018). Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1218–1234. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.124>
- Catoira, M. C., Fusaro, L., Di Francesco, D., Ramella, M., & Boccafroschi, F. (2019). Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(10), 115. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>
- Celikkin, N., Rinoldi, C., Costantini, M., Trombetta, M., Rainer, A., & Świążkowski, W. (2017). Naturally derived proteins and glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1277–1299. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.016>
- Censi, R., Casadidio, C., Deng, S., Gigliobianco, M. R., Sabbieti, M. G., Agas, D., Laus, F., & Di Martino, P. (2020). Interpenetrating Hydrogel Networks Enhance Mechanical Stability, Rheological Properties, Release Behavior and Adhesiveness of Platelet-Rich Plasma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1399. <https://doi.org/10.3390/ijms21041399>
- Chahal, S., Kumar, A., & Hussian, F. S. J. (2019). Development of biomimetic electrospun polymeric biomaterials for bone tissue engineering. A review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(14), 1308–1355. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1630699>
- Chai, Q., Jiao, Y., & Yu, X. (2017). Hydrogels for biomedical applications: Their characteristics and the mechanisms behind them. *Gels*, 3(1). <https://doi.org/10.3390/gels3010006>
- Chamkouri, H. (2021). A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 11(6), 485–493. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2021.11.001682>
- Chen, Z., Zhang, J., Xiao, P., Tian, W., & Zhang, J. (2018). Novel Thermoplastic Cellulose Esters Containing Bulky Moieties and Soft Segments. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(4), 4931–4939. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04466>
- Cheng, L., Suresh K, S., He, H., Rajput, R. S., Feng, Q., Ramesh, S., Wang, Y., Krishnan, S., Ostrovidov, S., Camci-Unal, G., & Ramalingam, M. (2021). 3D Printing of Micro- and Nanoscale Bone Substitutes: A Review on Technical and Translational Perspectives. *International Journal of Nanomedicine, Volume 16*, 4289–4319.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S311001>

- Chimene, D., Miller, L., Cross, L. M., Jaiswal, M. K., Singh, I., & Gaharwar, A. K. (2020). Nanoengineered Osteoinductive Bioink for 3D Bioprinting Bone Tissue. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(14), 15976–15988. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b19037>
- Chung, H., & Washburn, N. R. (2012). Improved lignin polyurethane properties with lewis acid treatment. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 4(6). <https://doi.org/10.1021/am300425x>
- Cochis, A., Bonetti, L., Sorrentino, R., Contessi Negrini, N., Grassi, F., Leigh, M., Rimondini, L., & Farè, S. (2018). 3D Printing of Thermo-Responsive Methylcellulose Hydrogels for Cell-Sheet Engineering. *Materials*, 11(4), 579. <https://doi.org/10.3390/ma11040579>
- Cochran, B., Lunday, D., & Miskevich, F. (2008). Kinetic Analysis of Amylase Using Quantitative Benedict's and Iodine Starch Reagents. *Journal of Chemical Education*, 85(3), 401. <https://doi.org/10.1021/ed085p401>
- Cunniffe, G. M., & O'Brien, F. J. (2011). Collagen scaffolds for orthopedic regenerative medicine. *JOM*, 63(4), 66–73. <https://doi.org/10.1007/s11837-011-0061-y>
- Dai, L., Cheng, T., Duan, C., Zhao, W., Zhang, W., Zou, X., Aspler, J., & Ni, Y. (2019). 3D printing using plant-derived cellulose and its derivatives: A review. *Carbohydrate Polymers*, 203, 71–86. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.027>
- de Britto, D., & Assis, O. B. G. (2009). Thermal degradation of carboxymethylcellulose in different salty forms. *Thermochimica Acta*, 494(1–2), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.04.028>
- Diaz-Gomez, L., Gonzalez-Prada, I., Millan, R., Da Silva-Candal, A., Bugallo-Casal, A., Campos, F., Concheiro, A., & Alvarez-Lorenzo, C. (2022). 3D printed carboxymethyl cellulose scaffolds for autologous growth factors delivery in wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 278, 118924. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118924>
- Do, A.-V., Khorsand, B., Geary, S. M., & Salem, A. K. (2015). 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 4(12), 1742–1762. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500168>
- Dobaj Štiglic, A., Kargl, R., Beaumont, M., Strauss, C., Makuc, D., Egger, D., Plavec, J., Rojas, O. J., Stana Kleinschek, K., & Mohan, T. (2021). Influence of Charge and Heat on the Mechanical Properties of Scaffolds from Ionic Complexation of Chitosan and Carboxymethyl Cellulose. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 7(8), 3618–3632. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00534>
- Donderwinkel, I., Van Hest, J. C. M., & Cameron, N. R. (2017). Bio-inks for 3D bioprinting: Recent advances and future prospects. *Polymer Chemistry*, 8(31), 4451–4471. <https://doi.org/10.1039/c7py00826k>
- dos Santos, T. P. R., Franco, C. M. L., do Carmo, E. L., Jane, J., & Leonel, M. (2019). Effect of spray-drying and extrusion on physicochemical characteristics of sweet potato starch. *Journal of Food Science and*

- Technology*, 56(1), 376–383. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3498-y>
- Dsouza, A., Constantinidou, C., Arvanitis, T. N., Haddleton, D. M., Charmet, J., & Hand, R. A. (2022). Multifunctional Composite Hydrogels for Bacterial Capture, Growth/Elimination, and Sensing Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(42), 47323–47344. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c08582>
- Dutta, R. C., Dey, M., Dutta, A. K., & Basu, B. (2017). Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 35(2), 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.01.001>
- Dzobo, K., Motaung, K. S. C. M., & Adesida, A. (2019). Recent Trends in Decellularized Extracellular Matrix Bioinks for 3D Printing: An Updated Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4628. <https://doi.org/10.3390/ijms20184628>
- Egawa, E. Y., Kato, K., Hiraoka, M., Nakaji-Hirabayashi, T., & Iwata, H. (2011). Enhanced proliferation of neural stem cells in a collagen hydrogel incorporating engineered epidermal growth factor. *Biomaterials*, 32(21), 4737–4743. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.033>
- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>
- Everett, E., & Mathioudakis, N. (2018). Update on management of diabetic foot ulcers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1411(1), 153–165. <https://doi.org/10.1111/nyas.13569>
- Ferraz, C. A., Fontes, R. L. S., Fontes-Sant'Ana, G. C., Calado, V., López, E. O., & Rocha-Leão, M. H. M. (2019). Extraction, Modification, and Chemical, Thermal and Morphological Characterization of Starch From the Agro-Industrial Residue of Mango ( *Mangifera indica* L ) var. Ubá. *Starch - Stärke*, 71(1–2), 1800023. <https://doi.org/10.1002/star.201800023>
- Ferreira, N. N., Ferreira, L. M. B., Cardoso, V. M. O., Boni, F. I., Souza, A. L. R., & Gremião, M. P. D. (2018). Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches. *European Polymer Journal*, 99, 117–133. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.12.004>
- Floren, M., Bonani, W., Dharmarajan, A., Motta, A., Migliaresi, C., & Tan, W. (2016). Human mesenchymal stem cells cultured on silk hydrogels with variable stiffness and growth factor differentiate into mature smooth muscle cell phenotype. *Acta Biomaterialia*, 31, 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.051>
- Gao, F., Xu, Z., Liang, Q., Liu, B., Li, H., Wu, Y., Zhang, Y., Lin, Z., Wu, M., Ruan, C., & Liu, W. (2018). Direct 3D Printing of High Strength Biohybrid Gradient Hydrogel Scaffolds for Efficient Repair of Osteochondral Defect. *Advanced Functional Materials*, 28(13), 1706644. <https://doi.org/10.1002/adfm.201706644>
- Gharekhani, H., Olad, A., Mirmohseni, A., & Bybordi, A. (2017). Superabsorbent

- hydrogel made of NaAlg-g-poly(AA-co-AAm) and rice husk ash: Synthesis, characterization, and swelling kinetic studies. *Carbohydrate Polymers*, 168, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.047>
- Ghorpade, V. S., Yadav, A. V., & Dias, R. J. (2017). Citric acid crosslinked  $\beta$ -cyclodextrin/carboxymethylcellulose hydrogel films for controlled delivery of poorly soluble drugs. *Carbohydrate Polymers*, 164, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.005>
- Gillispie, G., Prim, P., Copus, J., Fisher, J., Mikos, A. G., Yoo, J. J., Atala, A., & Lee, S. J. (2020). Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*, 12(2), 022003. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6f0d>
- Guastaferro, M., Baldino, L., Reverchon, E., & Cardea, S. (2021). Production of Porous Agarose-Based Structures: Freeze-Drying vs. Supercritical CO<sub>2</sub> Drying. *Gels*, 7(4), 198. <https://doi.org/10.3390/gels7040198>
- Guilherme, M. R., Oliveira, R. S., Mauricio, M. R., Cellet, T. S. P., Pereira, G. M., Kunita, M. H., Muniz, E. C., & Rubira, A. F. (2012). Albumin release from a brain-resembling superabsorbent magnetic hydrogel based on starch. *Soft Matter*, 8(24), 6629. <https://doi.org/10.1039/c2sm25638j>
- Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. R. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*, 6(5), 915–946. <https://doi.org/10.1039/C7BM00765E>
- Habib, A., Sathish, V., Mallik, S., & Khoda, B. (2018). 3D Printability of Alginate-Carboxymethyl Cellulose Hydrogel. *Materials*, 11(3), 454. <https://doi.org/10.3390/ma11030454>
- He, X., Xia, W., Chen, R., Dai, T., Luo, S., Chen, J., & Liu, C. (2020). A new pre-gelatinized starch preparing by gelatinization and spray drying of rice starch with hydrocolloids. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115485. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115485>
- Heinze, T., El Seoud, O. A., & Koschella, A. (2018). *Cellulose Derivatives*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-73168-1>
- Heydari, Z., Najimi, M., Mirzaei, H., Shpichka, A., Ruoss, M., Farzaneh, Z., Montazeri, L., Piryaee, A., Timashev, P., Gramignoli, R., Nussler, A., Baharvand, H., & Vosough, M. (2020). Tissue Engineering in Liver Regenerative Medicine: Insights into Novel Translational Technologies. *Cells*, 9(2), 304. <https://doi.org/10.3390/cells9020304>
- Ho, T.-C., Chang, C.-C., Chan, H.-P., Chung, T.-W., Shu, C.-W., Chuang, K.-P., Duh, T.-H., Yang, M.-H., & Tyan, Y.-C. (2022). Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules*, 27(9), 2902. <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>
- Hong, Y., & Liu, X. (2018). Pre-gelatinized Modification of Starch. In *Physical Modifications of Starch* (pp. 51–61). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0725-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0725-6_4)
- Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D., & Ozbolat, I. T. (2017). The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances*,

- 35(2), 217–239. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.006>
- Hu, L., He, R., Lu, Z., Zhang, K., & Bai, X. (2019). Step-freeze-drying method for carbon aerogels: a study of the effects on microstructure and mechanical property. *RSC Advances*, 9(18), 9931–9936. <https://doi.org/10.1039/C9RA01328H>
- Islam, M. M., Shahruzzaman, M., Biswas, S., Nurus Sakib, M., & Rashid, T. U. (2020). Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review. *Bioactive Materials*, 5(1), 164–183. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
- Jang, J., Yi, H.-G., & Cho, D.-W. (2016). 3D Printed Tissue Models: Present and Future. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2(10), 1722–1731. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00129>
- Ji, S., Abaci, A., Morrison, T., Gramlich, W. M., & Guvendiren, M. (2020). Novel bioinks from UV-responsive norbornene-functionalized carboxymethyl cellulose macromers. *Bioprinting*, 18, e00083. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00083>
- Jia, J., Richards, D. J., Pollard, S., Tan, Y., Rodriguez, J., Visconti, R. P., Trusk, T. C., Yost, M. J., Yao, H., Markwald, R. R., & Mei, Y. (2014). Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomaterialia*, 10(10), 4323–4331. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.034>
- Jia, W., Gungor-Ozkerim, P. S., Zhang, Y. S., Yue, K., Zhu, K., Liu, W., Pi, Q., Byambaa, B., Dokmeci, M. R., Shin, S. R., & Khademhosseini, A. (2016). Direct 3D bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. *Biomaterials*, 106, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.038>
- Joseph Arockiam, A., Karthikeyan Subramanian, Padmanabhan, R. G., Rajeshkumar Selvaraj, Dilip Kumar Bagal, & Rajesh, S. (2022). A review on PLA with different fillers used as a filament in 3D printing. *Materials Today: Proceedings*, 50, 2057–2064. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.09.413>
- Kalirajan, C., Dukle, A., Nathanael, A. J., Oh, T.-H., & Manivasagam, G. (2021). A Critical Review on Polymeric Biomaterials for Biomedical Applications. *Polymers*, 13(17), 3015. <https://doi.org/10.3390/polym13173015>
- Kanwar, S., & Vijayavenkataraman, S. (2021). Design of 3D printed scaffolds for bone tissue engineering: A review. *Bioprinting*, 24(August). <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00167>
- Khaleghi, M., Ahmadi, E., Khodabandeh Shahraki, M., Aliakbari, F., & Morshedi, D. (2020). Temperature-dependent formulation of a hydrogel based on Hyaluronic acid-polydimethylsiloxane for biomedical applications. *Heliyon*, 6(3), e03494. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03494>
- Khan, M. U. A., Razaq, S. I. A., Mehboob, H., Rehman, S., Al-Arjan, W. S., & Amin, R. (2021). Antibacterial and Hemocompatible pH-Responsive Hydrogel for Skin Wound Healing Application: In Vitro Drug Release. *Polymers*, 13(21), 3703. <https://doi.org/10.3390/polym13213703>
- Koski, C., Onuike, B., Bandyopadhyay, A., & Bose, S. (2018). Starch-hydroxyapatite composite bone scaffold fabrication utilizing a slurry

- extrusion-based solid freeform fabricator. *Additive Manufacturing*, 24, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.addma.2018.08.030>
- Krishani, M., Shin, W. Y., Suhaimi, H., & Sambudi, N. S. (2023). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels*, 9(2), 100. <https://doi.org/10.3390/gels9020100>
- Kyle, S., Jessop, Z. M., Al-Sabah, A., & Whitaker, I. S. (2017). ‘Printability’ of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art.’ *Advanced Healthcare Materials*, 6(16), 1700264. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700264>
- Lai, W.-F., & He, Z.-D. (2016). Design and fabrication of hydrogel-based nanoparticulate systems for in vivo drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 243, 269–282. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.10.013>
- Larrea-Wachtendorff, D., Del Grosso, V., & Ferrari, G. (2022). Evaluation of the Physical Stability of Starch-Based Hydrogels Produced by High-Pressure Processing (HPP). *Gels*, 8(3), 152. <https://doi.org/10.3390/gels8030152>
- Leonardi, F., Angelone, M., Biacca, C., Battaglia, B., Pecorari, L., Conti, V., Costa, G. L., Ramoni, R., & Grolli, S. (2020). Platelet-rich Plasma Combined With a Sterile 3D Polylactic Acid Scaffold for Postoperative Management of Complete Hoof Wall Resection for Keratoma in Four Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 92, 103178. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103178>
- Li, K., Zhu, J., Guan, G., & Wu, H. (2019). Preparation of chitosan-sodium alginate films through layer-by-layer assembly and ferulic acid crosslinking: Film properties, characterization, and formation mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 485–492. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.188>
- Lim, D.-J. (2022). Cross-Linking Agents for Electrospinning-Based Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 5444. <https://doi.org/10.3390/ijms23105444>
- Lima, G. F., Souza, A. G., & Rosa, D. dos S. (2020). Nanocellulose as Reinforcement in Carboxymethylcellulose Superabsorbent Nanocomposite Hydrogels. *Macromolecular Symposia*, 394(1), 2000126. <https://doi.org/10.1002/masy.202000126>
- Liu, X., Wu, K., Gao, L., Wang, L., & Shi, X. (2022). Biomaterial strategies for the application of reproductive tissue engineering. *Bioactive Materials*, 14, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.11.023>
- Liu, Z., Yuan, X., Fernandes, G., Dziak, R., Ionita, C. N., Li, C., Wang, C., & Yang, S. (2017). The combination of nano-calcium sulfate/platelet rich plasma gel scaffold with BMP2 gene-modified mesenchymal stem cells promotes bone regeneration in rat critical-sized calvarial defects. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0574-6>
- Ma, H., Liu, M., Liang, Y., Zheng, X., Sun, L., Dang, W., Li, J., Li, L., & Liu, C. (2022). Research progress on properties of pre-gelatinized starch and its

- application in wheat flour products. *Grain & Oil Science and Technology*, 5(2), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2022.01.001>
- Ma, L., Chai, C., Wu, W., Qi, P., Liu, X., & Hao, J. (2023). Hydrogels as the plant culture substrates: A review. *Carbohydrate Polymers*, 305, 120544. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120544>
- Mallakpour, S., Tukhani, M., & Hussain, C. M. (2021). Recent advancements in 3D bioprinting technology of carboxymethyl cellulose-based hydrogels: Utilization in tissue engineering. *Advances in Colloid and Interface Science*, 292, 102415. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102415>
- Mancha Sánchez, E., Gómez-Blanco, J. C., López Nieto, E., Casado, J. G., Macías-García, A., Díaz Díez, M. A., Carrasco-Amador, J. P., Torrejón Martín, D., Sánchez-Margallo, F. M., & Pagador, J. B. (2020). Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(August). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00776>
- Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D.-H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, 34(4), 422–434. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>
- Mani, M. P., Sadia, M., Jaganathan, S. K., Khudzari, A. Z., Supriyanto, E., Saidin, S., Ramakrishna, S., Ismail, A. F., & Faudzi, A. A. M. (2022). A review on 3D printing in tissue engineering applications. *Journal of Polymer Engineering*, 42(3), 243–265. <https://doi.org/10.1515/polyeng-2021-0059>
- Masri, S., Zawani, M., Zulkiflee, I., Salleh, A., Fadilah, N. I. M., Maarof, M., Wen, A. P. Y., Duman, F., Tabata, Y., Aziz, I. A., Bt Hj Idrus, R. B. H., & Fauzi, M. B. (2022). Cellular Interaction of Human Skin Cells towards Natural Bioink via 3D-Bioprinting Technologies for Chronic Wound: A Comprehensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 476. <https://doi.org/10.3390/ijms23010476>
- Maver, T., Kurečič, M., Pivec, T., Maver, U., Gradišnik, L., Gašparič, P., Kaker, B., Bratuša, A., Hribernik, S., & Stana Kleinschek, K. (2020). Needleless electrospun carboxymethyl cellulose/polyethylene oxide mats with medicinal plant extracts for advanced wound care applications. *Cellulose*, 27(8), 4487–4508. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03079-9>
- Mohan, T., Dobaj Štiglic, A., Beaumont, M., Konnerth, J., Gürer, F., Makuc, D., Maver, U., Gradišnik, L., Plavec, J., Kargl, R., & Stana Kleinschek, K. (2020). Generic Method for Designing Self-Standing and Dual Porous 3D Bioscaffolds from Cellulosic Nanomaterials for Tissue Engineering Applications. *ACS Applied Bio Materials*, 3(2), 1197–1209. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01099>
- Munaz, A., Shiddiky, M. J. A., & Nguyen, N.-T. (2018). Recent advances and current challenges in magnetophoresis based micro magnetofluidics. *Biomicrofluidics*, 12(3), 031501. <https://doi.org/10.1063/1.5035388>
- Murphy, S. V., & Atala, A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32(8), 773–785. <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>



- Naghieh, S., & Chen, X. (2021). Printability—A key issue in extrusion-based bioprinting. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 11(5), 564–579. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.02.001>
- Naghieh, S., Karamooz-Ravari, M. R., Sarker, M., Karki, E., & Chen, X. (2018). Influence of crosslinking on the mechanical behavior of 3D printed alginate scaffolds: Experimental and numerical approaches. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 80, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.01.034>
- Namkaew, J., Laowpanitchakorn, P., Sawaddee, N., Jirajessada, S., Honsawek, S., & Yodmuang, S. (2021). Carboxymethyl Cellulose Entrapped in a Poly(vinyl) Alcohol Network: Plant-Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Molecules*, 26(3), 578. <https://doi.org/10.3390/molecules26030578>
- Ogunsona, E., Ojogbo, E., & Mekonnen, T. (2018). Advanced material applications of starch and its derivatives. *European Polymer Journal*, 108, 570–581. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.09.039>
- Omedi, J. O., Huang, W., Zhang, B., Li, Z., & Zheng, J. (2019). Advances in present-day frozen dough technology and its improver and novel biotech ingredients development trends-A review. *Cereal Chemistry*, 96(1), 34–56. <https://doi.org/10.1002/cche.10122>
- Ozbolat, I. T., & Hospodiuk, M. (2016). Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, 76, 321–343. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.076>
- Palanisamy, A., Deslandes, F., Ramaioli, M., Menut, P., Plana-Fattori, A., & Flick, D. (2020). Kinetic modelling of individual starch granules swelling. *Food Structure*, 26, 100150. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2020.100150>
- Pavlovic, V., Ciric, M., Jovanovic, V., Trandafilovic, M., & Stojanovic, P. (2021). Platelet-rich fibrin: Basics of biological actions and protocol modifications. *Open Medicine*, 16(1), 446–454. <https://doi.org/10.1515/med-2021-0259>
- Paxton, N., Smolan, W., Böck, T., Melchels, F., Groll, J., & Jungst, T. (2017). Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, 9(4), 044107. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8>
- Pettignano, A., Charlot, A., & Fleury, E. (2019). Solvent-Free Synthesis of Amidated Carboxymethyl Cellulose Derivatives: Effect on the Thermal Properties. *Polymers*, 11(7), 1227. <https://doi.org/10.3390/polym11071227>
- Pina, S., Ribeiro, V. P., Marques, C. F., Maia, F. R., Silva, T. H., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2019). Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Materials*, 12(11), 1824. <https://doi.org/10.3390/ma12111824>
- Piola, B., Sabbatini, M., Gino, S., Invernizzi, M., & Renò, F. (2022). 3D Bioprinting of Gelatin–Xanthan Gum Composite Hydrogels for Growth of Human Skin Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 539. <https://doi.org/10.3390/ijms23010539>
- Qian, Z., Wang, H., Bai, Y., Wang, Y., Tao, L., Wei, Y., Fan, Y., Guo, X., & Liu,

- H. (2020). Improving Chronic Diabetic Wound Healing through an Injectable and Self-Healing Hydrogel with Platelet-Rich Plasma Release. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(50), 55659–55674. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c17142>
- Raucci, M. G., Alvarez-Perez, M. A., Demitri, C., Giugliano, D., De Benedictis, V., Sannino, A., & Ambrosio, L. (2015). Effect of citric acid crosslinking cellulose-based hydrogels on osteogenic differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(6), 2045–2056. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35343>
- Reddy, N., & Yang, Y. (2010). Citric acid cross-linking of starch films. *Food Chemistry*, 118(3), 702–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.050>
- Reiss, J., Robertson, S., & Suzuki, M. (2021). Cell Sources for Cultivated Meat: Applications and Considerations throughout the Production Workflow. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7513. <https://doi.org/10.3390/ijms22147513>
- Revete, A., Aparicio, A., Cisterna, B. A., Revete, J., Luis, L., Ibarra, E., Segura González, E. A., Molino, J., & Reginensi, D. (2022). Advancements in the Use of Hydrogels for Regenerative Medicine: Properties and Biomedical Applications. *International Journal of Biomaterials*, 2022, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2022/3606765>
- Rohman, G., Langueh, C., Ramtani, S., Lataillade, J.-J., Lutowski, D., Senni, K., & Changotade, S. (2019). The Use of Platelet-Rich Plasma to Promote Cell Recruitment into Low-Molecular-Weight Fucoidan-Functionalized Poly(Ester-Urea-Urethane) Scaffolds for Soft-Tissue Engineering. *Polymers*, 11(6), 1016. <https://doi.org/10.3390/polym11061016>
- Roy, J., Ferri, A., Giraud, S., Jinping, G., & Salaün, F. (2018). Chitosan–Carboxymethylcellulose-Based Polyelectrolyte Complexation and Microcapsule Shell Formulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2521. <https://doi.org/10.3390/ijms19092521>
- Sadeghi-Ataabadi, M., Mostafavi-pour, Z., Vojdani, Z., Sani, M., Latifi, M., & Talaei-Khozani, T. (2017). Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering C*, 71, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.001>
- Sánchez-Cid, P., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., & Pérez-Puyana, V. (2022). Novel Trends in Hydrogel Development for Biomedical Applications: A Review. *Polymers*, 14(15). <https://doi.org/10.3390/polym14153023>
- Sánchez-Ferrero, A., Mata, Á., Mateos-Timoneda, M. A., Rodríguez-Cabello, J. C., Alonso, M., Planell, J., & Engel, E. (2015). Development of tailored and self-mineralizing citric acid-crosslinked hydrogels for in situ bone regeneration. *Biomaterials*, 68, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.07.062>
- Schmid, R., Schmidt, S. K., Detsch, R., Horder, H., Blunk, T., Schrüfer, S., Schubert, D. W., Fischer, L., Thievensen, I., Heltmann-Meyer, S., Steiner, D., Schneidereit, D., Friedrich, O., Grüneboom, A., Amouei, H., Wajant, H., Horch, R. E., Bosserhoff, A. K., Arkudas, A., & Kengelbach-Weigand, A.

- (2022). A New Printable Alginate/Hyaluronic Acid/Gelatin Hydrogel Suitable for Biofabrication of In Vitro and In Vivo Metastatic Melanoma Models. *Advanced Functional Materials*, 32(2), 2107993. <https://doi.org/10.1002/adfm.202107993>
- Sharma, S., & Tiwari, S. (2020). A review on biomacromolecular hydrogel classification and its applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.110>
- Shokouhimehr, M., Theus, A. S., Kamalakar, A., Ning, L., Cao, C., Tomov, M. L., Kaiser, J. M., Goudy, S., Willett, N. J., Jang, H. W., LaRock, C. N., Hanna, P., Lechtig, A., Yousef, M., Martins, J. D. S., Nazarian, A., Harris, M. B., Mahmoudi, M., & Serpooshan, V. (2021). 3D Bioprinted Bacteriostatic Hyperelastic Bone Scaffold for Damage-Specific Bone Regeneration. *Polymers*, 13(7), 1099. <https://doi.org/10.3390/polym13071099>
- Shui, T., Feng, S., Chen, G., Li, A., Yuan, Z., Shui, H., Kuboki, T., & Xu, C. (2017). Synthesis of sodium carboxymethyl cellulose using bleached crude cellulose fractionated from cornstalk. *Biomass and Bioenergy*, 105, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.06.016>
- Sikdar, P., Uddin, M. M., Dip, T. M., Islam, S., Hoque, M. S., Dhar, A. K., & Wu, S. (2021). Recent advances in the synthesis of smart hydrogels. *Materials Advances*, 2(14), 4532–4573. <https://doi.org/10.1039/D1MA00193K>
- Singh, S., & Ramakrishna, S. (2017). Biomedical applications of additive manufacturing: Present and future. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 2, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.05.006>
- Siroha, A. K., Sandhu, K. S., & Punia, S. (2019). Impact of octenyl succinic anhydride on rheological properties of sorghum starch. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(3), 221–229. <https://doi.org/10.3920/QAS2018.1379>
- Sornlar, W., Wannagon, A., & Supothina, S. (2021). Stabilized homogeneous porous structure and pore type effects on the properties of lightweight kaolinite-based geopolymers. *Journal of Building Engineering*, 44, 103273. <https://doi.org/10.1016/j.jobbe.2021.103273>
- Štiglic, A. D., Gürer, F., Lackner, F., Bračič, D., Winter, A., Gradišnik, L., Makuc, D., Kargl, R., Duarte, I., Plavec, J., Maver, U., Beaumont, M., Kleinschek, K. S., & Mohan, T. (2022). Organic acid cross-linked 3D printed cellulose nanocomposite bioscaffolds with controlled porosity, mechanical strength, and biocompatibility. *IScience*, 25(5), 104263. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104263>
- Sun, H., Hu, C., Zhou, C., Wu, L., Sun, J., Zhou, X., Xing, F., Long, C., Kong, Q., Liang, J., Fan, Y., & Zhang, X. (2020). 3D printing of calcium phosphate scaffolds with controlled release of antibacterial functions for jaw bone repair. *Materials & Design*, 189, 108540. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108540>
- Sun, W., Starly, B., Daly, A. C., Burdick, J. A., Groll, J., Skeldon, G., Shu, W., Sakai, Y., Shinohara, M., Nishikawa, M., Jang, J., Cho, D.-W., Nie, M.,

- Takeuchi, S., Ostrovidov, S., Khademhosseini, A., Kamm, R. D., Mironov, V., Moroni, L., & Ozbolat, I. T. (2020). The bioprinting roadmap. *Biofabrication*, 12(2), 022002. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab5158>
- Supare, K., & Mahanwar, P. (2022). Starch-Chitosan Hydrogels for the Controlled-Release of Herbicide in Agricultural Applications: A Study on the Effect of the Concentration of Raw Materials and Crosslinkers. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(6), 2448–2461. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02379-4>
- Tallapaneni, V., Kalaivani, C., Pamu, D., Mude, L., Singh, S. K., & Karri, V. V. S. R. (2021). Acellular Scaffolds as Innovative Biomaterial Platforms for the Management of Diabetic Wounds. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 18(5), 713–734. <https://doi.org/10.1007/s13770-021-00344-1>
- Tuan Mohamood, N. F. A.-Z., Abdul Halim, A. H., & Zainuddin, N. (2021). Carboxymethyl Cellulose Hydrogel from Biomass Waste of Oil Palm Empty Fruit Bunch Using Calcium Chloride as Crosslinking Agent. *Polymers*, 13(23), 4056. <https://doi.org/10.3390/polym13234056>
- Uliniuc, A., Hamaide, T., Popa, M., & Băcăiță, S. (2013). Modified Starch-Based Hydrogels Cross-Linked with Citric Acid and their use as Drug Delivery Systems for Levofloxacin. *Soft Materials*, 11(4), 483–493. <https://doi.org/10.1080/1539445X.2012.710698>
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 414–433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>
- Uranga, J., Puertas, A. I., Etxabide, A., Dueñas, M. T., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2019). Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films. *Food Hydrocolloids*, 86, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.018>
- Vendramin, F. S., Franco, D., Nogueira, C. M., Pereira, M. S., & Franco, T. R. (2006). Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *Revista Do Colégio Brasileiro de Cirurgias*, 33(1), 24–28. <https://doi.org/10.1590/S0100-69912006000100007>
- Vieira, M. A., Schiass, M. C. E. V., Dias, A. C. C., Curi, P. N., Pereira, P. A. P., Carneiro, J. D. D. S., Borges, S. V., & Queiroz, F. (2021). Optimization of texture profile analysis parameters for commercial guava preserve. *Revista Ceres*, 68(6), 530–538. <https://doi.org/10.1590/0034-737x202168060004>
- Wang, F., Cai, X., Shen, Y., & Meng, L. (2023). Cell–scaffold interactions in tissue engineering for oral and craniofacial reconstruction. *Bioactive Materials*, 23, 16–44. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.10.029>
- Wang, Q., Li, L., & Zheng, X. (2020). A review of milling damaged starch: Generation, measurement, functionality and its effect on starch-based food systems. *Food Chemistry*, 315, 126267. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126267>
- Willems, C., Trutschel, M., Mazaikina, V., Strätz, J., Mäder, K., Fischer, S., &

- Groth, T. (2021). Hydrogels Based on Oxidized Cellulose Sulfates and Carboxymethyl Chitosan: Studies on Intrinsic Gel Properties, Stability, and Biocompatibility. *Macromolecular Bioscience*, 21(8), 2100098. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100098>
- Wu, H., Lei, Y., Lu, J., Zhu, R., Xiao, D., Jiao, C., Xia, R., Zhang, Z., Shen, G., Liu, Y., Li, S., & Li, M. (2019). Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films. *Food Hydrocolloids*, 97, 105208. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105208>
- Xavier, J. R., Thakur, T., Desai, P., Jaiswal, M. K., Sears, N., Cosgriff-Hernandez, E., Kaunas, R., & Gaharwar, A. K. (2015). Bioactive Nanoengineered Hydrogels for Bone Tissue Engineering: A Growth-Factor-Free Approach. *ACS Nano*, 9(3), 3109–3118. <https://doi.org/10.1021/nn507488s>
- Xie, H., Du, H., Yang, X., & Si, C. (2018). Recent Strategies in Preparation of Cellulose Nanocrystals and Cellulose Nanofibrils Derived from Raw Cellulose Materials. *International Journal of Polymer Science*, 2018, 1–25. <https://doi.org/10.1155/2018/7923068>
- Xu, C., Dai, G., & Hong, Y. (2019). Recent advances in high-strength and elastic hydrogels for 3D printing in biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 95, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.032>
- Ye, J., Hu, X., Luo, S., Liu, W., Chen, J., Zeng, Z., & Liu, C. (2018). Properties of Starch after Extrusion: A Review. *Starch - Stärke*, 70(11–12), 1700110. <https://doi.org/10.1002/star.201700110>
- Ye, J., Hu, X., Zhang, F., Fang, C., Liu, C., & Luo, S. (2016). Freeze-thaw stability of rice starch modified by Improved Extrusion Cooking Technology. *Carbohydrate Polymers*, 151, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.026>
- Yue, Z., Liu, X., Coates, P. T., & Wallace, G. G. (2016). Advances in printing biomaterials and living cells. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 21(5), 467–475. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000346>
- Zamboulis, A., Michailidou, G., Koumentakou, I., & Bikiaris, D. N. (2022). Polysaccharide 3D Printing for Drug Delivery Applications. *Pharmaceutics*, 14(1), 145. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010145>
- Zaszczyńska, A., Moczulska-Heljak, M., Gradys, A., & Sajkiewicz, P. (2021). Advances in 3D Printing for Tissue Engineering. *Materials*, 14(12), 3149. <https://doi.org/10.3390/ma14123149>
- Zennifer, A., Senthilvelan, P., Sethuraman, S., & Sundaramurthi, D. (2021). Key advances of carboxymethyl cellulose in tissue engineering & 3D bioprinting applications. *Carbohydrate Polymers*, 256(December 2020), 117561. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117561>
- Zhang, X. N., Zheng, Q., & Wu, Z. L. (2022). Recent advances in 3D printing of tough hydrogels: A review. *Composites Part B: Engineering*, 238, 109895. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.109895>
- Zhu, S., Li, Y., He, Z., Ji, L., Zhang, W., Tong, Y., Luo, J., Yu, D., Zhang, Q., & Bi, Q. (2022). Advanced injectable hydrogels for cartilage tissue

- engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.954501>
- Zhu, X., Chen, J., Hu, Y., Zhang, N., Fu, Y., & Chen, X. (2021). Tuning complexation of carboxymethyl cellulose/ cationic chitosan to stabilize Pickering emulsion for curcumin encapsulation. *Food Hydrocolloids*, 110, 106135. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106135>
- Zhuang, P., Greenberg, Z., & He, M. (2021). Biologically Enhanced Starch Bio-Ink for Promoting 3D Cell Growth. *Advanced Materials Technologies*, 6(12), 2100551. <https://doi.org/10.1002/admt.202100551>