



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO, DE CIÊNCIAS EXATAS E EDUCAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA, PROCESSOS E
MATERIAIS AVANÇADOS (PPGNPMat)

Aline Machado Bessow Machado

**Fabricação de *scaffolds* de alginato/amido/bentonita para regeneração óssea
por impressão 3D**

Blumenau

2025

Aline Machado Bessow Machado

**Fabricação de *scaffolds* de alginato/amido/bentonita para regeneração óssea
por impressão 3D**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados (PPGNPMat) da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.

Orientador(a): Profa. Dra. Larissa Nardini Carli

Blumenau
2025

Machado, Aline Machado Bessow

Fabricação de *scaffolds* de alginato/amido/bentonita para regeneração óssea por impressão 3D / Aline Machado Bessow Machado ; orientadora, Larissa Nardini Carli, 2025.
83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Blumenau, Programa de Pós-Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados, Blumenau, 2025.

Inclui referências.

1. Nanociência, Processos e Materiais Avançados. 2. Bioimpressão. 3. Engenharia tecidual. 4. Manufatura aditiva. 5. Arcabouço. I. Carli, Larissa Nardini. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Nanociência, Processos e Materiais Avançados. III. Título.

Aline Machado Bessow Machado

**Fabricação de *scaffolds* de alginato/amido/bentonita para regeneração óssea
por impressão 3D**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 29 de agosto de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Luiz Fernando Rodrigues Junior, Dr.
Universidade Franciscana (UFN)

Prof. Tales da Silva Daitx, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Claudia Merlini, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Nanociência, Processos e Materiais Avançados.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Profa. Larissa Nardini Carli, Dra.
Orientadora

Blumenau, 2025.

A minha mãe que me apoiou e acreditou em mim durante todo o processo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha mãe Neli que se dispôs a mudar de cidade comigo para eu poder realizar esse sonho. Esse projeto não teria sido completado ou iniciado sem o seu apoio. Sem dúvida não poderia ter escolhido uma mãe melhor, não tenho palavras para descrever tudo que fez por mim. Espero um dia poder retribuir todo apoio e confiança.

A minha orientadora Larissa Carli pela confiança, paciência e compressão durante todas as etapas desse projeto, muito obrigada. Foi uma experiência incrível ser sua orientanda. E a todas do meu grupo de pesquisa pelo acolhimento e carinho, com destaque as minhas Ics Tânia da Silva e Ana Carolina Mendes que se esforçaram muito para podermos finalizar esse trabalho.

Sou muito grata a todos os professores que encontrei nesse programa e pelos ensinamentos que recebi. Sei que irei levar o que aprendi durante toda a minha carreira.

Aos professores Luiz Rodrigues Junior, Tales Daitx e Cristiano Teixeira pela disponibilidade em realizar parcerias e análises, enriquecendo esse projeto de maneira imensurável.

Gostaria de agradecer as agências fomentadoras CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro. Apoiar o avanço da ciência é essencial.

E por último eu gostaria de agradecer os meus amigos que escutaram meus longos áudios no WhatsApp oferecendo consolo cada vez que algo dava errado e comemorando comigo cada vitória. Destaque ao Renan que os conselhos acadêmicos me ajudaram a escrever o meu projeto de pesquisa para entrar no mestrado.

RESUMO

O campo da engenharia tecidual é considerado atualmente a maneira mais promissora de reparar defeitos ósseos críticos. Geralmente, utiliza-se *scaffolds*, estruturas que oferecem sustentação para proliferação celular. A bioimpressão por extrusão é um método rápido, de relativo baixo custo e escalonável para a fabricação de *scaffolds* destinados à regeneração óssea. Entre os materiais mais utilizados encontra-se o alginato, um polímero natural, biocompatível e de baixo custo que, ao entrar em contato com íons bivalentes e trivalentes, passa por um processo de reticulação. Entretanto, *scaffolds* fabricados por soluções compostas somente de alginato apresentam pouca adesão celular e propriedades mecânicas inadequadas. O amido é um polímero natural, acessível, altamente biocompatível e hidrofílico, a sua combinação com alginato tem o potencial para promover melhorias nas propriedades mecânicas e adesão celular dos *scaffolds*. A montmorilonita é um argilomineral de origem natural componente principal da argila bentonita, com uma grande área específica, podendo alterar as propriedades mecânicas e reológicas dos *scaffolds* onde estão inseridas. Neste estudo, foram desenvolvidas biotintas contendo alginato/amido e adicionando diferentes teores de bentonita para a produção de *scaffolds* por meio da bioimpressão por extrusão. Os *scaffolds* resultantes foram avaliados de acordo com suas propriedades mecânicas, taxa de degradação e biocompatibilidade. A solução com 4% m/v de argila resultou em filamentos com menor espalhamento e maior viscosidade aparente, consequentemente imprimindo *scaffolds* com maior fidelidade ao modelo computacional gerado. A presença do amido tornou o processo de degradação dos *scaffolds* uniforme e aumentou a hidrofiliabilidade do material. A presença da argila, por sua vez, possuiu um efeito positivo nas propriedades mecânicas do *scaffold* a 37 °C. Por meio da mistura dos três materiais foi possível a obtenção de *scaffolds* de até 20 camadas com propriedades distintas.

Palavras-chave: Manufatura aditiva; Engenharia tecidual; Arcabouços, Polímeros naturais, Medicina personalizada.

ABSTRACT

The field of tissue engineering is currently considered one of the more promising ways to repair critical bone defects. In this context, scaffolds, a structure that offers support for cell proliferation, are widely used. Extrusion bioprinting is a fast, relatively low-cost and scalable method for manufacturing scaffolds for bone regeneration. Alginate is one of the most used materials. It is a natural, biocompatible, and low-cost polymer that cross-links when in contact with bivalent and trivalent ions. However, scaffolds manufactured using inks composed only by alginate present poor cell adhesion and poor mechanical properties. Starch is a natural, easily available, highly biocompatible and hydrophilic polymer. Its combination with alginate is a promising strategy to significantly improve the mechanical proprieties of the scaffold and cell adhesion. Montmorillonite is a naturally occurring clay mineral and the principal component of bentonite clay, with a large specific surface area that can improve the mechanical and rheological properties of the scaffold. In this study, bioinks containing alginate/starch with different percentages of bentonite were developed for the production of scaffolds through extrusion bioprinting. The resulting scaffolds were evaluated according to their mechanical properties, degradation rate, and biocompatibility. The 4% w/v clay solution produced filaments with less spreading and greater visual viscosity, consequently printing scaffolds with superior shape-fidelity to the generated computational model. The presence of starch made the scaffold biodegradation process regular and increased the material's hydrophilicity. Moreover, the clay had a positive effect on the scaffold's mechanical properties at 37 °C. By combining the three materials, it was possible to obtain 20 layers scaffolds with distinct properties.

Keywords: Additive manufacturing; Tissue Engineer; *Scaffolds*; Natural polymers, Personalized medicine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVOS GERAIS	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1	ENGENHARIA TECIDUAL E REGENERAÇÃO ÓSSEA	14
3.1.1	Métodos de tratamentos atuais	15
3.1.2	Estrutura e regeneração óssea	16
3.2	BIOIMPRESSÃO.....	18
3.2.1	Printabilidade	21
3.2.1.1	<i>Filamentos impressos</i>	23
3.3	MATERIAIS PARA BIOIMPRESSÃO.....	24
3.3.1	Alginato	25
3.3.1.1	<i>Reticulação do alginato</i>	27
3.3.2	Amido	29
3.3.2.1	<i>Solubilização do amido</i>	30
3.3.2.2	<i>Uso de amido na bioimpressão</i>	31
3.3.3	Bentonita	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	MATERIAIS.....	36
4.2	PREPARAÇÃO DAS TINTAS	36
4.3	BIOIMPRESSÃO.....	37
4.4	ESCOLHA DO TEOR DE BENT	38
4.4.1	Análise de viscosidade	38
4.4.2	Análise da morfologia dos filamentos	38
4.5	ANÁLISE DE DIFERENTES RETICULANTES E TEMPO DE RETICULAÇÃO.....	39
4.5.1	Análise da morfologia e interação entre os <i>scaffolds</i> e os agentes reticulantes	40
4.5.2	Características químicas de superfície	40
4.5.3	Degradação e intumescimento	40

4.5.4	Morfologia	41
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS OBTIDOS	41
4.6.1	Caracterização térmica	41
4.6.2	Ensaio mecânico de compressão	42
4.6.3	Ângulo de contato	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	ESCOLHA DO TEOR DE BENT	43
5.1.1	Análise qualitativa da viscosidade	43
5.1.2	Morfologia	45
5.1.2.1	<i>Análise visual</i>	45
5.1.2.2	<i>Microscopia ótica</i>	46
5.1.3	Conclusões parciais	51
5.2	ANÁLISE DOS DIFERENTES AGENTES RETICULANTES	52
5.2.1	Morfologia	52
5.2.1.1	<i>Microscopia ótica</i>	52
5.2.2	Intumescimento e degradação	54
5.2.3	Morfologia	60
5.2.4	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	61
5.2.4.1	<i>Caracterização dos materiais puros</i>	61
5.2.4.2	<i>Caracterização dos scaffolds reticulados CaCl₂</i>	62
5.2.5	Conclusões parciais	64
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO SCAFFOLD SELECIONADO	65
5.3.1	Morfologia	65
5.3.2	Caracterização térmica	66
5.3.3	Ensaio de compressão mecânica	71
5.3.4	Ângulo de contato com a água	72
6	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

Fraturas ósseas são definidas como perda na continuidade do osso (Singaram; Naidoo, 2019). Estima-se que em 2019 ocorreram cerca de 178 milhões de novos casos ao redor do mundo, afetando principalmente a população mais velha (Wu et al., 2021). O osso possui uma capacidade ótima de regeneração (Zhu et al., 2021), mas quando a fratura ultrapassa a habilidade natural de regeneração do corpo, esta é chamada de defeito ósseo crítico. Neste caso, são necessários estímulos externos para auxiliar no processo de cicatrização. O campo da engenharia tecidual óssea é considerado atualmente a maneira mais promissora de reparar esses defeitos. Ele busca criar substitutos biológicos a fim de manter, restaurar ou substituir a função do tecido ósseo (Madrid et al., 2019).

Geralmente, utilizam-se de *scaffolds*, estruturas que oferecem suporte estrutural para proliferação celular, para alcançar esse objetivo (Kalhori et al., 2022). A bioimpressão 3D é atualmente uma das técnicas de biofabricação emergente mais promissora. Ela permite a criação de *scaffolds* de maneira controlada seguindo um modelo computacional pré-programado (Gao et al., 2021). Dentre as várias técnicas de bioimpressão existe a bioimpressão por extrusão, que é uma das mais utilizadas devido ao seu relativo baixo custo, simplicidade, escalabilidade e velocidade. Ela consiste na deposição controlada e automática de uma solução, denominada tinta ou, no caso de possuir células em sua composição, biotinta (Gao et al., 2021; Murab et al., 2022).

Dentre os materiais mais utilizados como base de biotintas está o alginato, um polímero de origem natural derivado de algas marrons. A popularidade do seu uso na engenharia tecidual se dá por diversos fatores: baixo custo de obtenção, biocompatibilidade, biodegradabilidade e sua capacidade de reticulação (Gao et al., 2021; Murab et al., 2022). No entanto, sua pobre adesão celular e propriedades mecânicas inadequadas tornam-se empecilhos quando utilizado para regeneração tecidual (Lee; Mooney, 2012). Uma das maneiras de transpor as limitações do alginato é misturando-o com outros polímeros (Jovic et al., 2019).

O amido é um polissacarídeo de baixo custo de obtenção presente na natureza de forma abundante. Ele se encontra nas plantas na forma de grânulos semicristalinos, composto por graus variados de amilose e amilopectina (Robyt, 2008). Por ser biocompatível, não-toxico e biodegradável, seu uso vem sendo

explorado na engenharia tecidual (Roslan *et al.*, 2016). De acordo com a literatura, *scaffolds* com altas concentrações de amido tem apresentado melhor resistência à compressão e citocompatibilidade (Lin *et al.*, 2021).

A bentonita (Bent) é uma argila muito empregada em diferentes processos, como isolante em processos hidráulicos, na clarificação de vinhos e em conjunto com fármacos para prolongar a sua liberação (Kabdrakhmanova *et al.*, 2025). A bentonita é composta majoritariamente por montmorilonita (Mt), um argilomineral pertencente à família dos filossilicatos 2:1 cuja estrutura cristalina de cerca de 1 nm de espessura consiste em duas folhas tetraédricas de sílica com uma folha central octaédrica de alumina, unidas entre si por átomos de oxigênio comuns a ambas as folhas (Park *et al.*, 2016). A adição de montmorilonita a biotintas pode contribuir para a melhora das propriedades reológicas e mecânicas nos *scaffolds* obtidos e uma maior adesão celular. A presença de aluminossilicatos a torna um potencial osteoindutor, fazendo seu uso na engenharia tecidual óssea promissor (García-Villén *et al.*, 2021).

Neste trabalho, foram produzidos *scaffolds* para regeneração de tecidos ósseos a partir de blendas de alginato/amido/bentonita, utilizando o método de bioimpressão por extrusão. A formação de blendas com amido com a incorporação de bentonita tem a finalidade de aumentar a viscosidade aparente da solução, facilitando a impressão e fazendo com que os *scaffolds* resultantes sejam mais fiéis ao modelo original. Adicionalmente, busca-se uma melhoria da estabilidade e propriedades mecânicas do *scaffolds* produzidos, tornando possível a impressão de estruturas com 20 camadas sem a obstrução dos seus poros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Produzir *scaffolds* de amido/alginato com a incorporação de diferentes teores de argila bentonita por meio da bioimpressão por extrusão para aplicação na regeneração óssea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito que diferentes teores de bentonita possuem nas propriedades reológicas da tinta e na fidelidade de forma dos *scaffolds*;
- Comparar o efeito de diferentes reticulantes na estabilidade e processo de degradação dos *scaffolds*;
- Avaliar o efeito da combinação entre alginato, amido e bentonita na morfologia e nas propriedades mecânicas e térmicas dos *scaffolds* produzidos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ENGENHARIA TECIDUAL E REGENERAÇÃO ÓSSEA

Fraturas ósseas são definidas como perda na continuidade óssea (Singaram; Naidoo, 2019). Estima-se que em 2019 ocorreram cerca de 178 milhões novos casos ao redor do mundo, afetando principalmente a população mais velha (Wu *et al.*, 2021). No Brasil, entre os anos 2012 e 2022, aproximadamente 5,12% de todas as internações hospitalares no Sistema Único de Saúde (SUS) foram devido a fraturas ósseas. Foram gastos nesse período R\$ 7.362.257.905,12 com internações hospitalares, não sendo contabilizadas as perdas econômicas individuais e gerais, já que a maior demografia dessas internações foi de jovens entre 20 e 29 anos, idade onde se inicia a inserção no mercado de trabalho (Barros *et al.*, 2023).

Se não tratadas corretamente, as fraturas podem levar a sérias complicações, tanto físicas, psicológicas e/ou mentais, nos casos mais graves podendo levar até a morte (Singaram; Naidoo, 2019). No Brasil, entre 2012 e 2022, obteve-se uma taxa de mortalidade de aproximadamente 8,5%. Dentre as fraturas que mais mataram está a do fêmur (3,5%), a qual ocorre com mais frequência em idosos e com uma maior letalidade entre as mulheres. A mortalidade está relacionada a complicações pós-operatórias e perda de mobilidade. Em segundo lugar, estão fraturas do tórax e pelve (2,57%). Dentre os fatores de risco está a proximidade a órgãos internos, podendo levar a hemorragia (Barros *et al.*, 2023)

Dentre as complicações físicas menos letais das fraturas, durante o período de recuperação, estão as limitações da habilidade da pessoa em realizar tarefas independentemente. Em longo prazo, problemas como osteoartrite e dor crônica podem aparecer. Socialmente, as fraturas podem limitar a participação em eventos sócios culturais, principalmente em locais com acessibilidade limitada. A habilidade da pessoa de trabalhar também pode ser afetada, causando problemas financeiros, podendo resultar numa maior dependência da família e amigos financeiramente, o que pode gerar tensão nos relacionamentos.

Ainda, essas limitações podem afetar negativamente a saúde mental da pessoa machucada, podendo levar à depressão. Também, existe a possibilidade de desenvolvimento de stress pós-traumático e isolamento social auto imposto,

evitando atividades sociais por acreditar que essas possam levar a uma nova fratura (Singaram; Naidoo, 2019).

3.1.1 Métodos de tratamentos atuais

Em comparação com outros tecidos do corpo humano, o osso possui uma capacidade muito boa de regeneração (Zhu *et al.*, 2021), possuindo a habilidade de regenerar-se sem a formação de cicatriz (Allen *et al.*, 2021). Porém, quando a fratura ultrapassa a habilidade natural do corpo de regeneração, tem-se o chamado defeito ósseo crítico, sendo necessários estímulos externos para auxiliar no processo de cicatrização (Madrid *et al.*, 2019). Os implantes que atualmente apresentam melhores resultados são os autógenos, retirados da própria pessoa. Entretanto, estes apresentam diversos problemas, como a necessidade de duas cirurgias, limitações em relação ao tamanho que pode ser retirado e a possibilidade de morbidade do osso do qual o implante foi retirado (Allen *et al.*, 2021). A separação do osso da sua rede vascular também pode levar a necrose do implante, ocasionando sérias complicações ao paciente (Murab *et al.*, 2022).

Outra opção de tratamento é a utilização de implantes halógenos, feitos entre indivíduos da mesma espécie. Após a retirada do doador, o implante necessita passar por um tratamento para remoção do material genético para evitar a transmissão de doenças e rejeição. A eficácia desse tratamento é variada, o que leva a altos graus de infecção. O tratamento também pode afetar a capacidade do implante de promover regeneração óssea (Allen *et al.*, 2021).

Adicionalmente, é possível o uso de implantes do tipo xenoenxerto, feitos entre indivíduos de espécies diferentes, geralmente outro mamífero, mais comumente um bovino (Abushama *et al.*, 2025). No entanto, eles apresentam uma menor taxa de integração óssea, com alto risco de rejeição imunológica e alto risco de transmissão de doenças (Allen *et al.*, 2021; Witzler *et al.*, 2019).

Implantes sintéticos se apresentam como uma solução para os problemas descritos previamente. Eles possuem suplemento ilimitado e suas propriedades podem ser alteradas de modo a suprir as necessidades específicas do paciente (Allen *et al.*, 2021). Por isso, o campo da engenharia tecidual óssea é considerado atualmente uma maneira promissora para reparar esses defeitos. Ela busca criar substitutos biológicos a fim de manter, restaurar ou substituir a função do tecido

ósseo (Madrid *et al.*, 2019), geralmente utilizando um *scaffold* para alcançar esse objetivo. *Scaffolds* são estruturas que oferecem suporte estrutural para proliferação celular, além de manter sinais bioquímicos e bioelétricos excretados pelas células (Kalhori *et al.*, 2022).

O *scaffold* ideal para regeneração óssea deve possuir propriedades mecânicas semelhantes às do tecido ósseo que deseja regenerar, incluindo uma estrutura porosa interconectada, promovendo a difusão de nutrientes e adsorção de proteínas. Além disto, deve ser feito de um material biocompatível, osteocondutivo e osteogênico e ser biodegradável, evitando a necessidade de uma segunda cirurgia. Para isso, deve se dissociar numa velocidade semelhante à do crescimento ósseo, já que uma degradação muito rápida significaria na perda do suporte mecânico. Por outro lado, uma degradação muito lenta barraria a formação de um novo tecido (Allen *et al.*, 2021).

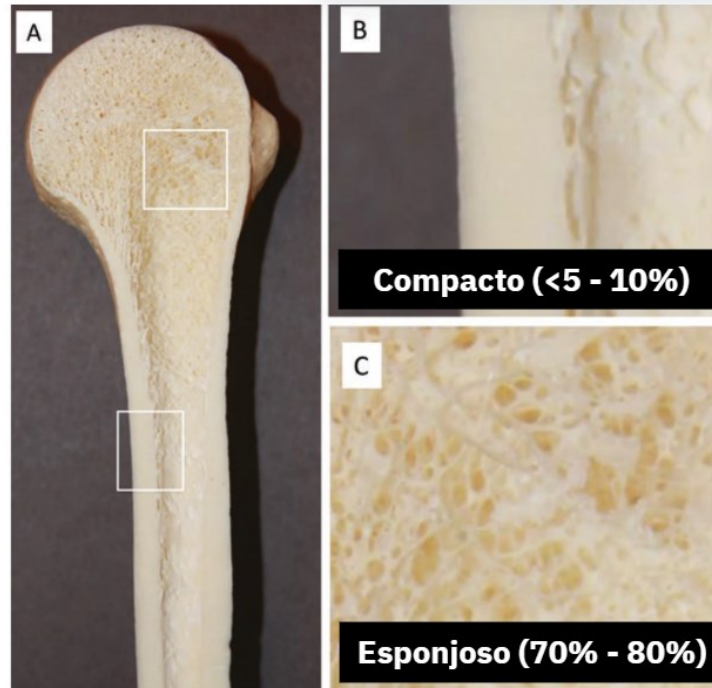
3.1.2 Estrutura e regeneração óssea

Para criar um implante adequado é necessário entender um pouco sobre a estrutura e o processo de regeneração óssea. O osso é um material composto por uma matriz inorgânica (65%), matriz orgânica (25%) e água. Sua função no esqueleto humano é oferecer suporte mecânico e proteção aos órgãos internos. A maior parte do esqueleto humano (80%) é formado por osso compactado (Figura 1), com um baixo grau de porosidade (<5% - 10%). O restante é composto por osso esponjoso com alto grau de porosidade (70% - 80%) (Allen *et al.*, 2021). Os diferentes graus de porosidade conferem propriedades mecânicas distintas que devem ser levadas em consideração na fabricação de um *scaffold* (Walsh *et al.*, 2019).

O osso está em um constante processo de renovação chamado remodelação. Esse processo é regulado por células chamadas osteócitos, responsáveis por manter a homeostases do osso. A remodelação pode ser descrita de maneira simplificada em duas etapas. Na primeira etapa, células chamadas osteoclastos irão reabsorver a matriz óssea. Na segunda etapa, células chamadas osteoblastos irão secretar a base da nova matriz óssea. Os osteoblastos secretam principalmente colágeno tipo 1, componente majoritário da matriz orgânica. Com o tempo, cristais minerais irão se acumular nessa matriz secretada, podendo demorar

até um ano para atingir a mineralização completa (Allen *et al.*, 2021). O componente majoritário da fração inorgânica é hidroxapatita cristalina (Feng, Xu, 2009).

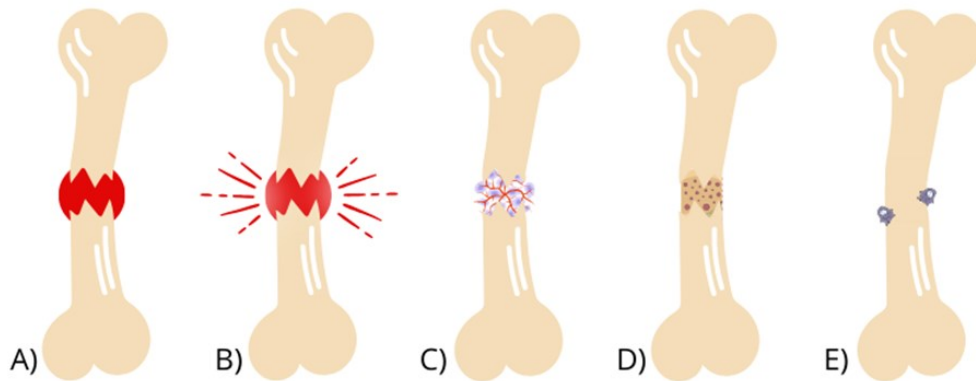
Figura 1 – Diferença morfológica entre osso compacto e osso esponjoso.



Fonte: Adaptada e modificada de Allen *et al.* (2021).

Quando ocorre uma fratura óssea (Figura 2), imediatamente é formado um hematoma, desencadeando um processo inflamatório. A inflamação é necessária para o processo de cicatrização, mas de maneira exacerbada acarreta na desaceleração do processo regenerativo. Posteriormente, ocorre o recrutamento de células tronco para o local do machucado e angiogêneses, seguida por uma fase de formação óssea. A nova matriz óssea será formada por uma combinação de ossificação endocondral, onde é formada a cartilagem antes de formar a matriz óssea, e ossificação intramembranosa, onde o processo de formação de cartilagem é omitido. A última etapa desse processo é a remodelação, já descrita anteriormente (Allen *et al.*, 2021).

Figura 2 – Processo de cicatrização de uma fratura óssea. A) Formação de um hematoma; B) Inflamação; C) Formação de novos vasos sanguíneos, recrutamento e proliferação de células tronco; D) Formação nova matriz óssea; E) Remodelação.



Fonte: Autoria própria.

3.2 BIOIMPRESSÃO

A impressão 3D é uma técnica de fabricação onde estruturas tridimensionais podem ser criadas de maneira controlada seguindo um modelo computacional previamente estabelecido. A bioimpressão 3D evoluiu a partir das técnicas de impressão 3D convencionais, modificando-se aparelhos comerciais para suportar o uso de células vivas e materiais biocompatíveis (Jusoh *et al.*, 2022).

Os métodos de bioimpressão podem ser divididos entre os que utilizam *scaffolds* (Figura 3) e os livres de *scaffold*. Um exemplo de bioimpressão livre de *scaffold* é o método desenvolvido por Ong *et al.* (2017), inspirado em *ikebana*, antiga arte japonesa que consiste em arranjar flores em matrizes de agulha. Nesse método, células são cultivadas e incubadas até a formação de esferoides. Após a maturação, uma bioimpressora adaptada usando sucção a vácuo arranja os esferoides em uma matriz de agulhas. O produto da bioimpressão ainda fixado na matriz é encubado por três dias e após esse período as agulhas são removidas. A distância que as agulhas possuem entre si é de suma importância para o resultando final. Agulhas muitos distantes irão resultar em tecidos com muitos espaços vazios, já agulhas muitos próximas irão resultar num tecido desnivelado com áreas de maior espessura.

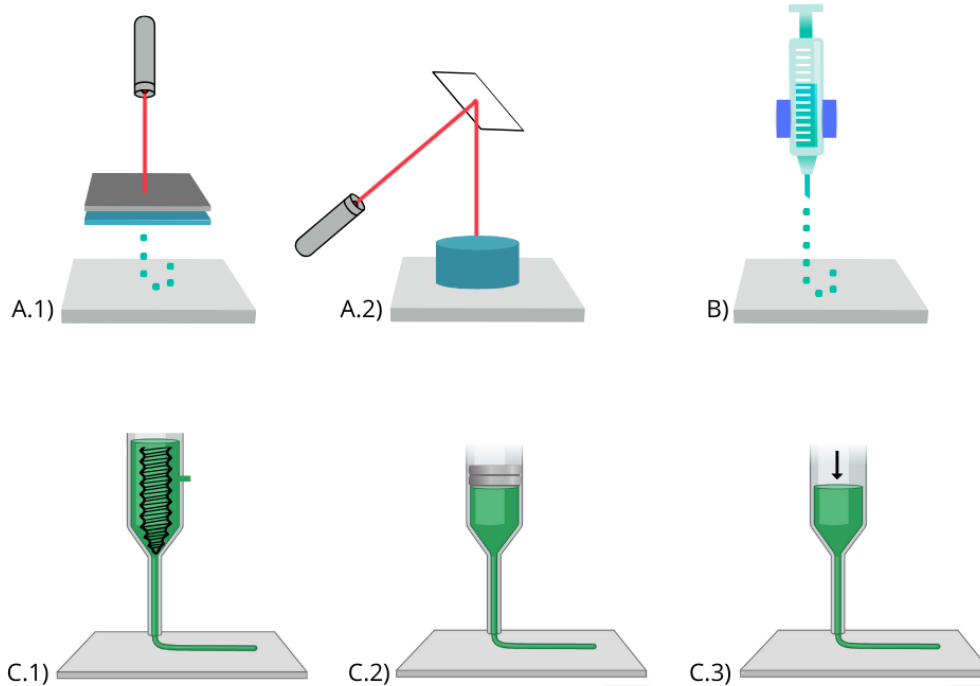
Os métodos que utilizam *scaffold* são mais comuns pois oferecem suporte ao crescimento celular (Kalhori *et al.*, 2022), apesar de terem a desvantagem de causar uma resposta inflamatória ao serem implantados e poder ocasionar a

formação de tecido fibroso (Ong *et al.*, 2017). Dentre as técnicas que utilizam *scaffold*, tem-se as técnicas baseadas no processamento de luz. Um exemplo é a impressão assistida por laser (Figura 3.A.1). Nessa técnica, um laser faz evaporar uma fina camada de metal no topo da biotinta, resultando na sua deposição de maneira controlada em um substrato que promove crescimento celular. Se estiver utilizando células, essa técnica tem como vantagem não causar estresse mecânico nas mesmas, pois não utiliza seringa (Ventura, 2021). Outra técnica de bioimpressão que utiliza luz é a estereolitografia (Figura 3.A.2), na qual uma fonte de luz interage com uma biotinta contendo uma resina fotossensível em sua composição (Elkhoury; Zuazola; Vijayavenkataraman, 2023). Este processo é altamente preciso, mas requer cuidados na escolha da fonte de luz e do fotoiniciador para não impactar negativamente as células (Jafari *et al.*, 2022)

Outra técnica de impressão, muito usada devido ao seu baixo custo, é a impressão a jato de tinta (figura 3.B). Esta utiliza forças elétricas, térmicas ou eletromagnéticas para transformar em gotículas a biotinta dentro de uma seringa. O movimento da seringa, onde-se encontra a biotinta, irá determinar a deposição das gotículas (Knowlton *et al.*, 2015).

Por último, tem-se a bioimpressão 3D por extrusão, que pode ser dividida em impressão por seringa ou por rosca. Na bioimpressão por rosca (Figura 3.C.1), um compartimento contendo uma rosca é acoplado a um dispensador mecânico automático que se move nas três dimensões. À medida que a rosca se movimenta, os grânulos são extrusados formando um *scaffold*. Já na impressão por seringa, uma seringa é acoplada ao dispensador mecânico, e no interior da seringa está um material semissólido que pode ser extrusado mecanicamente (Figura 3.C.2) ou pneumaticamente (Figura 3.C.3) (Gleadal *et al.*, 2018).

Figura 3 – Representação dos métodos mais comuns de bioimpressão para obtenção de *scaffolds*. A) Técnicas para fabricação baseada no processamento de luz: A.1) Bioimpressão assistida por laser e A.2) Estereolitografia. B) Impressão a jato de tinta, onde acoplado na seringa tem-se um atuador que pode formar as gotículas por forças elétricas, térmicas ou eletromagnéticas. C) Métodos de bioimpressão por extrusão: C.1) Bioimpressão por rosca, onde grânulos são extrusados de um recipiente de acordo com o movimento de uma rosca; C.2) Mecânica, onde um material semissólido é extraído de uma seringa utilizando força mecânica; C.3) Pneumática, onde o material é extrusado por uma seringa utilizando ar comprimido.



Fonte: Autoria própria.

A bioimpressão por extrusão é uma técnica bastante popular devido ao seu relativo baixo custo, facilidade de escalonamento e capacidade de produzir *scaffolds* de maneira personalizada. Uma desvantagem desse método é que a tensão de cisalhamento pode prejudicar a viabilidade celular caso seja feito o uso de células (Jafari *et al.*, 2022). Portanto, idealmente, a biotinta deve possuir um comportamento tixotrópico, onde a viscosidade irá diminuir com pressão (Taniguchi *et al.*, 2022). Ela também precisa ter uma viscosidade adequada para manter a sua forma após a impressão. Idealmente, após a formação, o *scaffold* passa por um processo de reticulação para melhorar sua estabilidade e as suas propriedades mecânicas (Jafari *et al.*, 2022; Kalhori *et al.*, 2022).

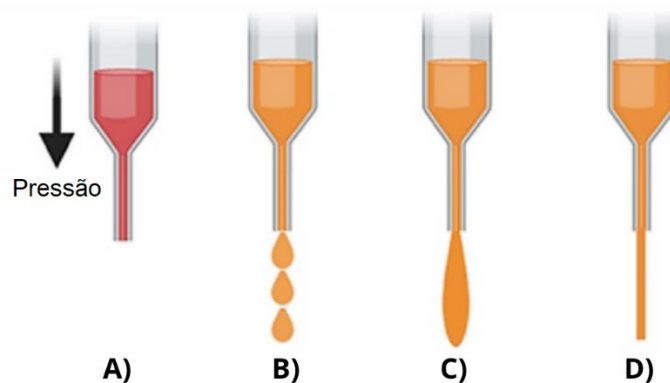
3.2.1 Printabilidade

Para analisar a adequabilidade de uma biotinta se faz uso do conceito de printabilidade (do inglês *printability*, relacionado à capacidade de impressão), apesar da definição não ser homogênea na literatura. Geralmente, está correlacionada com a habilidade da tinta de formar *scaffolds* fidedignos ao modelo computacional, ou formar *scaffolds* com propriedades aceitáveis para o propósito desejado (Schwab *et al.*, 2020; Tian; Zhao; Lewinski, 2021).

Um dos fatores que mais influenciam na printabilidade durante a bioimpressão por extrusão são as propriedades reológicas da biotinta. Dentre essas propriedades está a viscosidade, que representa a resistência de um fluido ao escoamento. Nas biotintas, a viscosidade se dá principalmente pela influência da massa molar e concentração dos materiais utilizados (Schwab *et al.*, 2020).

Fluidos altamente viscosos necessitam de uma maior pressão para escoarem da seringa, e quando a pressão necessária excede a capacidade da impressora, o material é considerado não extrudável (Figura 4.A). Já quando a viscosidade é tão baixa que o material escorre pela seringa (Figura 4.C), é considerado não printável (Tian; Zhao; Lewinski, 2021). O comportamento de fluxo da tinta e a tensão superficial inapropriada podem resultar na extrusão de gotas (Figura 4.B), ao invés do fluxo contínuo desejado (Figura 4.D) (Fu *et al.*, 2021).

Figura 4 – Extrudabilidade filamentar: A) Fluido altamente viscoso, não consegue fluir para fora da seringa; B) Fluido flui em forma de gotas, biotinta inapropriada devido ao seu comportamento de fluxo; C) Biotinta com baixa viscosidade, flui de maneira excessiva; D) Fluxo ideal



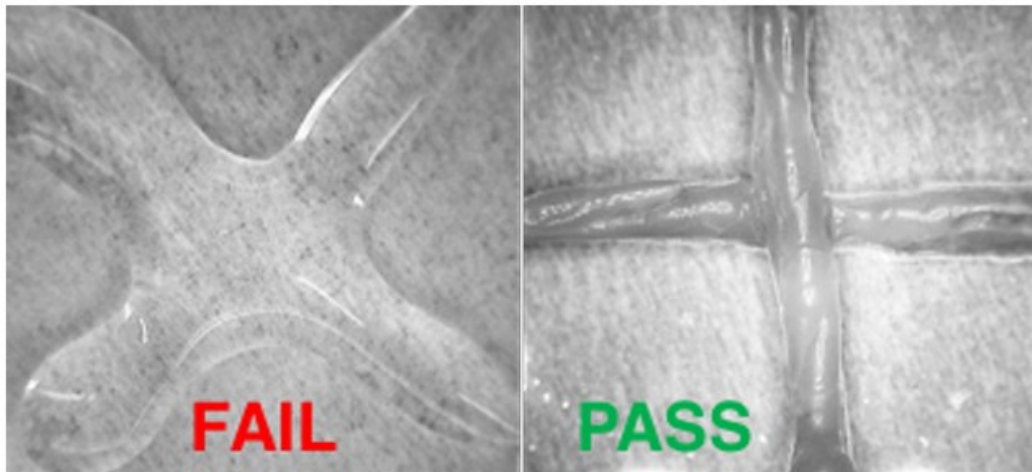
Fonte: Adaptado de Fu *et al.* (2021).

Biotintas mais viscosas geralmente apresentam uma maior fidelidade, ou seja, são mais fidedignas ao modelo computacional criado. Porém, caso possuam células na sua composição, o aumento da pressão de extrusão pode afetar a viabilidade celular. É necessário levar em consideração que ao medir a viscosidade de uma biotinta com a intenção de colocar células na sua composição, é necessário medir a viscosidade da mesma com as células já inseridas, pois as células afetam esta propriedade (Schwab *et al.*, 2020).

A tinta ideal deve apresentar uma relação não linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, classificando-a como um fluido não Newtoniano. Neste caso, é esperado que com o aumento da tensão exercida pela seringa ocorra uma diminuição da viscosidade, assim facilitando a extrusão da tinta e recuperando a sua viscosidade subseqüentemente. Materiais que possuem essa propriedade são classificados como pseudoplásticos. Caso estejam presentes células na sua composição, a diminuição da viscosidade aumentará a viabilidade celular (Schwab *et al.*, 2020).

Outra propriedade reológica importante é o limite de escoamento, definido como a tensão mínima necessária para a tinta fluir. Altos valores de tensão limite de escoamento são preferíveis pois implicam numa maior resistência às forças gravitacionais, impedindo o colapso e fusão dos filamentos (Figura 5) (Schwab *et al.*, 2020).

Figura 5 – Imagem demonstrando fusão filamental após a impressão de duas camadas. Na imagem escrita *fail*, os filamentos fundiram-se entre si, tornando a solução imprópria para a impressão. Na imagem escrita *pass*, houve pouca fusão filamental, sendo provavelmente possível imprimir diversas camadas.



Fonte: Adaptada de O'Connell *et al.* (2020)

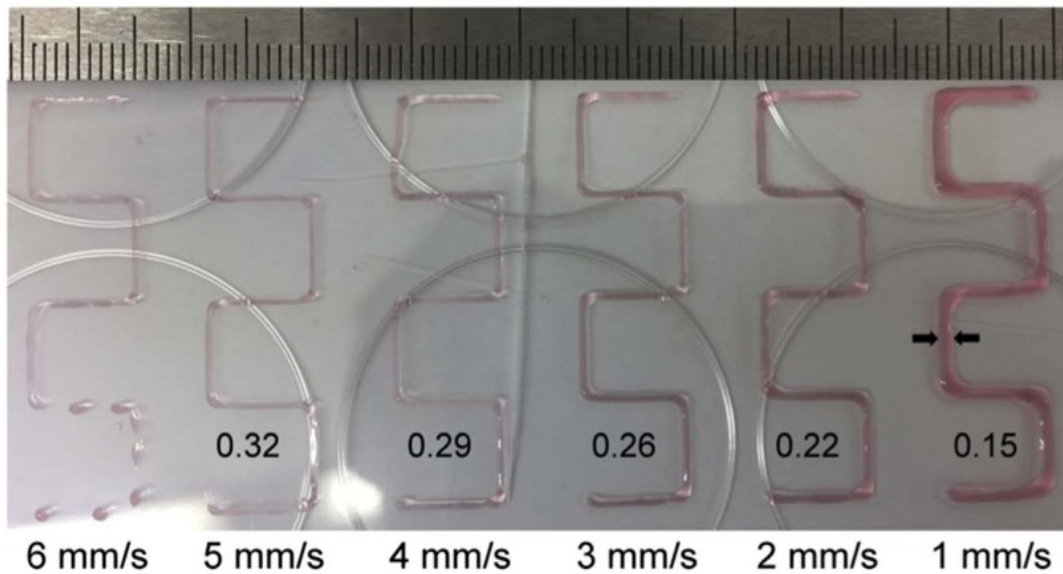
3.2.1.1 Filamentos impressos

A primeira camada impressa é o que vai dar a base estrutural para o *scaffold*, por isso é essencial estudar o filamento que a compõe. A pressão de extrusão necessita ser constante, pois variações na força se traduzem em imperfeições nos filamentos (Schwab *et al.*, 2020). A pressão também precisa se adequar à tinta utilizada. Uma pressão muito baixa não irá formar um filamento, e sim irá extrusar gotas de maneira inconsistente. Consequentemente, uma pressão muito grande pode ocasionar extrusão em excesso do material, gerando acúmulo (Sánchez-Sánchez *et al.*, 2023).

A superfície do filamento impresso tem uma influência muito grande nas suas características. Uma superfície plana possibilita que o filamento seja depositado de maneira homogênea. Uma superfície com muitas imperfeições pode gerar perda da continuidade do filamento. Outro fator a se considerar é a hidrofobicidade da superfície. Superfícies hidrofílicas levam a um maior espalhamento do filamento, aumentando seu diâmetro. Inversamente, superfícies hidrofóbicas resultam em menos espalhamento e menor diâmetro (Tian; Zhao; Lewinski, 2021).

A velocidade em que o filamento é depositado também influencia na sua integridade. Velocidades muito lentas podem causar acúmulo e depósito da tinta, resultando em filamentos irregulares (Figura 6). Ao contrário, velocidades muito altas resultam em falhas nos filamentos ou na diminuição do seu diâmetro. O efeito que velocidades altas possuem no diâmetro do filamento é mais pronunciado em pressões maiores (Webb; Doyle, 2017), sendo que o diâmetro ideal do filamento após a sua deposição deve ser semelhante ao diâmetro da ponteira utilizada. Em alguns casos, quando se requer um maior controle da resolução dos *scaffolds*, pode-se desejar o encolhimento do filamento após a sua deposição (Tian; Zhao; Lewinski, 2021).

Figura 6 – Efeito de diferentes velocidades de impressão em filamentos de alginato e gelatina coloridos artificialmente.



Fonte: Webb e Doyle (2017).

3.3 MATERIAIS PARA BIOIMPRESSÃO

Os materiais utilizados no processo de bioimpressão por extrusão podem ser divididos entre os de origem natural e sintética. Os materiais sintéticos, devido às condições controladas em que são produzidos, possuem uma alta homogeneidade no resultado final, facilitando a reprodutibilidade de resultados. Outra vantagem é que muitas vezes é possível ajustar as suas propriedades moleculares e químicas para obter propriedades desejadas. Como desvantagem, geralmente possuem baixa afinidade celular (Jafari *et al.*, 2022; Kalhori *et al.*, 2022).

Os polímeros sintéticos podem ser classificados em hidrofóbicos e hidrofílicos. Dentre os polímeros hidrofóbicos está o poli(ácido láctico) (PLA) e policaprolactona (PCL). Ambos possuem excelentes características mecânicas. Na categoria polímeros hidrofílicos, estão o poli(ácido glicólico) (PGA), um polímero biodegradável não solúvel em água, e o polietilenoglicol (PEG), um polímero biodegradável, solúvel em água e não tóxico. Como desvantagens, o PEG possui a baixa interação celular e propriedades mecânicas inadequadas, não sendo possível a formação de um hidrogel independentemente (Jafari *et al.*, 2022).

Polímeros de origem natural são mais comumente utilizados na bioimpressão devido a sua biocompatibilidade natural e bioatividade, mas

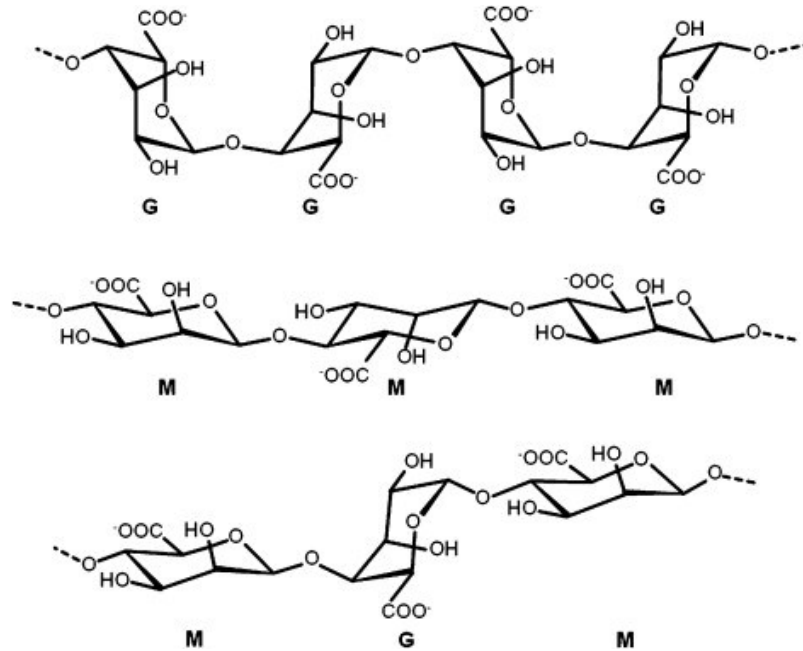
geralmente possuem propriedades mecânicas inadequadas (Jafari *et al.*, 2022). Nessa categoria está o colágeno, um dos componentes principais da matriz extracelular, que fornece resistência mecânica, auxilia na organização estrutural e contribui para a proliferação celular. Após o processo de bioimpressão, o colágeno pode ser reticulado por meio de mudanças no pH, temperatura ou reações químicas. Fatores que limitam a sua ampla utilização são o alto custo e rápida degradação (Kalhori *et al.*, 2022; Lee, Jung Bok *et al.*, 2016).

Outro polímero natural bastante utilizado é a gelatina, um polímero natural de baixo custo e altamente biocompatível. Na sua forma natural, possui propriedades reológicas inadequadas, por isso geralmente é utilizada como parte de uma blenda polimérica ou modificada quimicamente na forma de gelatina metacrilato (GelMA) (Kalhori *et al.*, 2022). Outros polímeros naturais também encontrados na produção de *scaffolds* são o alginato e o amido, descritos a seguir.

3.3.1 Alginato

O alginato (Figura 7) é um polímero natural aniônico formado por monômeros de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-glucurônico (G). Os resíduos destes monômeros podem formar blocos arranjando-se de maneira consecutiva (GGGGGG) e (MMMMMM) ou alternada (GMGMGM) (Lee; Mooney, 2012). Comumente, o alginato é obtido por meio de algas da classe *Phaeophyceae*, também conhecidas como algas marrons, não havendo conhecimento de outros tecidos vegetais em que essa substância esteja presente. A alga gigante *Macrocystis pyrifera* é a principal fonte de extração mundialmente. Também é possível a sua síntese por meio de bactérias, onde estará presente em sua matriz extracelular (Garcia-cruz; Foggetti, 2008). Devido às diferentes fontes que o alginato pode ser obtido, existe uma grande variação entre os materiais sendo comercializados. Estima-se que mais de 200 tipos são comercializados atualmente. As variações se dão devido às diferentes proporções dos resíduos M e G e do tamanho dos blocos (Lee; Mooney, 2012).

Figura 7 – Estrutura química do alginato, com blocos arranjados de maneira consecutiva e alternada.



Fonte: Lee e Money (2012).

O alginato é um material amplamente utilizado no processo de bioimpressão pela sua acessibilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Apesar disso, *scaffolds* de alginato geralmente possuem baixa printabilidade e propriedades mecânicas inadequadas (Murab *et al.*, 2022). Outro fator que atrapalha o uso de alginato na produção de *scaffolds* é a fraca adesão celular devido à falta de ligantes específicos que interagem com as células mamíferas, impactando negativamente a proliferação celular (Lee; Mooney, 2012).

Caso a biotinta à base de alginato não possua propriedades reológicas adequadas, é possível passar por um processo de pré-reticulação, onde íons de cálcio são adicionados durante o seu preparo. Esse processo pode afetar negativamente a fidelidade de forma dos *scaffolds* impresso, pois a rápida gelatinização do processo pode formar uma tinta não homogênea (Murab *et al.*, 2022).

Caso a biotinta composta por alginato tenha dificuldade em manter a sua forma, também é possível a sua impressão diretamente numa solução reticulante. Outra opção é a impressão em um banho de suporte, por exemplo, um banho contendo microesferas que ajudam a biotinta a manter a forma enquanto o alginato passa pelo processo de reticulação (Murab *et al.*, 2022).

Uma das maneiras mais comuns de melhorar as propriedades do alginato é por meio da mistura com outros materiais. Os polímeros de origem natural têm a vantagem de serem biocompatíveis e produzidos a partir de fontes renováveis (Jovic *et al.*, 2019). Porém, geralmente possuem estabilidade mecânica inadequada, o que torna difícil a obtenção de um *scaffold* com propriedades necessárias para ser utilizado na regeneração óssea. O mais comumente encontrado são blendas voltadas para a regeneração de tecidos moles (Jafari *et al.*, 2022; Kalhori *et al.*, 2022).

Datta *et al.* (2018) fabricaram *scaffolds* de alginato/mel por meio de bioimpressão por extrusão voltados para regeneração de feridas. O mel foi escolhido pelas suas propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias. Nagahara *et al.* (2022) conseguiram produzir *scaffolds* não tóxicos com multicamadas de alginato com goma xantana reticulados com cloreto de estrôncio. As propriedades mecânicas dos *scaffolds* obtidos se demonstraram próprias para aplicações em tecidos moles.

Os polímeros de origem sintética permitem um maior ajuste nas suas propriedades moleculares, químicas e mecânicas, além de possuírem uma maior homogeneidade (Jafari *et al.*, 2022; Kalhori *et al.*, 2022). O poli(álcool vinílico) (PVA), por exemplo, é um polímero de origem sintética com estabilidade mecânica suficiente para ser utilizado na engenharia tecidual óssea. Sangkert *et al.* (2021) produziram *scaffolds* bioimpressos promissores para aplicação em regeneração óssea de alginato/PVA/fibroína de seda (SF).

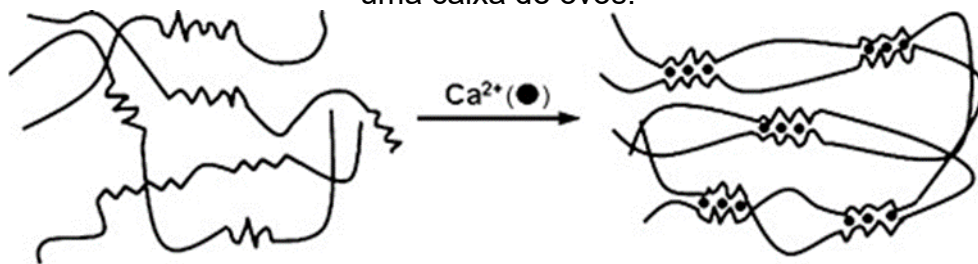
3.3.1.1 Reticulação do alginato

Ao entrar em contato com íons bivalentes ou trivalentes, o alginato passa por um processo de reticulação (Massana *et al.*, 2022). Esse processo aumenta a resistência mecânica do *scaffold*, permitindo que este seja manipulado sem perder o seu formato após o processo de bioimpressão (Malektaj; Drozdov; Christiansen, 2023). Íons bivalentes alcalinos terrosos como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Sr^{2+} ligam-se ao alginato por meio de ligações iônicas (Brus *et al.*, 2017), sendo o CaCl_2 o reagente mais comumente usado na engenharia tecidual devido a sua alta solubilidade em água, o que leva a um processo de reticulação rápido (Freeman; Kelly, 2017).

O processo de reticulação do CaCl_2 pode ser exemplificado pelo modelo “caixa de ovos” (Figura 8) (Lee; Yuk, 2007), onde as frações GG e MG interagem

com os íons de cálcio formando uma estrutura coordenada (Malektaj; Drozdov; Christiansen, 2023). O tamanho relativamente grande dos íons de Ca^{2+} faz com que os mesmos ocupem uma quantia considerável do volume livre da estrutura, fazendo com que as frações G se organizem de maneira uniforme (Brus *et al.*, 2017).

Figura 8 – Representação do processo de reticulação iônica do alginato, onde as cadeias poliméricas reagem com íons de cálcio formando uma estrutura que lembra uma caixa de ovos.



Fonte: Lee e Yuk (2007).

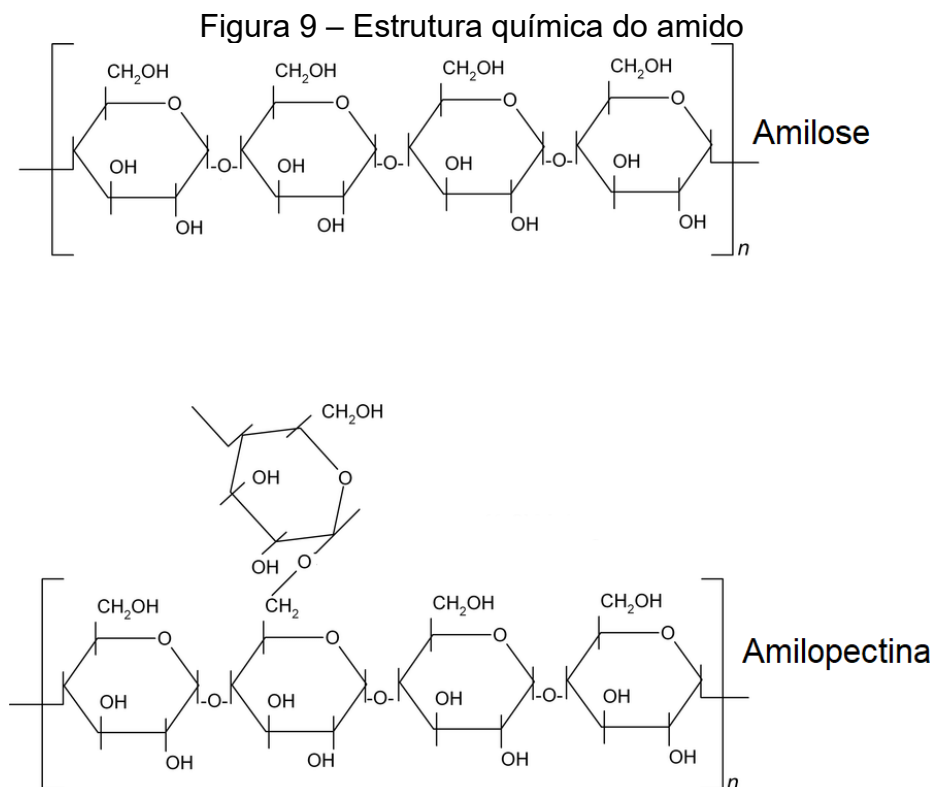
Íons bivalentes de metais de transição como Zn^{2+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} e íons trivalentes de metais catiônicos como Fe^{3+} , Al^{3+} e Cr^{3+} formam ligações complexas com o alginato, com os íons trivalentes possuindo ligações mais fortes (Brus *et al.*, 2017). Nos últimos anos, vem ocorrendo um aumento nas publicações explorando Fe^{3+} e os efeitos que seu mecanismo diferente de ligação tem nos *scaffolds* de alginato (Massana *et al.*, 2022).

Ao contrário do CaCl_2 , que possui um modelo de reticulação amplamente aceito na literatura, ainda não existe um modelo consensual que explique os mecanismos de reticulação de Fe^{3+} (Massana *et al.*, 2022). Porém, há um consenso que o Fe^{3+} possui uma maior afinidade com alginato do que a maioria dos outros íons bivalentes e trivalentes. Também, sabe-se que tem afinidade com resíduos GG, MM e MG do alginato, o que pode resultar em melhores propriedades mecânicas do *scaffold* (Malektaj; Drozdov; Christiansen, 2023; Massana *et al.*, 2022).

Os diferentes mecanismos de ligação entre Ca^{2+} e Fe^{3+} se traduzem em diferentes propriedades ao *scaffolds*. Os íons Ca^{2+} se ligam ao alginato de uma maneira bidimensional plana, resultando em uma superfície mais homogênea. Já os íons Fe^{3+} possuem mais sítios de ligação formando uma estrutura tridimensional de ligação, resultando em uma maior porosidade superficial. A alta densidade de Fe^{3+} também se traduz em uma superfície mais rígida, com uma resistência à compressão superior ao Ca^{2+} , mas muito mais frágil (Massana *et al.*, 2022).

3.3.2 Amido

O amido (Figura 9) é um polímero derivado de plantas, acessível, atóxico e biocompatível (Roslan *et al.*, 2016). Na sua forma nativa é facilmente degradável por uma grande variedade de microrganismos e enzimas. A sua composição se dá por proporções variadas de polissacarídeos lineares ligados a α -(1 \rightarrow 4)-D-glicopirranose com uma baixa taxa de ramificação, chamados amilose, e polissacarídeos ligados a α -(1 \rightarrow 4) com 4% – 5,5% de ramificações em α -(1 \rightarrow 6) chamados amilopectina (Ahmed, 2012). Geralmente a amilopectina é o componente majoritário, estando presente numa proporção de 2/3 para 1/3 de amilose (Robyt, 2008). Os dois juntos constituem 98% – 99% de sua massa seca, o restante podendo ser composto por lipídios, proteínas, minerais, pequenos polímeros ou grupos éster de fosfato (Ahmed, 2012).



Fonte: Adaptado de Visakh *et al.* (2012).

O amido encontra-se na forma de grânulos semicristalinos, compactados e com tamanho variando de 1 μm a 150 μm , dependendo da sua origem botânica

(Ahmed, 2012; Robyt, 2008). Os grânulos de amido possuem uma estrutura interna muito organizada, consistindo em anéis semicristalinos alternados com anéis amorfos. As regiões semicristalinas são compostas de amilopectina organizada por lamelas periódicas cristalinas e amorfas. Já a região amorfa é composta principalmente por amilose e contém amilopectina desordenada. Geralmente a parte cristalina constitui de 15% a 45% de sua massa seca (Robyt, 2008).

3.3.2.1 Solubilização do amido

Os grânulos de amido são altamente hidrofílicos devido às hidroxilas livres presentes. Por isso, ao serem inseridos em água, absorvem a umidade mas mantem a sua forma devido à presença de ligações de hidrogênio e cristalinidade. Ao serem aquecidos em água, a região amorfa do amido irá inchar de maneira que desestabilize a região cristalina (Ahmed, 2012). Este processo inicia-se no centro do grânulo e estende-se rapidamente à periferia (Denardin; Silva 2009), sendo denominado gelatinização. Muito da estrutura interna do grânulo é perdida nesse processo e macromoléculas de amilose são lixiviadas para fora do grânulo. Algumas moléculas de amilopectina permanecerão intactas, mantendo a estrutura dos grãos.

A gelatinização é um processo irreversível que ocorre em temperaturas entre 60 °C e 70 °C no amido puro. A temperatura de gelatinização é uma reflexão direta da estrutura cristalina do grânulo (Ahmed, 2012). Geralmente, amidos com uma maior porcentagem de amilopectina apresentam maior grau de cristalinidade e possuem uma maior temperatura de gelatinização (Denardin; Silva, 2009).

Eventualmente, toda a amilose é filtrada para fora dos grãos, restando apenas amilopectina. A água continua adentrando os grânulos, aumentando a viscosidade da solução. Os grãos chegam ao seu diâmetro máximo e rompem-se, diminuindo a viscosidade da solução (Ahmed, 2012). Ao resfriar a solução, a amilose presente se reestrutura e passa por um processo rápido de cristalização, chamado de retrogradação (Ahmed *et al.*, 2012). Durante a retrogradação, a viscosidade do gel aumenta rapidamente e o gel se torna mais opaco (Denardin; Silva, 2009). Em contrapartida, o processo de recristalização da amilopectina é lento, podendo se estender por semanas (Ahmed, 2012).

3.3.2.2 *Uso de amido na bioimpressão*

O processo de gelatinização e retrogradação do amido resulta num gel pseudoplástico com propriedades mecânicas adequadas para serem utilizadas na bioimpressão 3D. No entanto, geralmente tintas formadas apenas com amido não conseguem formar estruturas complexas, sendo necessário passarem por um tratamento químico ou físico. Exemplo de possíveis tratamentos utilizados são ondas eletromagnéticas de alta frequência, tratamento de calor a seco, pulsos elétricos ou oxidação por reagentes químicos. Outra maneira de melhorar as propriedades reológicas da tinta é por meio de aditivos, como azeite de oliva, alginato, proteína de ervilha, goma xantana, cloreto de cálcio, entre outros (Robyt, 2008).

A amilose e a amilopectina possuem massas molares distintas, com a amilose possuindo uma massa molar menor (Robyt, 2008). Consequentemente, *scaffolds* produzidos com amido com diferentes proporções de amilose possuem propriedades ligeiramente diferentes. *Scaffolds* impressos com tintas produzidas com amido com alta porcentagem de amilose possuem mais fidelidade de forma e melhor força mecânica do que os com alta porcentagem de amilopectina.

Outro fator que influencia na produção de *scaffolds* é o comprimento das cadeias de amilopectina e o tamanho dos grânulos. Cadeias mais longas estão positivamente correlacionadas com o aumento da dureza do produto. Já grânulos maiores proporcionam mais elasticidade à tinta, enquanto grânulos menores resultam em *scaffolds* com maior estabilidade (Rong *et al.*, 2023).

O uso do amido na engenharia tecidual não é recente. Salgado *et al.* (2004) fabricaram *scaffolds* de amido de milho/etileno-álcool vinílico utilizando uma extrusora e um agente de expansão sólido. Os *scaffolds* resultantes se mostraram não tóxicos e permitiram a proliferação de células semelhantes ao osteoblasto humano. Testes *in vitro* também indicaram que a matriz extracelular óssea estava sendo depositada. Mais recentemente, Koski e Bosi (2019) fabricaram *scaffolds* de hidroxiapatita e amido por impressão 3D voltados para a regeneração óssea.

Asl *et al.* (2022) fabricaram *scaffolds* de polihidroxibutirato/amido com nanotubos de carbono pela técnica de *electrospinning*. A presença dos nanotubos aumentou a resistência à tração das fibras e tornou o processo de biodegradação mais estável. García *et al.* (2024) também usaram a técnica de *electrospinning* para fabricar *scaffolds* de policaprolactona/amido com nanopartículas de óxido de cálcio.

A adição do amido e das nanopartículas aumentaram a hidrofiliabilidade e a taxa de degradação do *scaffold*.

3.3.3 Bentonita

A bentonita é uma argila abundante, com boas propriedades para a aplicação em polímeros, incluindo elevada razão de aspecto e alto grau de delaminação (Silva; Ferreira, 2008). A bentonita é composta majoritariamente por montmorilonita (Mt), um argilomineral pertencente à família dos filossilicatos 2:1 com estrutura química $M_x(Al_{4-x}Mg_x)Si_8O_{20}(OH)_4$, onde M é o cátion monovalente e x o grau de substituição isomórfica (entre 0,5 e 1,3) (Jayrajsinh *et al.*, 2017, Alexandre;Dubois, 2000). Suas lamelas são constituídas por uma folha central octaédrica de alumina comprimida entre duas folhas tetraédricas de sílica (Park *et al.*, 2016). A organização estrutural das camadas pode ser comparada com a de um sanduíche, com as nanofolhas intercaladas fortemente ligadas entre si por forças intermoleculares (forças de Van der Waals, ligações eletrostáticas) (Li *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2018).

Suas camadas possuem aproximadamente 1 nm de espessura (Li *et al.*, 2022) com 0,9 – 1,2 nm de espaçamento interlamelar entre elas (Lee *et al.*, 2005). Junto com as moléculas de água que se encontram neste espaço interlamelar estão contidos íons de sódio e cálcio em diferentes proporções. Quanto maior a quantidade de sódio, maior a expansão das camadas quando inserido em água (Jayrajsinh *et al.*, 2017).

A bentonita (Park *et al.*, 2016) é liberada pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA) para uso em diversos produtos medicinais, com rotas de administração oral, tópica, transdérmica e vaginal aprovadas. Porém, a Mt não possui nenhuma aprovação atualmente para uso medicinal (Jayrajsinh *et al.*, 2017), apesar de ser aprovada pela FDA como um ingrediente inerte para ser utilizado na formulação de pesticidas aplicados a animais (eCFR :: 40 CFR 180.930 - *Inert ingredients applied to animals; exemptions from the requirement of a tolerance.*).

A suplementação de Mt em ratos demonstrou tornar os ossos mais resistentes à fratura (Kim *et al.*, 2020), apesar de poder diminuir os níveis de cálcio, cloro e sódio no sangue (Lee *et al.*, 2005). É um componente considerado não agudamente tóxico em doses menores que 1000 mg/kg *in vivo* (Baek; Lee; Choi, 2012).

A administração de Mt por via intravenosa é considerada não tóxica, mas diminui os níveis de potássio no sangue de maneira significativa. Testes *in vitro* demonstraram a não toxicidade desse argilomineral contra o fungo *S. cerevisiae* (Lee, Yuan Haun *et al.*, 2005). Testes realizados em células do intestino humano demonstraram uma baixa capacidade da Mt de causar danos à membrana extracelular. No entanto, a Mt pode gerar a produção de stress oxidativo, interferindo na proliferação celular (Baek; Lee; Choi, 2012).

Em testes *in vitro*, a Mt demonstrou aumentar a expressão de marcadores osteogênicos (RUNX2, osteocalcin, BMP-2, COL-1, Wnt3a e p-SMAD 1/5/8), simultaneamente suprimindo marcadores osteoclastogênese. Isto indica um possível uso terapêutico para suprimir a reabsorção óssea em pacientes com osteoporoses (Kim *et al.*, 2020). Olad *et al.* (2019) criaram *scaffolds* de gelatina/quitosana com nanofolhas de óxido de grafeno com Mt por liofilização. Os *scaffolds* resultantes proporcionaram um ambiente propício ao crescimento celular de osteoblastos.

Habib e Khoda (2019) conseguiram fabricar *scaffolds* com 90 camadas e 18 mm de diâmetro utilizando uma porcentagem de 4% de alginato, 3% de carboximetilcelulose e 4% de Mt. Foi possível também a impressão de estruturas tubulares com 20 mm de comprimento. Os *scaffolds* se demonstraram citocompatíveis.

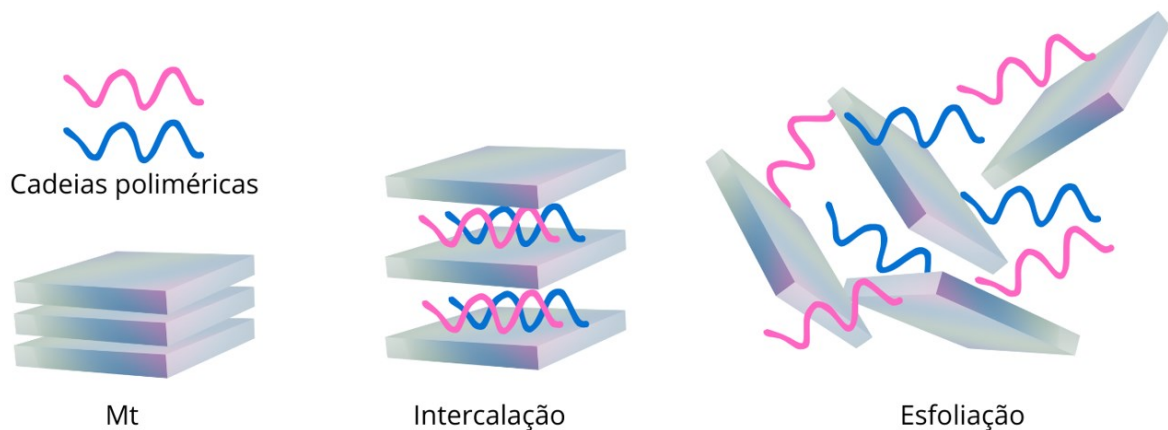
A carga superficial da Mt é ligeiramente negativa, o que facilita a adsorção de fármacos catiônicos entre as suas camadas por interações eletrostáticas, podendo ser usada para a liberação controlada de fármacos (Park *et al.*, 2016). Ao serem adsorvidos, fármacos solúveis em água apresentam uma diminuição no seu tempo de liberação e biodisponibilidade. Já o oposto geralmente ocorre em fármacos hidrofóbicos, onde sua taxa de liberação é aumentada devido a sua maior dissolução, conseqüentemente aumentando a sua biodisponibilidade (Park *et al.*, 2016).

A Mt é muito usada como carga em polímeros para melhorar as suas propriedades mecânicas. O reforço por Mt pode ser feito de duas maneiras (

Figura 10). As moléculas poliméricas podem estar intercaladas entre camadas expandidas de Mt, restringindo o seu movimento e obtendo-se um intertravamento entre a Mt e a matriz. Outra maneira de melhorar as propriedades mecânicas é por meio da esfoliação, onde as lamelas interligadas irão se separar. As nanofolhas resultantes possuem uma grande área superficial específica,

promovendo um maior contato entre polímero e matriz e aumentando de forma mais significativa as propriedades mecânicas. Esse método também permite uma maior resistência a fraturas, já que as mesmas podem mudar de trajetória mais facilmente (Li *et al.*, 2022).

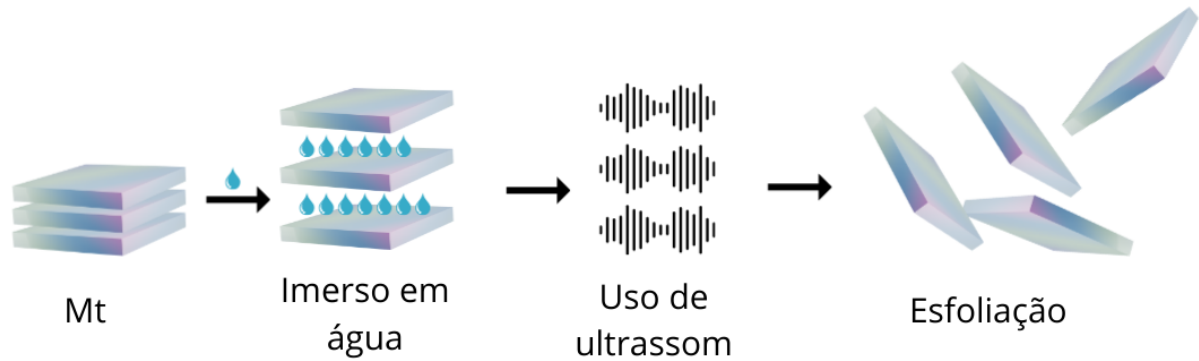
Figura 10 – Demonstração das duas maneiras que a Mt pode melhorar as propriedades mecânicas de um material: por meio da intercalação das cadeias poliméricas ou pela esfoliação.



Fonte: Autoria própria.

Para que o processo de esfoliação ocorra, é necessária a ruptura das forças intermoleculares que estabilizam as lamelas. Por ser extremamente hidrofílica, ao ser imersa em água, a Mt irá adsorver estas moléculas, expandindo-se. Essa expansão permite que as camadas se desprendam ao serem submetidas a um processo de sonicação (Figura 11). Para o processo de esfoliação ocorrer em solventes não polares é necessário aplicar tratamentos superficiais, de maneira que a Mt se torne hidrofóbica. Apesar da esfoliação geralmente ocorrer com a utilização de solventes, é possível ocorrer sem o acréscimo de um meio líquido. Um exemplo seria a moagem em moinho de bolas, um método que utiliza da força de impacto e fricção para desestabilizar as ligações intermoleculares. É um método pouco utilizado devido ao grande risco de contaminação e fragmentação (Zhu *et al.*, 2019).

Figura 11 – Processo de esfoliação da Mt por meio do uso de ultrassom. A hidrofiliicidade da Mt fará com que ocorra a expansão das suas folhas ao serem submersas em água. Essa expansão possibilitará o desprendimento das folhas ao serem submetidas a ondas de ultrassom.



Fonte: Autoria própria.

Portanto, neste trabalho, busca-se combinar alginato, amido e bentonita, de modo a obter uma solução com viscosidade apropriada para a bioimpressão 3D, e conseqüentemente *scaffolds* com propriedades físico-químicas condizentes com a aplicação na regeneração óssea.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O amido solúvel, adquirido pela Dinâmica Química Contemporânea Ltda., possui um pH entre 5,0 – 7,0 numa solução de 2% (m/v) a 25 °C, com densidade igual a 1,63 g/cm³ (determinada por picnômetro a gás para densidade de sólidos em um equipamento Anton Paar Ultrapyc 5000), e teor de amilose igual a 23,5% ± 0,2% (determinado de acordo com ISO 6647-1, 2020). O alginato de sódio foi adquirido pela Inlab Confiança, lote RV133605, com densidade igual a 1,63 g/cm³ (determinada por picnômetro a gás Anton Paar Ultrapyc 5000). As nanopartículas de bentonita (Bent) na forma de pó e com densidade de 2,6 g/cm³ foram adquiridas da Bentonit União Nordeste Ind. e Com. Ltda (bentonita comercializada sob o código Argel T, composta predominantemente por Mt sódica não modificada). O cloreto de cálcio dihidratado foi adquirido da Sigma-Aldrich na forma de um pó branco.

4.2 PREPARAÇÃO DAS TINTAS

Para o preparo das tintas, foram elaboradas duas soluções distintas as quais foram posteriormente misturadas sob agitação mecânica. A primeira solução contendo amido (4% m/v) foi preparada diluindo-o em água destilada sob agitação mecânica em banho-maria até atingir uma temperatura de 80 °C. Após atingir a temperatura desejada, a solução foi mantida sob agitação mecânica até atingir a temperatura ambiente. O volume da solução foi mensurado e qualquer perda de água foi corrigida. Posteriormente, foi adicionado 8% m/v de alginato sob agitação mecânica até a sua dissolução.

A segunda solução contendo Bent foi preparada dispersando a argila em água destilada sob agitação magnética por 24 h, seguido de uma dispersão por 30 min em banho ultrassônico (Elma S40H) e 15 min em um dispersor Ultra-Turrax (IKA, T 18 DI com elemento de dispersão S 18 N) a 14000 rpm. Posteriormente, foi adicionado 8% m/v de alginato e o sistema foi mantido sob agitação mecânica até a sua dissolução. As concentrações finais obtidas ao misturar as soluções estão inseridas na Tabela 1. Após a escolha da porcentagem de Bent mais adequada para

a preparação das misturas, foram preparadas amostras sem a adição de Bent e sem a adição de amido, para fins comparativos.

Tabela 1 – Concentração percentual dos reagentes utilizados no preparo das soluções e nomenclatura utilizada.

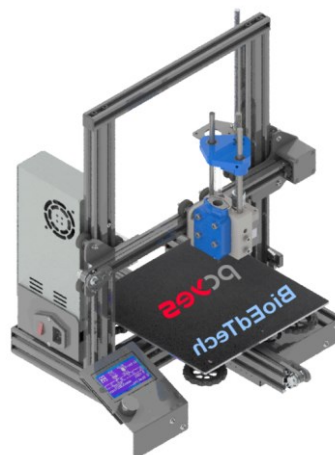
	Amido (%)	Alginato (%)	Bentonita (%)	Água (%)
Alg/Am/Bent1	2	8	1	89
Alg/Am/Bent2	2	8	2	88
Alg/Am/Bent3	2	8	3	87
Alg/Am/Bent4	2	8	4	86
Alg/Am	2	8	-	90
Alg/Bent4	-	8	4	88

Fonte: Autoria própria.

4.3 BIOIMPRESSÃO

Foram projetados modelos de *scaffolds* com 1, 2, 5, 10, 15 e 20 camadas com dimensões 1,3 cm x 1,3 cm. O software BioScaffolds V2.0 (Dávila *et al.*, 2022) foi usado para o design inicial dos *scaffolds* e o programa Notepad++ para ajustes no código fonte. Após a escolha da porcentagem final de Bent, a pressão de escoamento da tinta e a altura dos *scaffolds* foram ajustados no software visualmente. Para minimizar diferenças entre a altura inicial e final das camadas, o *scaffold* foi projetado para alternar seu início entre os 4 diferentes vértices. Os *scaffolds* foram impressos numa impressora Ender-pro-3 adaptada comercialmente para impressão de biotintas pela BioEdTech (Figura 12).

Figura 12 - Impressora Ender-pro-3 adaptada para impressão 3D de semissólidos.



Fonte: Adaptado do manual de usuário BioEdTech “Construa a sua bioimpressora”.

Após a impressão, os *scaffolds* passaram pelo processo de reticulação para melhorar as suas propriedades mecânicas e permitir seu manuseio. Imediatamente depois do processo de reticulação (detalhado no item 4.5), os *scaffolds* foram congelados por 48 h e liofilizados (Terroni Fauvel LT 1000/8).

4.4 ESCOLHA DO TEOR DE BENT

4.4.1 Análise de viscosidade

As soluções foram testadas qualitativamente quanto à viscosidade propícia para bioimpressão seguindo metodologia proposta por Taniguchi *et al.* (2022). Para tal, o tubo contendo a solução foi invertido e o comportamento das soluções quanto ao escoamento foi monitorado nos tempos de 0, 5, 10 e 20 min. As soluções que não escoaram neste período foram consideradas propícias para impressão.

4.4.2 Análise da morfologia dos filamentos

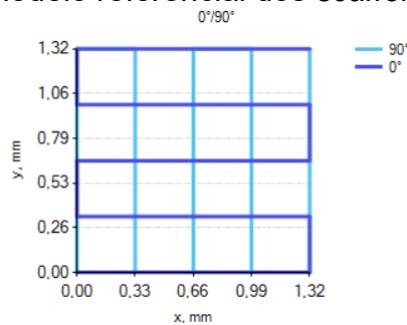
Inicialmente, foram impressos *scaffolds* com uma camada e, imediatamente após a impressão, foram obtidas imagens por meio de um microscópio óptico (MO) digital Zeiss (AxioLab.A1) com ampliação de 500x. A largura da primeira camada de filamentos impressos foi analisada pelo software ImageJ para determinar a influência que a porcentagem de Bent possui na largura e espalhamento. Foram impressas cinco amostras para cada porcentagem de Bent e retiradas no mínimo 65 medidas por amostra, sendo a média aritmética de cada porcentagem de Bent calculada.

Os cálculos de média e desvio padrão foram feitos utilizando Microsoft Excel e os gráficos plotados utilizando o software Origin 2025b. Para calcular o espalhamento, foi utilizada a Equação 1 (Bom *et al.*, 2020). A média de cada amostra foi utilizada para calcular individualmente o espalhamento e depois foi feita a média para calcular o espalhamento referente a cada formulação. A ponteira utilizada no processo de impressão foi 23g cônica, com um diâmetro interno de 340 µm.

$$\text{Espalhamento} = \frac{\text{Diâmetro do filamento}}{\text{Diâmetro interno da ponteira}} \quad (1)$$

Posteriormente, foram impressos *scaffolds* com 2, 5, 10, 15 e 20 camadas e analisados qualitativamente em relação ao modelo computacional formulado (Figura 13). Fatores como semelhança visual entre o modelo computacional e o *scaffold* e oclusão dos poros foram levados em consideração ao escolher a porcentagem de Bent mais adequada.

Figura 13 – Modelo referencial dos *scaffolds* impressos.



Fonte: Imagem modelada no software BioScaffolds V2.0.

4.5 ANÁLISE DE DIFERENTES RETICULANTES E TEMPO DE RETICULAÇÃO

Para reticular os *scaffolds*, foi preparada uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 5% m/v em água destilada. Após o processo de bioimpressão, os *scaffolds* foram imersos nessa solução e subsequentemente imersos em água destilada por um breve momento para remover resquícios do reagente utilizado. Diversos ensaios foram realizados para determinar o tempo ideal de imersão no reticulante (0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 6 h; 12 h; e 24h;), e as amostras preparadas foram denominadas CaCl2_Alg/Am/Bent4.

Paralelamente a este estudo, foram avaliados os efeitos que cloreto de ferro III (FeCl_3 _Alg/Am/Bent4) teria nos *scaffolds*, também numa concentração de solução de 5% m/v em água destilada, pelo tempo de 0,25 h. Por fim, uma solução composta pela mistura dos dois reticulantes aqui mencionados, numa proporção de 50/50 (FeCl_3 /CaCl2_Alg/Am/Bent4), foi analisada sob as mesmas condições experimentais.

4.5.1 Análise da morfologia e interação entre os *scaffolds* e os agentes reticulantes

Com o objetivo de analisar a influência dos diferentes reticulantes na morfologia e diâmetro dos filamentos, foram impressos *scaffolds* contendo uma camada e reticulados por 12 h. Após o processo de reticulação, os filamentos foram limpos com água destilada e secos em temperatura ambiente. Os parâmetros de medição e microscópio utilizados foram os mesmos mencionados previamente.

4.5.2 Características químicas de superfície

As interações químicas entre os *scaffolds* e os diferentes reticulantes, assim como a caracterização dos materiais de partida utilizados, foram investigadas por meio da análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por reflectância total atenuada (FTIR-ATR). As análises foram realizadas em um espectrômetro PerkinElmer Frontier, na faixa de 4000 a 450 cm^{-1} , com resolução 4 cm^{-1} e 16 varreduras. Para a análise, *scaffolds* com 15 camadas foram impressos e reticulados com os três reticulantes mencionados anteriormente por diferentes períodos de tempo (0,25 h; 0,5 h; 1 h; 2 h; 6 h; 12 h; e 24 h). Os dados brutos passaram por um processo de normalização (entre valores de transmitância entre 0% e 100%) e por um processo de suavização com o filtro Savitzky-Golay (25 pontos) com objetivo de melhorar a visualização.

4.5.3 Degradação e intumescimento

Os testes de degradação *in vitro* foram realizados com o objetivo de analisar a penetração dos reticulantes em todo o volume dos *scaffolds*. Para os testes de degradação *in vitro*, os *scaffolds* foram imersos em solução tampão salina de fosfato (PBS) em pH = 7,4 por 24 h a 37 °C (Sangkert *et al.*, 2021). Os *scaffolds* foram removidos da solução em intervalos de tempo pré-determinados de 6 h, 12 h e 24 h.

Após a remoção, a massa foi medida e o intumescimento foi calculado de acordo com a Equação 2 (Sangkert *et al.*, 2021), onde M_i representa a massa inicial e M_e a massa do scaffold intumescido.

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{M_e - M_i}{M_i} \times 100 \quad (2)$$

Para o cálculo da taxa de degradação, os *scaffolds* (após imersão) foram liofilizados para remoção da água, e foi utilizada a Equação 3 (Budharaju; Sundaramurthi; Sethuraman, 2023), onde M_b representa a massa dos *scaffolds* após secagem.

$$\text{Degradação (\%)} = \frac{M_i - M_b}{M_i} \times 100 \quad (3)$$

4.5.4 Morfologia

A morfologia da superfície dos *scaffolds* foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um microscópio JEOL NeoScope JCM-7000, utilizando uma tensão de 5 kV, disponível no Laboratório Multiusuário de Caracterização Avançada (LMCA) da UFSC Campus Blumenau.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS SCAFFOLDS OBTIDOS

Após a escolha do teor de Bent, do reticulante e do tempo de reticulação, foi realizada a caracterização dos *scaffolds* selecionados. Para isso, foram impressos *scaffolds* com 20 camadas e reticulados com cloreto de cálcio por 2 h. Amostras sem amido e sem Bent foram impressas para análise comparativa.

Os *scaffolds* obtidos foram analisados, inicialmente, quanto à morfologia e características químicas por MEV e FTIR, respectivamente, seguindo os mesmos procedimentos já descritos anteriormente.

4.6.1 Caracterização térmica

A caracterização térmica dos *scaffolds* foi realizada por análise termogravimétrica (TGA) utilizando o equipamento PerkinElmer TGA 8000. As amostras foram aquecidas de 30 °C a 700 °C, com uma taxa de aquecimento de 20 °C/min, sob atmosfera de argônio, a uma vazão de 20 mL/min. Os dados foram

processados usando o software Origin 2025b. Para melhorar a visualização dos gráficos derivados, os dados foram suavizados utilizando o filtro Savitzky-Golay (25 pontos) duas vezes.

4.6.2 Ensaios mecânicos de compressão

Os ensaios mecânicos de compressão foram realizados em um analisador dinâmico-mecânico (DMA) TA Instruments DMA 850, com aplicação de carga de 0 N a 18 N com uma taxa de 0,1 N/min, e uma pré-carga de 0,1 N. A análise foi realizada operando no modo Rate Control - Stress Ramp nas temperaturas de 23 °C e 37 °C.

4.6.3 Ângulo de contato

A hidrofiliabilidade das amostras foi avaliada por meio da deposição direta de gotas de água destilada (10 µL) sobre a superfície de um filme de cada amostra utilizando um goniômetro Ossila acoplado ao software Ossila Contact Angle 4.2.1. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e a média e o desvio padrão dos resultados foram determinados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

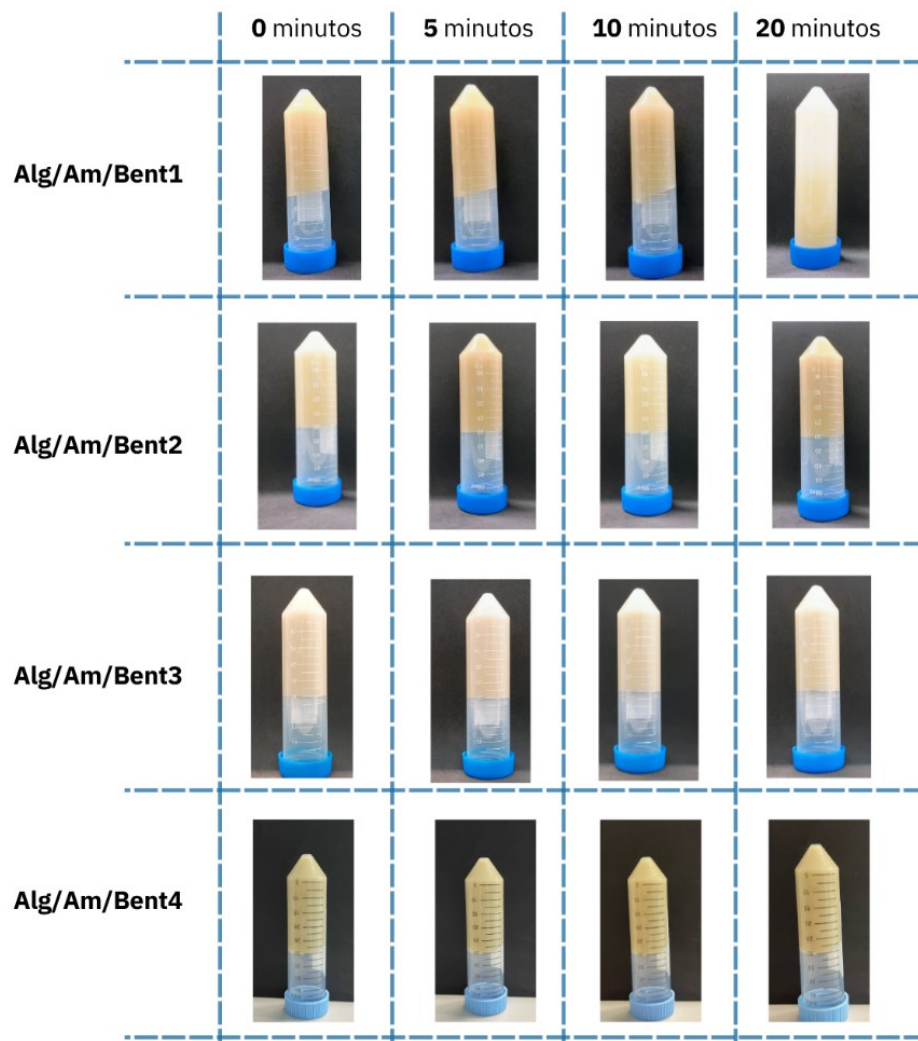
5.1 ESCOLHA DO TEOR DE BENT

5.1.1 Análise qualitativa da viscosidade

A metodologia de impressão escolhida requer que as tintas tenham uma viscosidade alta o suficiente tal que o *scaffold* consiga manter as suas características estruturais até passar pelo processo de reticulação (Schwab *et al.*, 2020). No presente trabalho, é esperado que as cadeias poliméricas, tanto do alginato quanto de amido, intercalem entre as lamelas de Mt, aumentando assim a viscosidade (García-Villén *et al.*, 2021).

Ao analisar a viscosidade de maneira qualitativa (visual) (Figura 14), a solução contendo 1% de Bent (Alg/Am/Bent1) foi a única que, após 5 min, demonstrou sinais de escoamento. Após 10 min, é possível notar uma mudança perceptível entre a posição inicial e a posição encontrada. Aos 20 min, a solução se encontrou na base do tubo Falcon, tendo escorrido uma quantia considerável. As restantes soluções contendo 2%, 3% e 4% de Bent, Alg/Am/Bent2, Alg/Am/Bent3 e Alg/Am/Bent4, respectivamente, não demonstraram sinais perceptíveis de escoamento nos tempos observados.

Figura 14 – Análise qualitativa da viscosidade das soluções com diferentes teores de Bent.



Fonte: Autoria própria.

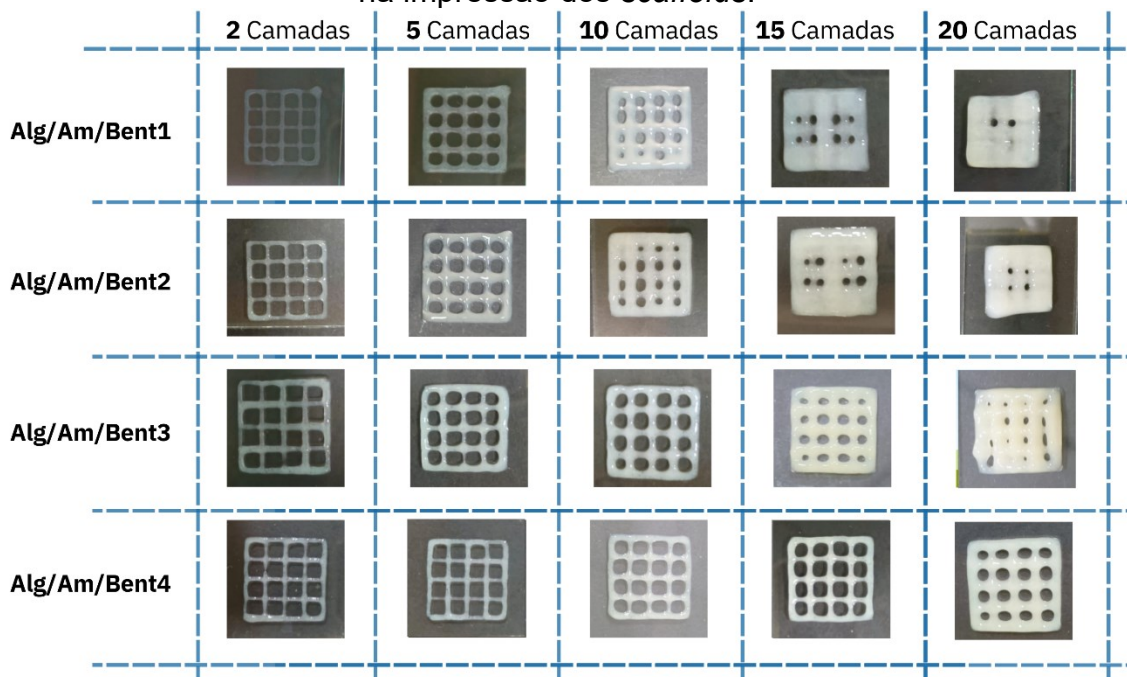
Todas as soluções, exceto Alg/Am/Bent1, foram consideradas aptas para impressão. Dois fatores podem ser atribuídos à diferença em desempenho entre as soluções: a menor porcentagem de água que as demais soluções possuem, e o tamanho em escala nanométrica das camadas esfoliadas de Mt, resultando em uma grande área superficial, a qual interage com as cadeias poliméricas. É esperado que essas interações causem um aumento significativo na viscosidade (Alexa *et al.*, 2021).

5.1.2 Morfologia

5.1.2.1 Análise visual

As tintas produzidas foram usadas para imprimir *scaffolds* com 2, 5, 10, 15 e 20 camadas (Figura 15). A tinta Alg/Am/Bent1 foi utilizada com o propósito de confirmar seu pior desempenho no processo de impressão analisado no ensaio qualitativo de viscosidade. Com 10 camadas já é possível observar que um dos seus 16 poros está obstruído, e o mesmo ocorre com a tinta Alg/Am/Bent2. A oclusão dificulta a propagação de nutrientes no *scaffold*, prejudicando a viabilidade celular (Allen *et al.*, 2021).

Figura 15 – Imagens demonstrando a influência de diversas porcentagens de Bent na impressão dos *scaffolds*.



Fonte: Autoria própria.

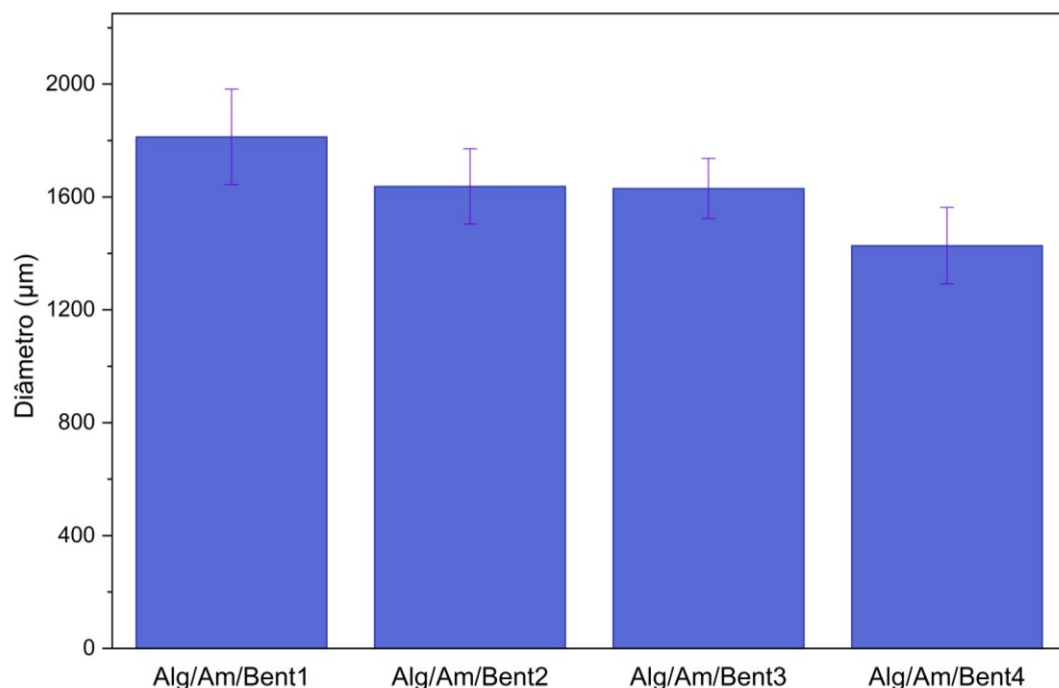
Ao imprimir 15 camadas, as soluções Alg/Am/Bent1 e Alg/Am/Bent2 apresentaram metade dos seus poros obstruídos, contracenando com as soluções Alg/Am/Bent3 e Alg/Am/Bent4, as quais apresentam todos seus poros desobstruídos. Isto indica que a adição de Bent pode ter causado um menor espalhamento dos filamentos na superfície, levando a uma menor oclusão dos poros.

Após 20 camadas, a única tinta que apresentou todos os seus poros desobstruídos foi a Alg/Am/Bent4, demonstrando uma maior fidelidade com o modelo computacional proposto. A solução Alg/Am/Bent1 teve 14 dos seus poros obstruídos, confirmando o pior resultado observado no teste qualitativo de viscosidade.

5.1.2.2 Microscopia ótica

A primeira camada de filamentos impressa é muito importante, pois essa serve como base e dá suporte ao restante do *scaffold* (Schwab *et al.*, 2020). É possível notar que ao aumentar o teor de Bent, o diâmetro médio dos filamentos diminui (Figura 16). Ao adicionar 1% m/v de Bent, obteve-se os maiores filamentos com uma média de $1813 \mu\text{m} \pm 169 \mu\text{m}$. A média do diâmetro dos filamentos Alg/Am/Bent2 e Alg/Am/Bent3 foi de $1637 \mu\text{m} \pm 133 \mu\text{m}$ e $1630 \mu\text{m} \pm 106 \mu\text{m}$ respectivamente, não obtendo-se uma diferença aparente nos diâmetros entre 2% e 3% de Bent. Os menores filamentos obtidos foram os da solução Alg/Am/Bent4, com um diâmetro médio de $1427 \mu\text{m} \pm 135 \mu\text{m}$.

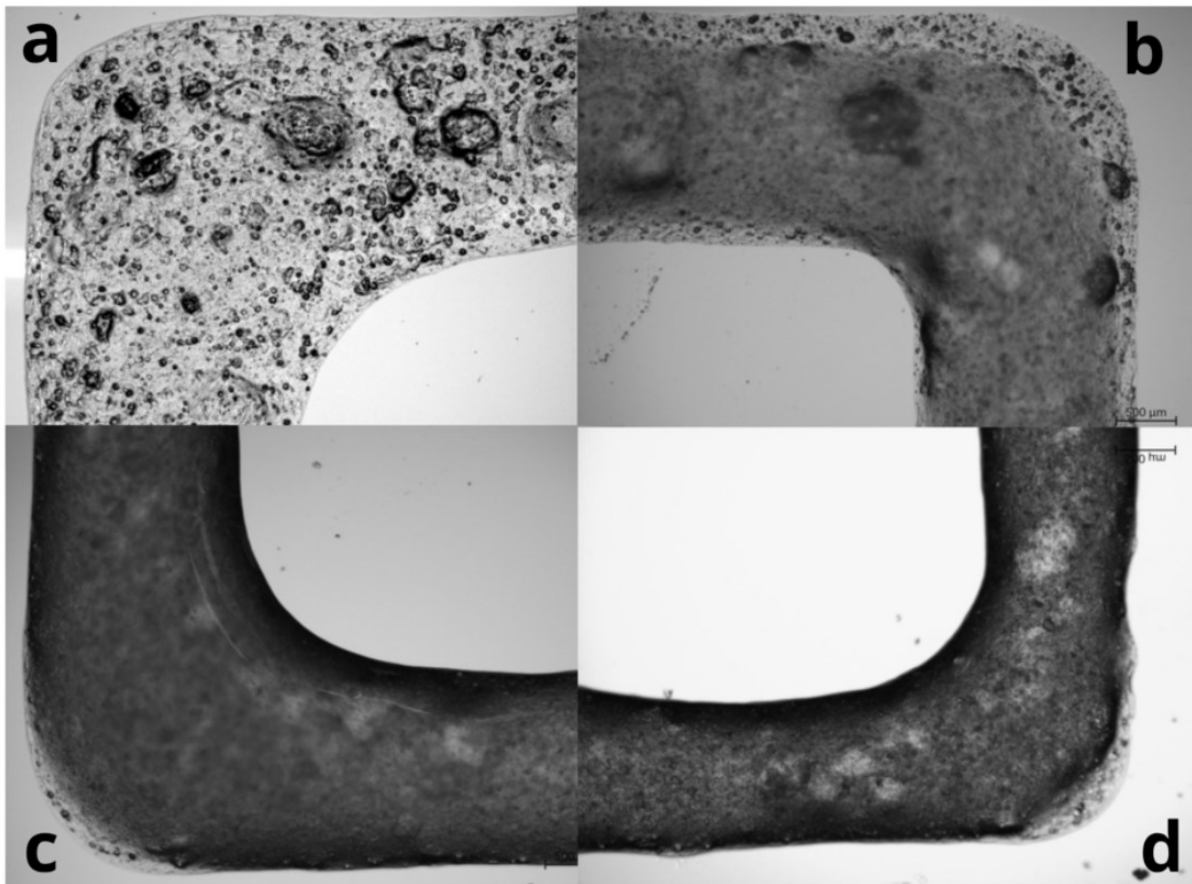
Figura 16 – Comparação do diâmetro da primeira camada impressa em relação à proporção de Bent.



Fonte: Autoria própria.

A atenuação nas dimensões do filamento entre 1% e 4% m/v de Bent é visualmente perceptível (Figura 17). É possível notar também que, ao aumentar a quantidade de Bent, os filamentos tornam-se mais escuros, com a Bent agindo como uma barreira para a passagem de luz.

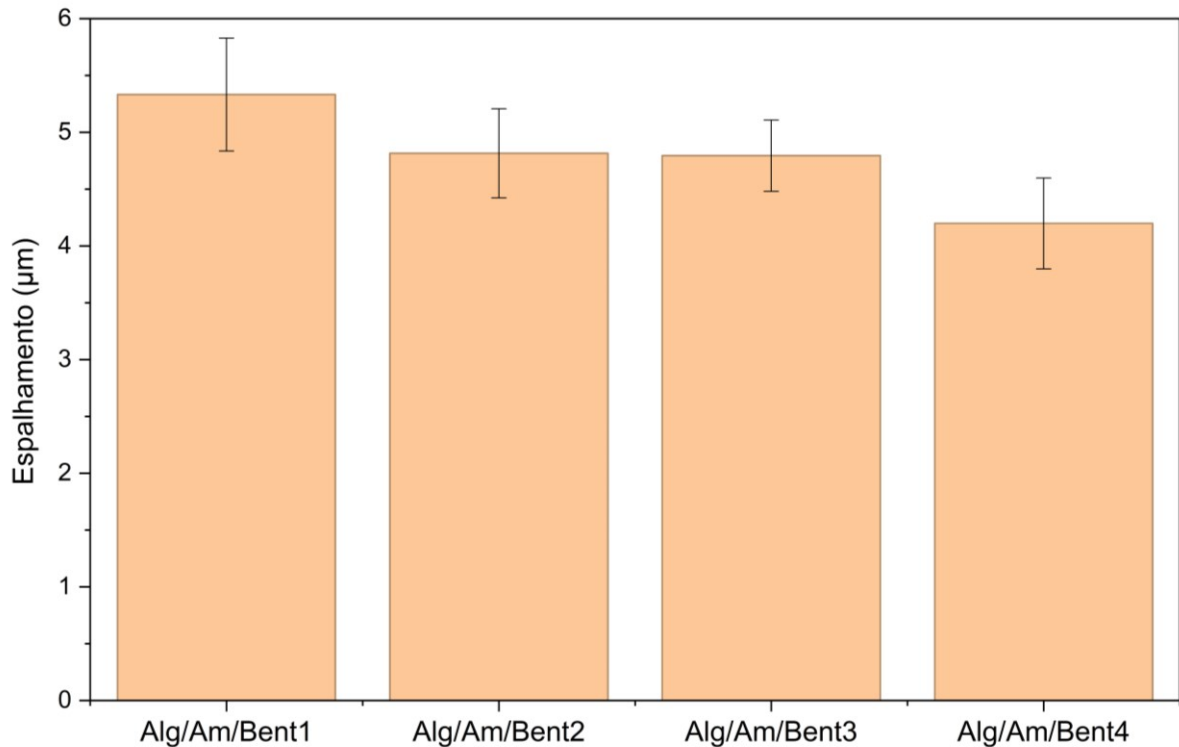
Figura 17 – Imagens de microscopia ótica dos filamentos medidos para as amostras: a) Alg/Am/Bent1, b) Alg/Am/Bent2, c) Alg/Am/Bent3 e d) Alg/Am/Bent4.



Fonte: Autoria própria.

Calculando-se a taxa de espalhamento (Figura 18), é possível observar que a amostra Alg/Am/Bent1 obteve os maiores valores. Já a diferença entre o espalhamento das soluções Alg/Am/Bent2 e Alg/Am/Bent3 não foi expressiva. A solução Alg/Am/Bent4 obteve a menor taxa de espalhamento, apesar de ainda possuir um espalhamento importante em comparação ao diâmetro da agulha.

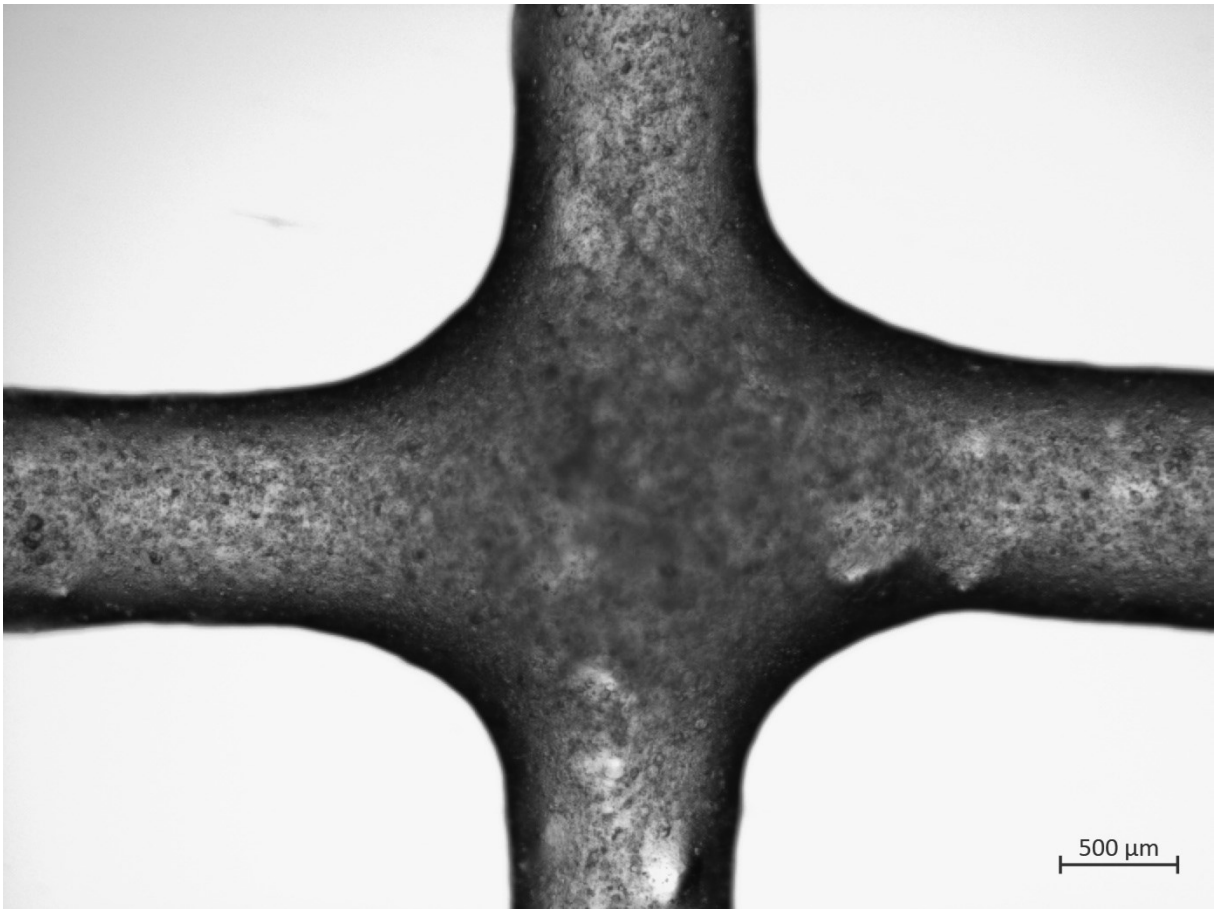
Figura 18 – Proporção de espalhamento dos filamentos da primeira camada impressa utilizando formulações com diferentes proporções de Bent.



Fonte: Autoria própria.

O espalhamento pode ser confirmado ao imprimir duas camadas e visualizar no microscópio. Idealmente, o diâmetro da interseção onde os filamentos se encontram deveria ser igual ao diâmetro do filamento original (Schwab *et al.*, 2020). Nos filamentos Alg/Am/Bent4 (Figura 19), é possível notar visualmente o aumento do diâmetro na interseção dos filamentos, o que causa uma aparência arredondada aos poros.

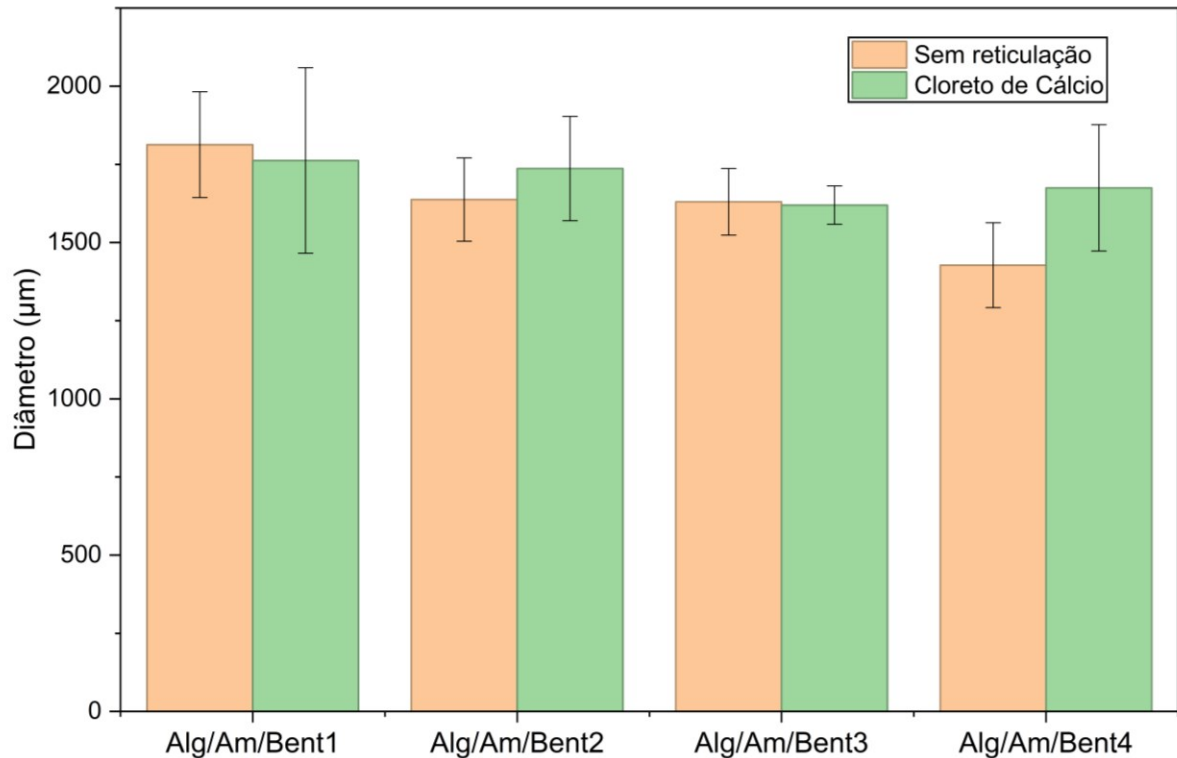
Figura 19 – Imagens de microscopia ótica da intersecção de dois filamentos da solução Alg/Am/Bent4.



Fonte: Autoria própria.

O diâmetro dos filamentos após o processo de reticulação com cloreto de cálcio está apresentado na Figura 20. Não foi possível notar uma correlação linear entre o aumento do teor de Bent e o diâmetro. Nas três primeiras formulações (Alg/Am/Bent1, Alg/Am/Bent2 e Alg/Am/Bent3) não é possível notar uma diferença perceptível entre o diâmetro antes e após o processo de reticulação. Na amostra Alg/Am/Bent4 existe uma expansão notável entre o diâmetro antes e após o processo de reticulação.

Figura 20 – Influência no diâmetro dos filamentos exercido pela reticulação por cloreto de cálcio em formulações com diferentes proporções de Bent.

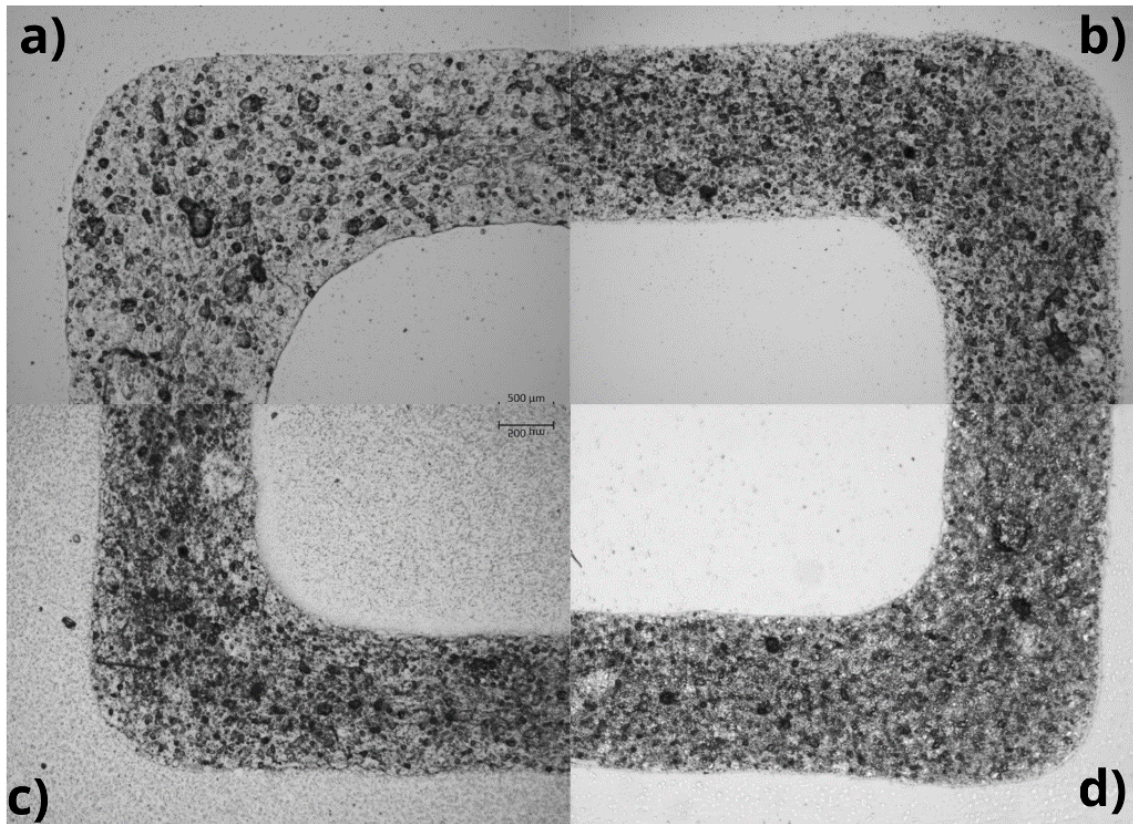


Fonte: Autoria própria.

Estes resultados divergem de Bom *et al.* (2020) que produziram curativos de alginato e amido reticulados com cloreto de cálcio. Após o processo de reticulação, houve uma diminuição na área dos curativos, e essa diminuição foi maior nos curativos que continham amido em comparação com os que só continham alginato. Adicionalmente, no trabalho de Chen, Zhou e Wang (2022), que analisaram o diâmetro de filamentos feito com variados teores de alginato, com e sem colágeno na sua composição, houve a diminuição do diâmetro dos filamentos após o processo de reticulação em todos os filamentos analisados.

Após o processo de reticulação (Figura 21), todos os filamentos tiveram uma mudança na sua morfologia, assumindo visualmente uma textura mais áspera e rugosa. O filamento Alg/Am/Bent1 também demonstrou um maior arredondamento da lateral dos seus poros em comparação com as outras formulações. O arredondamento é um índice visual do espalhamento da tinta (Schwab *et al.*, 2020), confirmando o seu maior espalhamento calculado anteriormente.

Figura 21 - Imagens de microscopia ótica dos filamentos medidos após o processo de reticulação com o cloreto de cálcio: a) Alg/Am/Bent1, b) Alg/Am/Bent2, c) Alg/Am/Bent3 e d) Alg/Am/Bent4.



Fonte: Autoria própria.

5.1.3 Conclusões parciais

A formulação escolhida para serem realizados os testes subsequentes foi Alg/Am/Bent4. Esta composição foi a que obteve *scaffolds* mais fidedignos ao modelo computacional proposto, e foi a única onde foi possível imprimir *scaffolds* com até 20 camadas com um alto grau de fidelidade aparente. Também foi a composição em que foram obtidos filamentos com menor diâmetro e menor taxa de espalhamento. Sendo assim, os testes subsequentes foram realizados utilizando essa formulação.

5.2 ANÁLISE DOS DIFERENTES AGENTES RETICULANTES

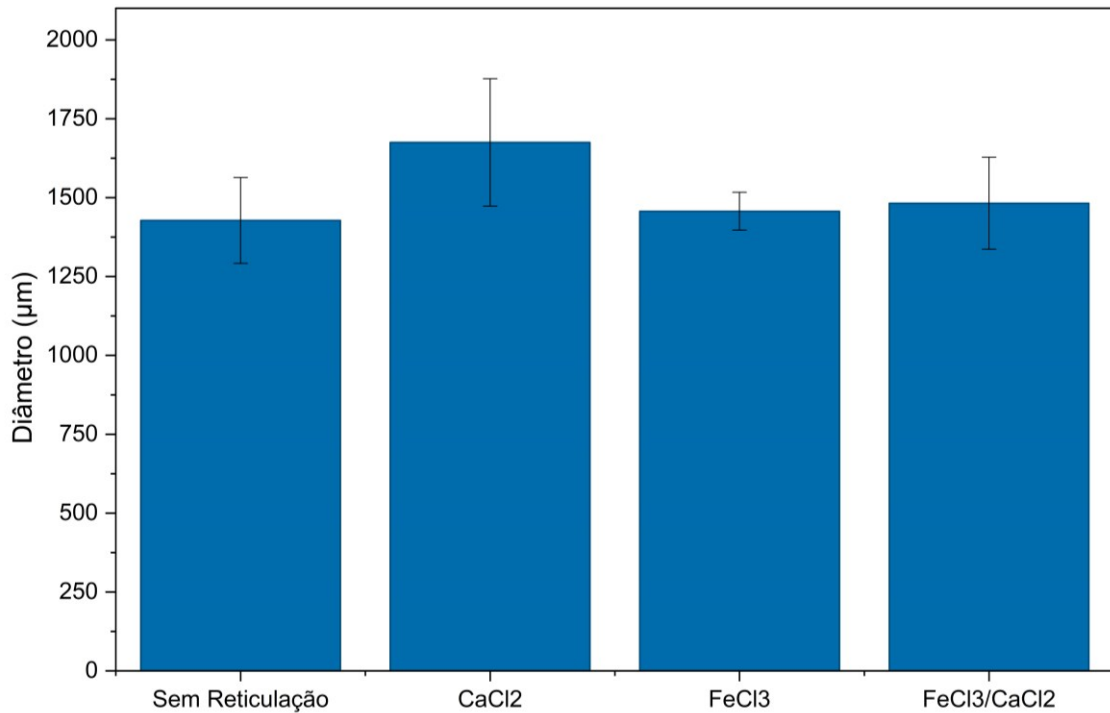
5.2.1 Morfologia

5.2.1.1 *Microscopia óptica*

A solução Alg/Am/Bent4, antes de passar pelo processo de reticulação, apresentou um diâmetro médio de $1427 \mu\text{m} \pm 135 \mu\text{m}$. A solução reticulada com cloreto de ferro III apresentou um valor de $1456 \mu\text{m} \pm 59\mu\text{m}$ (Figura 22) e a solução reticulada com a mistura de cloreto de ferro III e cloreto de cálcio apresentou um diâmetro de $1482 \mu\text{m} \pm 145\mu\text{m}$. Estes resultados indicam que estes dois tipos de agentes reticulantes não interferiram no diâmetro dos filamentos após o processo de reticulação. Os filamentos reticulados com cloreto de cálcio, por sua vez, apresentaram um aumento no diâmetro ($1674 \mu\text{m} \pm 202 \mu\text{m}$).

Silva *et al.* (2020) estudou o efeito de diferentes reticulantes no alginato (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+}). Dentre esses Fe^{2+} e Fe^{3+} foram os que menos tiveram efeito na área após o processo de reticulação, se tornando uma opção interessante em trabalhos de bioimpressão utilizando alginato que buscam uma alta fidelidade nos *scaffolds*. Esses resultados estão de acordo com os resultados para cloreto de ferro III, resultando em uma pouca variação no diâmetro.

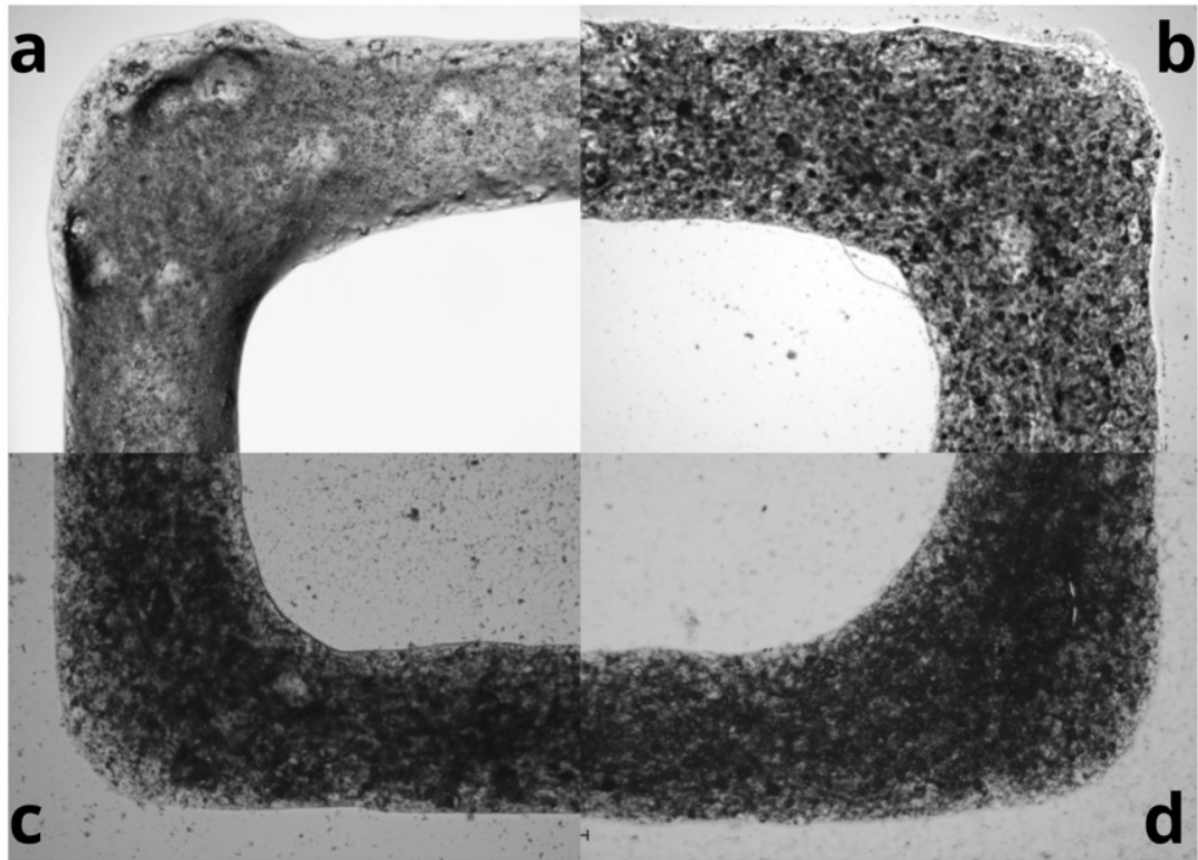
Figura 22 – Diferença entre os diâmetros dos filamentos de Alg/Am/Bent4 antes do processo de reticulação e após serem reticulados com diferentes agentes reticulantes.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 23 tem-se o efeito dos diferentes reticulantes na morfologia dos filamentos. Apesar do filamento sem reticulação não ser totalmente homogêneo, a presença dos reticulantes tornaram a superfície mais rugosa, efeito mais aparente nos filamentos reticulados com cloreto de ferro III. Esta diferença pode ser atribuída a maior densidade reticular do cloreto de ferro III. Enquanto o Ca^{2+} liga-se apenas com os grupos G do alginato, o Fe^{3+} liga-se com os grupos G e MG do alginato. A reticulação com cloreto de ferro III também confere uma tonalidade alaranjada característica, resultando numa tonalidade mais escura na microscopia (Massana *et al.*, 2022).

Figura 23 – Imagens de microscopia ótica com o efeito de diferentes reticulantes na morfologia dos *scaffolds* Alg/Am/Bent4 após 12 h de reticulação: a) sem reticulação, b) CaCl₂, c) FeCl₃/CaCl₂, e d) FeCl₃.



Fonte: Autoria própria.

5.2.2 Intumescimento e degradação

Nesta etapa do trabalho, além de avaliar o efeito dos diferentes agentes reticulantes na estabilidade dos *scaffolds* obtidos, por meio de ensaios de intumescimento e degradação em meio simulador de fluido corporal (PBS salino), foi analisado o efeito da presença do amido nestes materiais. Desta forma, além da composição Alg/Am/Bent4, foi analisada também a formulação Alg/Bent4 (sem adição de amido).

As formulações contendo amido reticuladas com cloreto de cálcio apresentaram uma taxa de inchamento (Figura 24) e degradação (Figura 25) uniforme. A taxa de intumescimento decrescente pode ser explicada pelo fato que a absorção de água e a degradação/solubilização são processos simultâneos, e a baixa porcentagem de intumescimento presente após 24 h está de acordo com a

alta solubilização ocorrida, sendo superior a 90%. Já os *scaffolds* sem amido apresentam uma taxa de intumescimento e degradação irregular, não seguindo um processo homogêneo.

A degradação *in vivo* do alginato ocorre por meio da dissolução do processo de reticulação mediante trocas iônicas, resultando em um processo errático e dificilmente controlável (Gao; Kim; Gao, 2021). Esse processo está refletido em todas as amostras Alg/Bent4 (

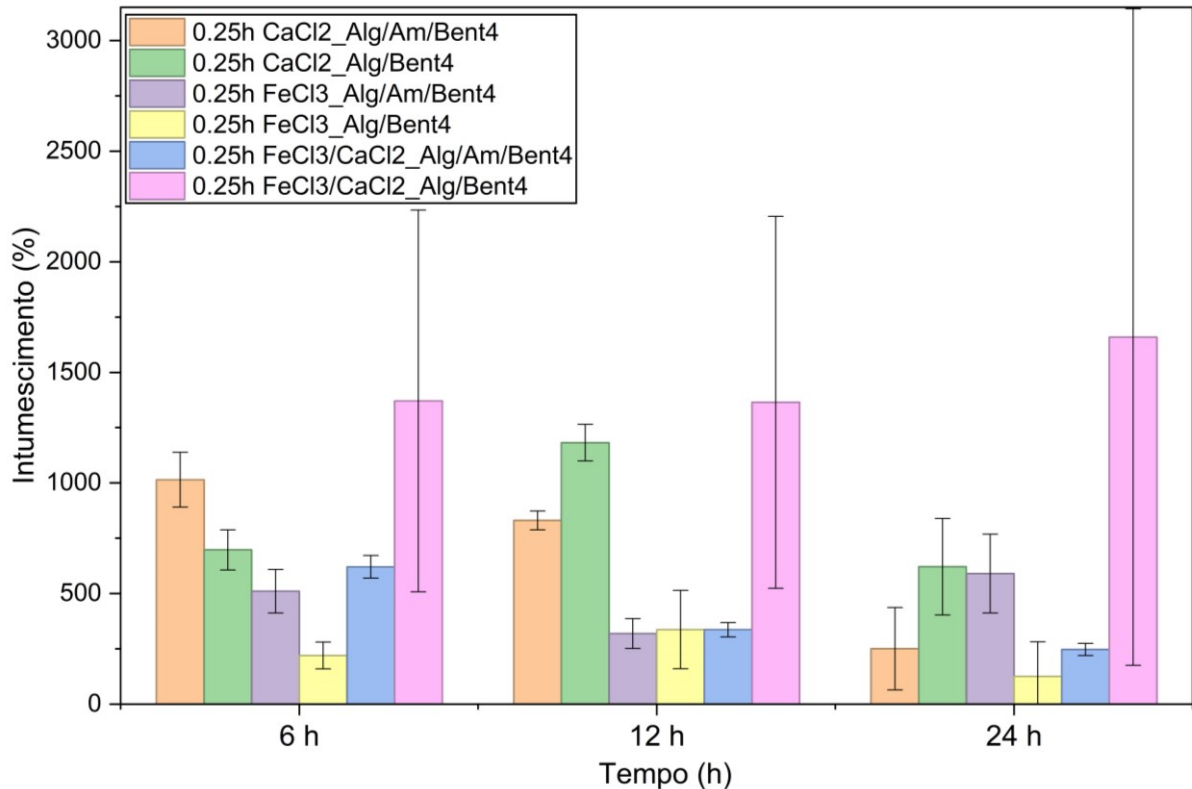
Figura 25), onde o processo de degradação demonstrou-se não homogêneo. A adição de amido seguida da reticulação com cloreto de cálcio tornou esse processo mais uniforme. No entanto, não é possível inferir se as amostras contendo amido reticuladas com cloreto de ferro III degradam-se de maneira homogênea, pois as taxas de degradação são extremamente próximas e os desvios padrões altos.

Nas primeiras 6 h, as amostras contendo amido reticuladas com cloreto de cálcio ou uma mistura deste com cloreto de ferro III (CaCl₂_Alg/Am/Bent4 e FeCl₃/CaCl₂_Alg/Am/Bent4) apresentaram a menor taxa de degradação. Essa diferença se torna menos pronunciada após 12 h. Lin *et al.* (2021) produziram *scaffolds* de alginato e tapioca e, ao aumentar a quantidade amido, observaram um aumento na taxa de degradação. Este comportamento foi explicado pela interação iônica entre amido e água, que contribuiu para a dissolução das cadeias do *scaffold*.

Uma explicação para o melhor desempenho do amido nas primeiras 6 h é o uso de cloreto de cálcio como reticulante, pois os íons de cálcio formam ligações iônicas com grupos hidroxílicos presentes no amido, diminuindo a taxa de degradação (Liu *et al.*, 2025). É possível que essas ligações tenham se formado superficialmente, não se difundindo para a totalidade do *scaffold*.

Outra explicação é que existem evidências de que o cloreto de cálcio induz interações físicas com o amido (Xu *et al.*, 2025). Essas interações poderiam afetar a taxa de degradação, porém são rapidamente desfeitas (Feng, Wenjun; Wang, 2023). Por isso, o efeito induzido pela presença do amido não pode mais ser visível após 12 h.

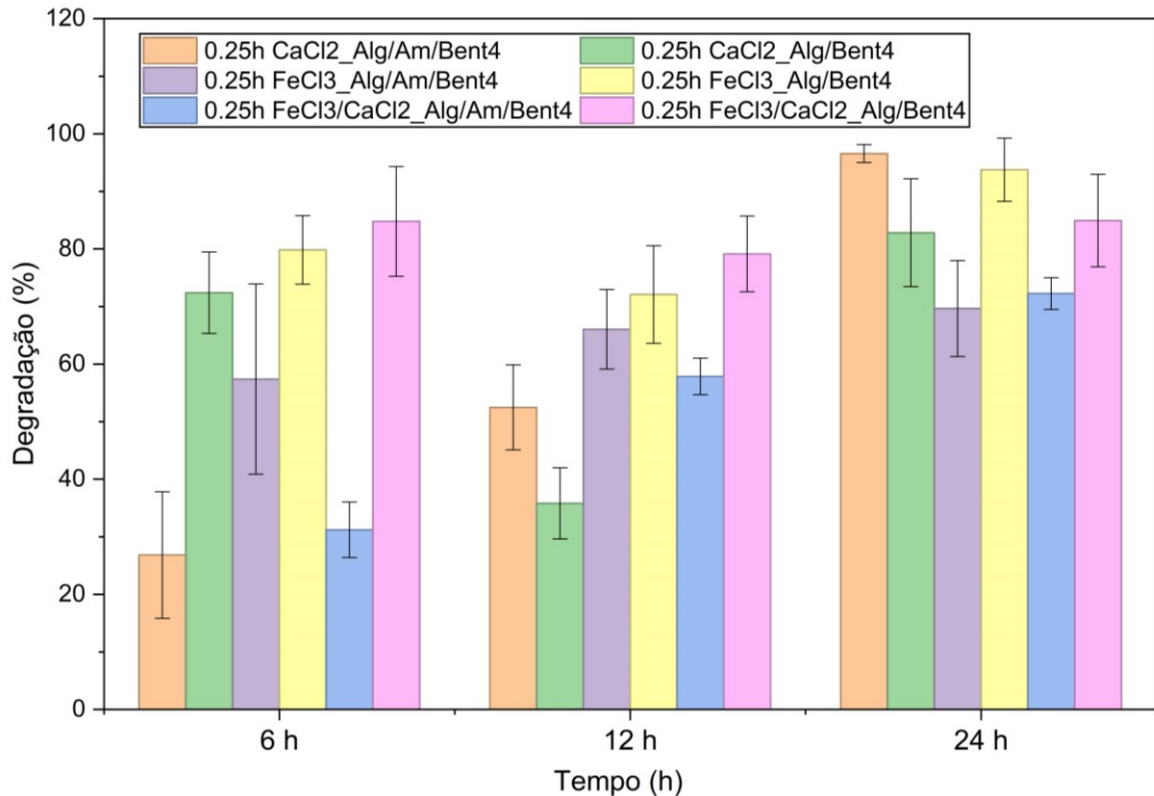
Figura 24 – Comparativo de intumescimento entre composições com diferentes agentes reticulantes.



Fonte: Autoria própria.

Comparando o processo de intumescimento entre os diferentes *scaffolds*, nota-se que aqueles reticulados com cloreto de ferro III, em geral, apresentaram uma menor taxa de intumescimento nas primeiras 12 h (Figura 24). O cloreto de ferro III possui uma maior densidade reticular, o que dificulta a separação das cadeias poliméricas, resultando numa menor absorção da água (Massana *et al.*, 2022). A elevada porcentagem de intumescimento da amostra 0,25 h FeCl₃/CaCl₂_Alg/Bent4 necessita de estudos complementares para compreensão do mecanismo.

Figura 25 – Comparativo de degradação entre composições com diferentes agentes reticulantes.



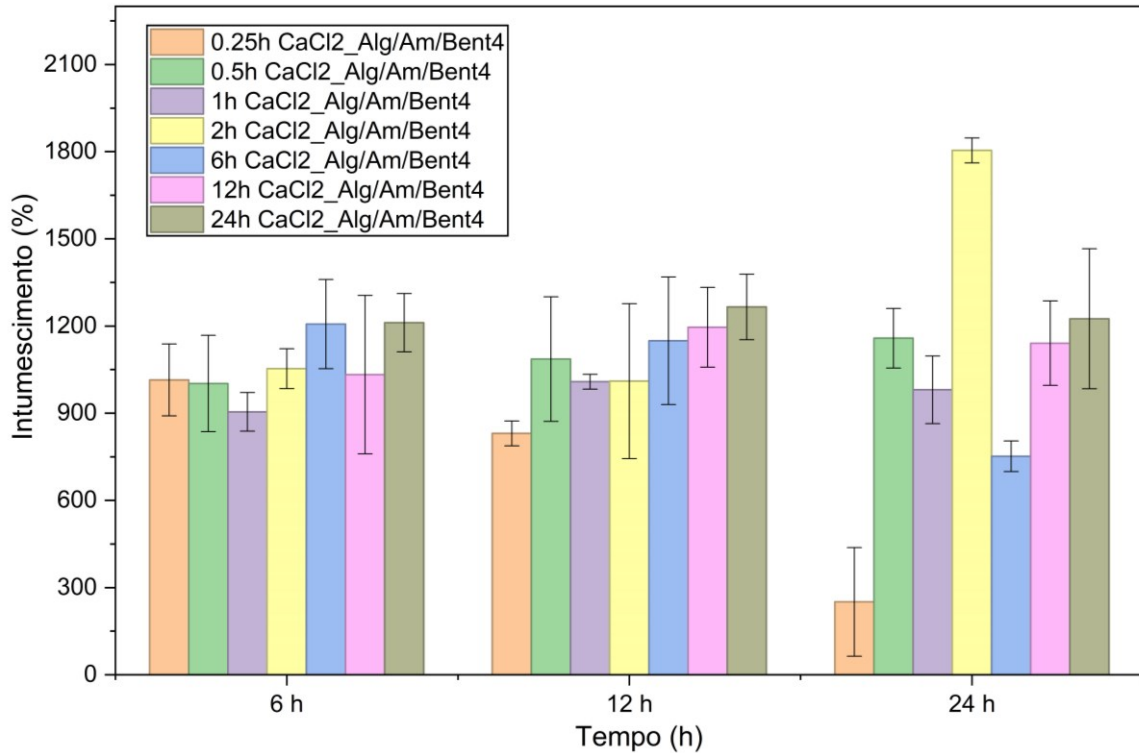
Fonte: Autoria própria.

As amostras reticuladas com cloreto de ferro III contendo amido apresentaram as menores taxa de degradação após 24 h. A densidade reticular do cloreto de ferro III e a menor afinidade com a água são fatores que desaceleraram o processo de degradação (Massana *et al.*, 2022). A menor taxa de degradação após 24 h das amostras contendo amido, em comparação com as que não possuem, indicam que a interação entre amido, alginato e ferro pode ser benéfica para diminuir o processo de degradação.

Ao avaliar a influência do tempo de reticulação com CaCl₂ no processo de intumescimento (Figura 26), observam-se comportamentos muito similares entre as amostras, sem uma tendência clara. A exceção se dá para a amostra reticulada por apenas 15 min, em que o intumescimento é consideravelmente menor ao longo do tempo. No entanto, ao correlacionar este comportamento com os resultados de degradação, nota-se uma degradação significativamente maior para esta amostra, indicando que o tempo de reticulação foi insuficiente para manter a integridade do

material. Assim, o menor intumescimento, neste caso, está ligado à menor quantidade de polímero presente na amostra devido a sua solubilização no meio.

Figura 26 – Influência do tempo de reticulação com cloreto de cálcio no intumescimento da formulação Alg/Am/Bent4.



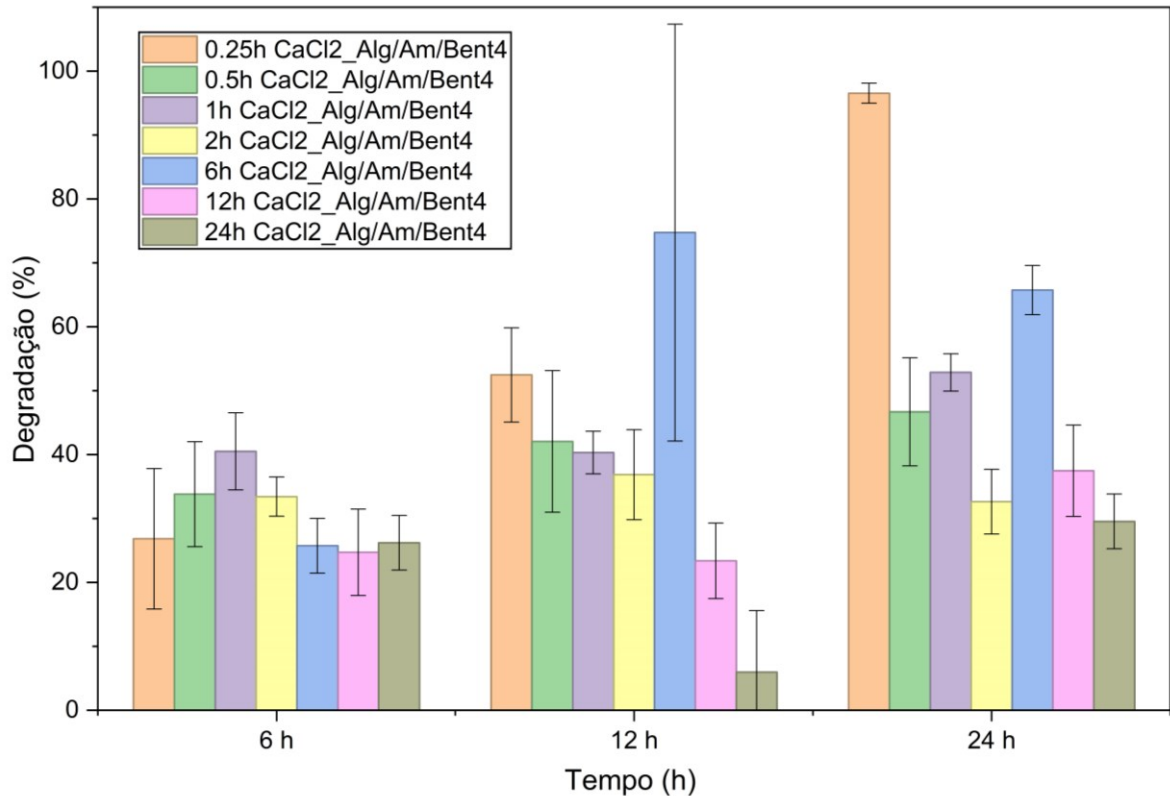
Fonte: Autoria própria.

Ao aumentar o tempo de reticulação com cloreto de cálcio (Figura 27), a taxa de degradação diminuiu. Esse resultado coincide com a teoria que a reticulação do alginato por cloreto de cálcio é um processo de difusão, demorando para que os íons de cálcio penetrem da superfície para o interior do material. Patel *et al.* (2017) produziram partículas de alginato reticuladas com cloreto de cálcio e encontraram um tempo de reticulação superficial de 30 min e um tempo de 4 h para a reticulação interna estabilizar.

Dos tempos testados, o período de 2 h se mostrou mais estável. Inicialmente, os *scaffolds* reticulados por 0,25 h apresentaram uma baixa taxa de degradação, mas após 24 h já estavam quase 100% degradados, indicando que ocorreu a reticulação superficial, mas a difusão interna não chegou ao equilíbrio. Os *scaffolds* reticulados por 0,5 h e 1 h apresentam taxas de degradação semelhantes após 24 h de ensaio, e também menores do que aqueles reticulados por 0,25 h,

indicando que houve uma maior difusão do agente reticulante no volume todo de material.

Figura 27 – Influência do tempo de reticulação com cloreto de cálcio na degradação da formulação Alg/Am/Bent4.



Fonte: Autoria própria.

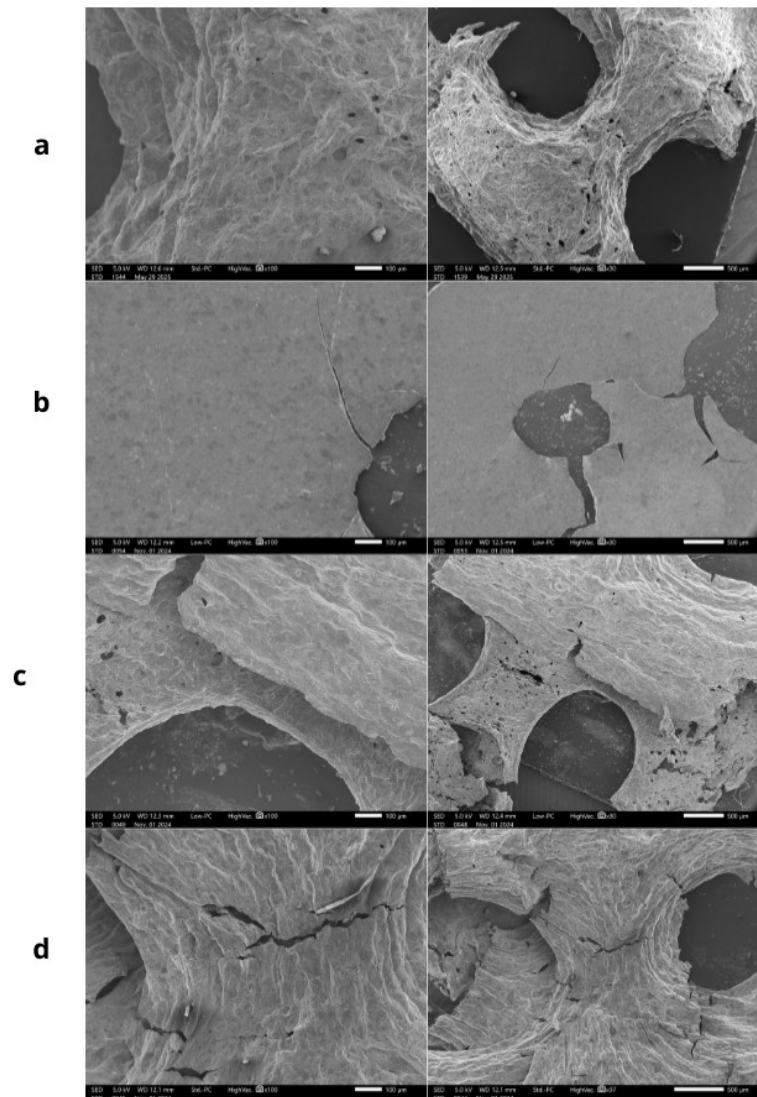
A amostra reticulada por 2 h apresentou um processo de degradação inicial alto, degradando-se em torno de 30% da sua massa inicial após 6 h. Porém, após este período, manteve-se estável. A partir de 6 h de reticulação, é possível notar que o processo de degradação dos *scaffolds* torna-se irregular. Uma possível explicação para isso é a interação dos íons de cálcio com o amido, em que uma excessiva reticulação com cloreto de cálcio pode desintegrar a estrutura dos grânulos de amido (Xu *et al.*, 2025), e dependendo das fissuras formadas na estrutura do *scaffold*, isso pode levar a uma maior penetração da solução, acelerando o processo de degradação.

Para entender melhor os mecanismos por trás do processo de biodegradação, as amostras reticuladas por 2 h, 6 h, 12 h e 24 h foram selecionadas para serem analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5.2.3 Morfologia

É possível observar nas imagens de MEV (Figura 28) que o aumento do tempo de reticulação resultou em uma superfície menos homogênea. Dentre as imagens analisadas, a reticulação por 2 h apresentou os melhores resultados. A partir de 6 h, já é possível evidenciar a presença de fragmentação na superfície. Após 24 h de reticulação, a superfície apresentou diversas rachaduras que poderiam afetar a integridade dos *scaffolds*.

Figura 28 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* Alg/Am/Bent4, reticulados com CaCl_2 por a) 2 h, b) 6 h, c) 12 h e d) 24 h.



Fonte: Autoria própria.

Xu-Ke *et al.* (2025) compararam o efeito de diversas concentrações de cloreto de cálcio em grânulos de amido. Em baixas concentrações (0,7 mol/L), os grânulos de amido permaneceram na sua maioria intactos. Entre 1,4 mol/L e 2,1 mol/L, os grânulos demonstraram diversos graus de colapso. Nessa fase, os íons de cloro enfraquecem as ligações de hidrogênio do amido e os íons de cálcio interagem com os grupos hidroxila, levando a desintegração dos grânulos. Em concentrações mais altas (2,8 mol/L), ocorre a degradação da maioria dos grânulos de amido.

Jialin-Wang *et al.* (2022) produziram filmes de amido com diferentes proporções de CaCl₂ e verificaram que a adição do CaCl₂ resultou em uma superfície áspera, a qual foi atribuída ao emaranhamento das cadeias poliméricas. Quantidades excessivas de cloreto de cálcio resultaram em uma superfície não uniforme.

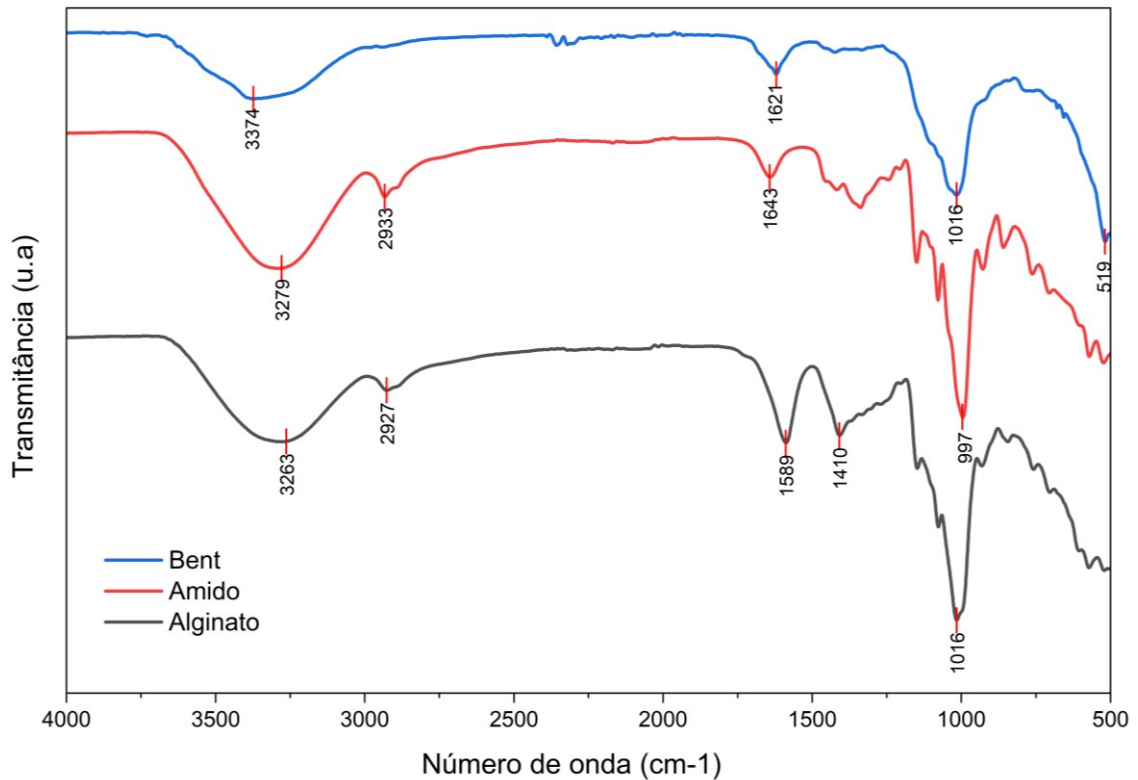
Os resultados aqui encontrados indicam que as rachaduras encontradas nos *scaffolds* após 2 h poderiam ser um efeito da interação prolongada do CaCl₂ com o amido e, portanto, este tempo limite foi estabelecido para a continuidade do estudo.

5.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

5.2.4.1 Caracterização dos materiais puros

Inicialmente, a caracterização dos materiais de partida indica que, nos três compostos, as bandas largas presentes entre 3300 e 3200 cm⁻¹ (Figura 29) são atribuídas ao grupo hidroxila (OH) presente nas moléculas de água (Zhang, Minghui; Chen, 2023). No alginato e no amido, as bandas presentes em 2927 cm⁻¹ e 2933 cm⁻¹ representam ligações entre carbono e hidrogênio (C-H) (Li, Jiwei *et al.*, 2016; Zhang, Minghui; Chen, 2023). No alginato, a banda em 1016 cm⁻¹ representa a ligação éster (-C-O-C-), e as bandas em 1589 e 1410 cm⁻¹ são atribuídas ao grupo carboxilato, representando vibrações assimétricas e simétricas, respectivamente (Li, Jiwei *et al.*, 2016).

Figura 29 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier dos compostos utilizados na forma de pó.



Fonte: Autoria própria.

A banda em 1643 cm^{-1} , presente no amido, representa o estiramento assimétrico das ligações H-O-H (Zhang, Hongcai *et al.*, 2022), enquanto que a banda em 997 cm^{-1} representa o estiramento C-C da glucose (Zhang, Minghui; Chen, 2023). Na argila Bent, a banda presente em 1621 cm^{-1} representa a flexão da ligação OH. Já as bandas em 1016 cm^{-1} e 519 cm^{-1} representam o estiramento da ligação Si-O-Si e a flexão da ligação Si-O, respectivamente (Zhang, Minghui; Chen, 2023).

5.2.4.2 Caracterização dos scaffolds reticulados CaCl_2

Os íons de cálcio possuem uma forte interação com os grupos carboxílicos do alginato, portanto é possível avaliar o processo de reticulação observando as bandas em 1589 e 1410 cm^{-1} . A banda em 1410 cm^{-1} comporta-se de maneira esperada, deslocando-se para a esquerda em direção a comprimentos de onda maiores. Já na banda em 1589 cm^{-1} , onde era esperado um deslocamento para a

Adicionalmente, a interação do amido com o soluto pode também ser observada na banda em 3300 cm^{-1} . Neste caso, a introdução do cloreto de cálcio substitui as ligações de hidrogênio existente por interações mais fortes, formando complexos coordenados entre o amido, o soluto (CaCl_2) e as moléculas de água, aumentando a intensidade da banda (Chuang *et al.*, 2016).

5.2.5 Conclusões parciais

Em relação aos estudos envolvendo os diferentes agentes reticulantes, o cloreto de ferro III demonstrou-se promissor. Os *scaffolds* contendo amido e reticulados com cloreto de ferro III apresentaram uma menor taxa de degradação, indicando uma possível interação benéfica entre o amido e o ferro. Destaque para o scaffold 0,25 h $\text{FeCl}_3/\text{CaCl}_2$ _Alg/Am/Bent4, que apresentou uma baixa taxa relativa de degradação e um processo de degradação uniforme. Porém, estudos adicionais são necessários para definir o tempo de reticulação ideal para uso do cloreto de ferro III como agente reticulante. Os próximos passos seriam realizar o ensaio de degradação testando diferentes tempos de reticulação e MEV para analisar o efeito na morfologia. Resultados promissores são esperados devido ao diferente mecanismo de reticulação, como uma melhora considerável nas propriedades mecânicas (Massana *et al.*, 2022).

Tratando-se das análises referentes ao tempo de reticulação, os *scaffolds* reticulados por 2 h com cloreto de cálcio apresentaram o melhor desempenho. Estas amostras apresentaram uma das menores taxas de degradação após 24 h e uma maior estabilidade. Para a engenharia tecidual, um processo de degradação regular e estável é importante para garantir que o *scaffold* mantenha sua integridade estrutural durante o processo de regeneração (Bakhtiari *et al.*, 2023). Foi observado nas análises por MEV que este *scaffold* apresentou uma maior integridade estrutural e menos fragmentações superficiais. Este resultado indica que um tempo de reticulação excessivo pode prejudicar a integridade e propriedades mecânicas do *scaffold*. Por isso, o tempo de 2 h foi selecionado como tempo ideal para reticulação com CaCl_2 .

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO SCAFFOLD SELECIONADO

5.3.1 Morfologia

Nesta parte do estudo, a formulação Alg/Am/Bent4 reticulada com CaCl₂ por 2 h foi utilizada. De modo a compreender melhor o efeito de cada componente nas propriedades finais deste *scaffolds*, composições contendo apenas um dos ingredientes (Alg/Am e Alg/Bent4) foram igualmente produzidas e caracterizadas. As imagens de MEV indicaram que todos os *scaffolds* analisados (Figura 31) possuem uma superfície não regular com poros presentes. Esta morfologia pode ser atribuída, em parte, à técnica utilizada para secar os *scaffolds* - a liofilização. Durante o processo de liofilização, os *scaffolds* são primeiramente congelados, formando cristais de água que se expandem. O material passa, na sequência, por um processo de secagem em que a água é removida por sublimação e poros são formados no local onde estavam presentes esses cristais de água (Qian; Zhang, 2011).

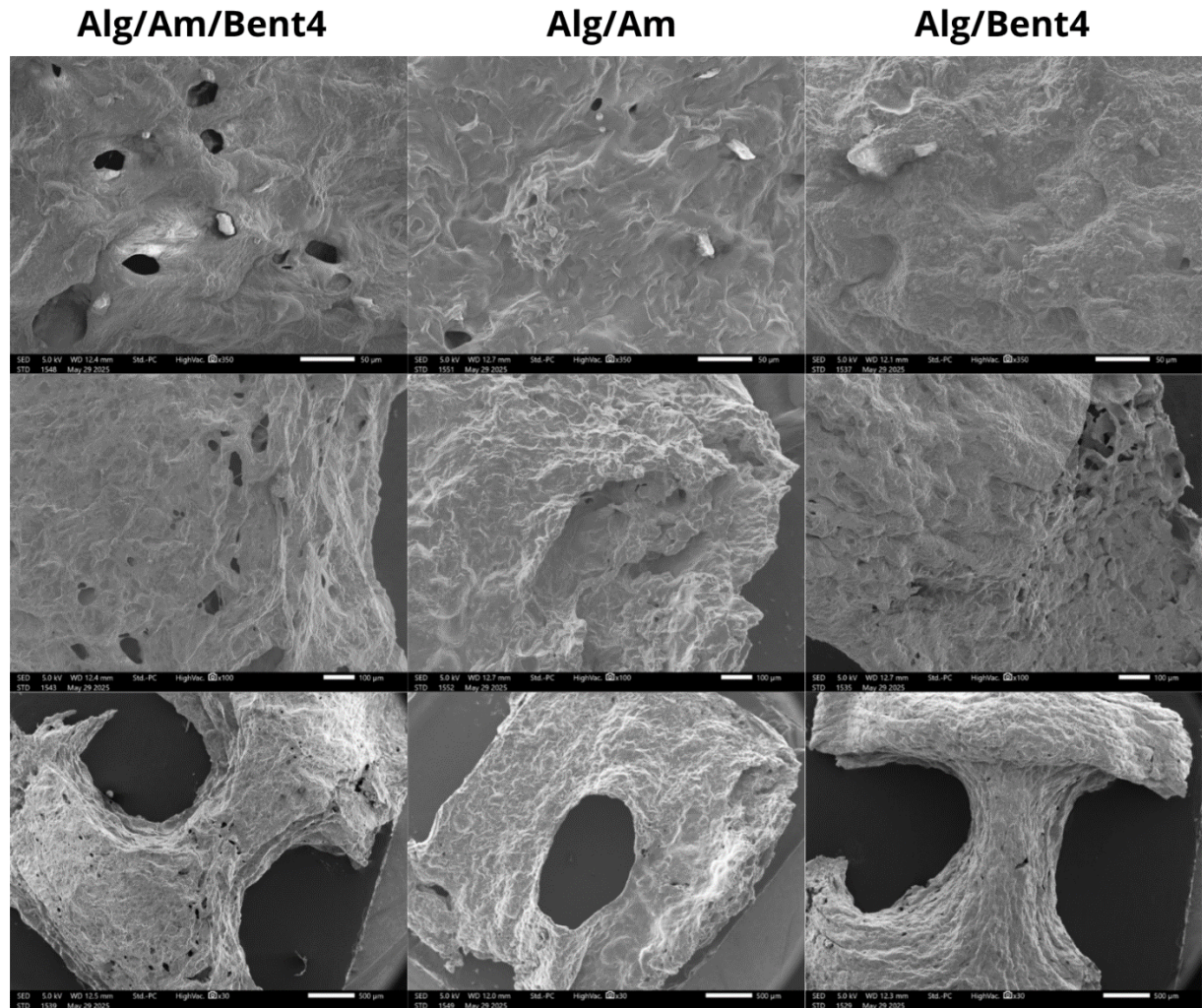
Ambos os *scaffolds* contendo Bent (Alg/Am/Bent4 e Alg/Bent4) apresentaram uma maior rugosidade superficial, comparados com Alg/Am. Essa rugosidade se dá pela presença das lamelas de Mt na superfície (Sreekanth Reddy *et al.*, 2021). Ao se tratar de engenharia tecidual, uma superfície rugosa é benéfica pois auxilia o processo de adesão celular influenciando positivamente a proliferação celular devido ao aumento na área específica para interação (Calore *et al.*, 2023).

Nos *scaffolds* de Alg/Bent4, é possível observar aglomerados de Bent, indicando que apenas a adição do alginato não foi suficiente para garantir uma boa dispersão das partículas. Nos *scaffolds* Alg/Am, é possível perceber a presença de alguns grânulos na superfície. Esse fenômeno surge quando grânulos de amido não se desintegram completamente durante o processo de solubilização, eventualmente entrando em um processo de reticulação com as cadeias poliméricas do amido. Esse processo confere uma maior estabilidade mecânica e elasticidade ao amido (Lozano-Vazquez *et al.*, 2021)

A presença de amido tornou a superfície dos *scaffolds* mais homogênea, sendo o *scaffold* Alg/Am o mais homogêneo de todos. Esse resultado está de acordo com a literatura. Bom *et al.* (2020) produziram *scaffolds* de alginato e a adição do amido resultou em uma superfície mais coesa. A interação do cloreto de cálcio com

a água também demonstrou ter um efeito plastificante sobre o amido em estudos conduzidos por Wang *et al.*(2022) aumentando a homogeneidade do *scaffold*.

Figura 31- Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* produzidos (Alg/Am/Bent4, Alg/Am e Alg/Bent4), após 2 h de reticulação com CaCl_2 .



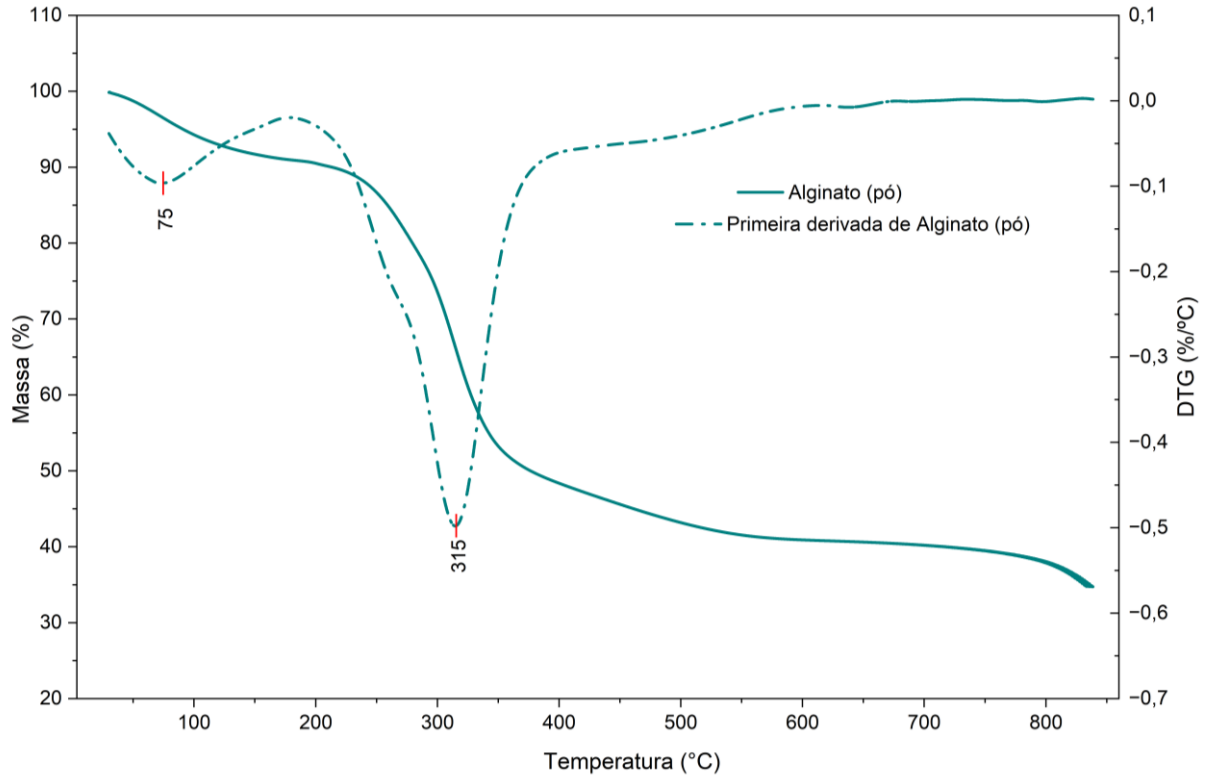
Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Caracterização térmica

O processo de degradação térmica do alginato (Figura 32) apresentou dois estágios distintos, que foram confirmados mediante o gráfico da derivada da curva de perda de massa. O primeiro estágio inicia-se junto ao início do ensaio termogravimétrico (Tabela 2), e pode ser atribuído principalmente à evaporação de água (Marangoni Júnior *et al.*, 2021). A temperatura máxima de degradação nesse estágio pode ser extraída do pico da derivada, sendo 75 °C, e a temperatura final

estimada é 167 °C. Nessa fase ocorreu uma perda de 9% da massa total do alginato, atribuída à evaporação da umidade absorvida do ambiente.

Figura 32 - Curvas de TGA e DTG do alginato.



Fonte: Autoria própria.

O segundo estágio ocorre entre as temperaturas de 213 °C e 394 °C, e é onde ocorre a perda de massa mais significativa, correspondendo a 42% da massa total. Ao final do segundo estágio, restaram apenas 48% da massa inicial. Essa perda é atribuída à decomposição das cadeias carbônicas do alginato, formando carbonato de sódio (Na_2CO_3) (Fernandes *et al.*, 2018).

Marangoni Júnior *et al.* (2021) produziram filmes de alginato plastificado com glicerol e analisaram a sua perda de massa em uma atmosfera de nitrogênio com uma taxa de aquecimento 20 °C /min. Os resultados encontrados foram semelhantes aos aqui expostos, em que dois picos derivativos distintos estão presentes, apresentando temperatura de degradação máxima 87 °C e 226 °C. As divergências podem ser atribuídas à presença do plastificante, à variação na composição do alginato e à diferença no processamento dos materiais.

Os resultados aqui apresentados divergem dos encontrados por Santos Araújo *et al.* (2019) e Fernandes *et al.* (2018), em que foram encontrados três

eventos térmicos na curva de degradação do alginato, utilizando ar sintético e nitrogênio respectivamente, e diferentes taxas de aquecimento (10 °C/min e 50°C/min no primeiro, e 10 °C/min no segundo). Os primeiros dois estágios correspondem aos aqui encontrados. O terceiro estágio observado nos trabalhos citados é atribuído à queima do Na₂CO₃, e foi localizado entre 600 e 700 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e entre 700 e 900°C a uma taxa de aquecimento de 50 °C/min. A divergência encontrada pode ser atribuída às diferentes atmosferas utilizadas, já que a degradação Na₂CO₃ é dependente da atmosfera (Soares *et al.*, 2004).

Tabela 2 – Temperaturas características de degradação do alginato e do amido (Ti representa a temperatura inicial, Td a temperatura de máxima taxa de degradação (pico da DTG), e Tf a temperatura final).

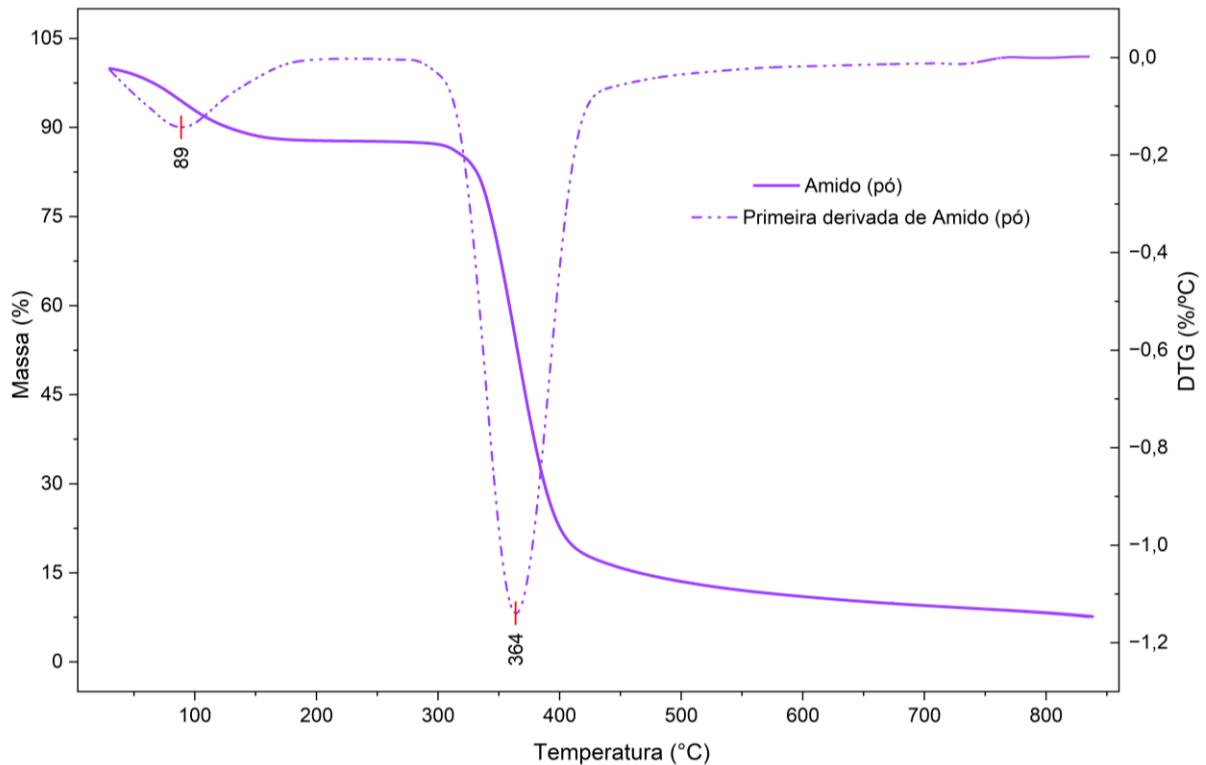
	1º estágio				2º estágio			
	Ti (°C)	Td (°C)	Tf (°C)	Perda (%)	Ti (°C)	Td (°C)	Tf (°C)	Perda (%)
Alginato	30	75	167	9	213	315	394	41
Amido	30	89	142	13	285	364	444	71

Fonte: Autoria própria.

A degradação do amido (Figura 33) ocorre de uma maneira semelhante ao alginato com dois eventos térmicos distintos. O primeiro evento tem seu pico de degradação a 89 °C estendendo-se até 142 °C, onde ocorre a evaporação da água e a degradação de componentes voláteis (Rosário *et al.*, 2025), correspondendo a uma perda de 9% da massa total nesse estágio. O segundo evento ocorreu aproximadamente entre 285 °C e 444°C, com uma taxa máxima de degradação em 364 °C, sendo responsável pela perda de 71% da massa total e correspondente à degradação térmica das cadeias do polissacarídeo (Rahman *et al.*, 2025).

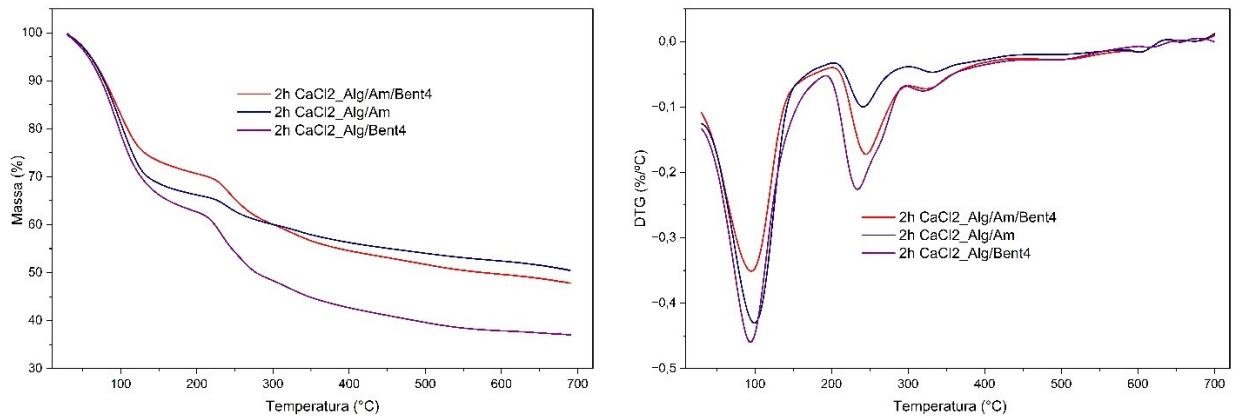
Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura. Araújo *et al.* (2025) extraíram amido do caroço da manga e obtiveram um pico de degradação do polímero em 311 °C. Rosário *et al.* (2025) extraíram amido da pupunha branca e encontraram uma Td de 325 °C. Por fim, Chenet *et al.* (2021) compararam os valores obtidos de amido extraído de milho e de mandioca e obtiveram valores de Td de 316 °C e 319 °C, respectivamente.

Figura 33 – Curvas de TGA e DTG do amido.



No final do processo, em 900 °C, restaram 27% da massa no caso do alginato e aproximadamente 6% da massa total do amido. No processo de degradação do amido utilizando gás inerte, os grupos hidroxila interagem entre si formando H₂, CO₂ e CH₄. A formação desses compostos resulta numa menor porcentagem de resíduo. Como a amilopectina possui mais grupos hidroxila, o amido formado por uma maior quantidade de amilopectina possui uma menor porcentagem residual. Chen *et al.* (2021) compararam os resíduos de milho e mandioca a 700 °C, 15,60% e 13,80%, respectivamente, para 77% e 83% de amilopectina. O resultado aqui encontrado, com uma quantidade de amilopectina similar (76,5% neste trabalho), indicou uma perda de massa 9,5% em 700 °C.

Os *scaffolds* produzidos (Figura 34) apresentaram dois estágios de degradação distintos. A composição Alg/Am/Bent4 foi a que apresentou o menor percentual de perda de massa na primeira etapa, perdendo 26% da sua massa total. Já as formulações Alg/Am e Alg/Bent4 perderam 30% e 35% da sua massa total no primeiro estágio, respectivamente (Tabela 3).

Figura 34 – Curvas de TGA e DTG dos *scaffolds* produzidos.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 – Temperaturas características de degradação dos *scaffolds* produzidos (Ti representa a temperatura inicial, Td a temperatura de máxima taxa de degradação (pico da DTG), e Tf a temperatura final).

	1º Fase				2º Fase			
	Ti (°C)	Td (°C)	Tf (°C)	Perda (%)	Ti (°C)	Td (°C)	Tf (°C)	Perda (%)
Alg/Am/Bent4	30	93	141	27	204	248	293	10
Alg/Am	30	99	145	31	206	241	291	10
Alg/Bent4	30	95	159	35	193	234	293	14

Fonte: Autoria própria.

Durante a segunda etapa, o *scaffold* Alg/Bent4 teve a menor temperatura de degradação (Td = 234 °C) em comparação com Alg/Am (Td = 241°C) e Alg/Am/Bent4 (Td = 248 °C). A adição de amido, que degrada em temperaturas mais elevadas, foi mais eficaz para modificar a temperatura onde ocorre a máxima taxa de degradação dos *scaffolds* do que a adição de Bent.

O impacto superior em reduzir a degradação térmica que o amido teve nos *scaffolds* foi inesperado, já que a adição de Bent é conhecida por melhorar a estabilidade térmica. As camadas dispersas de Mt interagem com as cadeias poliméricas, as protegendo e reduzindo sua mobilidade, evitando a expansão térmica. A presença de aglomerados de argila nas amostras pode ter influenciado este comportamento. Zhu *et al.* (2019) e Mishra *et al.* (2014) adicionaram Mt a filmes de metilcelulose e alginato, e observaram que a adição de Mt atrasou de maneira significativa a degradação térmica dos filmes. Este efeito térmico se estende ao

amido. Cyras *et al.* (2008) produziram filmes de amido e Mt utilizando glicerol, e a presença de Mt melhorou as propriedades térmicas do filme em 25 °C.

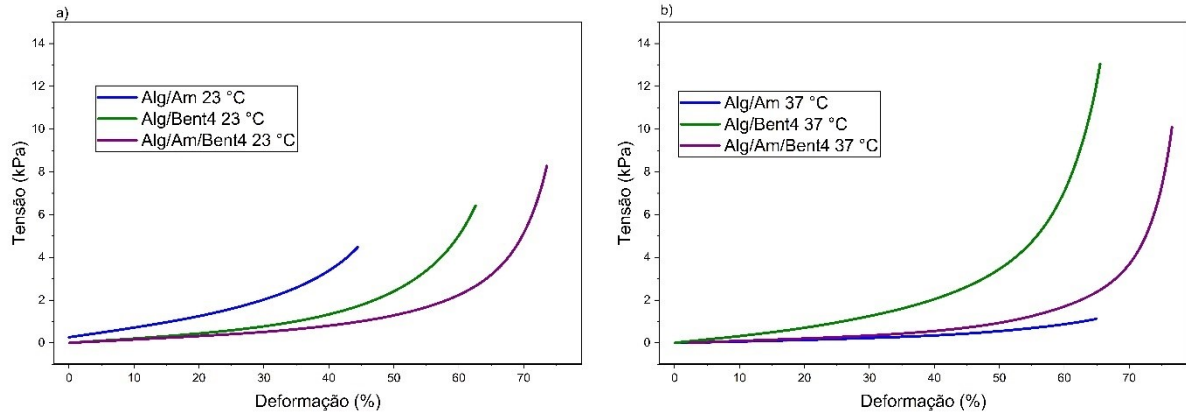
Siddaramaiah *et al.* (2008) produziram blendas de alginato e amido. Até 200 °C, a blenda sem amido apresentou uma taxa de degradação menor. Entre 200 °C e 250 °C, a blenda de alginato apresentou 65% de degradação, enquanto as blendas com diversas quantidades de amido apresentaram entre 49% e 57%. Weerapoprasit e Prachayawarakorn (2016) prepararam filmes de amido com alginato utilizando glicerol, com a presença do alginato diminuindo a temperatura máxima de degradação encontrada na segunda fase.

5.3.3 Ensaio de compressão mecânica

O tecido ósseo está sujeito a diversas cargas mecânicas e espera-se que o *scaffold* implantado tenha resistência mecânica parecida para conseguir suportá-las. O osso compacto tem uma força compressiva que varia entre 100 e 230 MPa. Já o osso esponjoso, devido a sua estrutura porosa, tem uma força compressiva que varia entre 2 e 12 MPa. Materiais poliméricos são vantajosos pois tem um comportamento viscoelástico similar ao do osso dentro do corpo humano a 37 °C, mas geralmente possuem propriedades mecânicas inadequadas (Bakhtiari *et al.*, 2023).

À temperatura ambiente (23 °C), a composição que demonstrou maior resistência à compressão foi Alg/Am/Bent4 (Figura 35a), atingindo 8,3 kPa e 73,5% de deformação. Já os *scaffolds* Alg/Am e Alg/Bent4 apresentaram valores de 4,2 kPa e 6,4 kPa, com uma menor deformação, igual a 44,5% e 62,6%, respectivamente. Esse resultado indica que a presença de Bent possibilita uma maior deformação do material juntamente com um efeito de reforço, e pode ser explicado pela interação da Mt e as cadeias poliméricas, melhorando as propriedades mecânicas do material (Zhu *et al.*, 2019). Adicionalmente, a combinação com amido melhorou ainda mais o desempenho do material. A melhoria na resistência à compressão ao adicionar amido a formulações de alginato já é conhecida na literatura. Lin *et al.* (2021) prepararam *scaffolds* de amido/alginato e perceberam um aumento no módulo e na resistência à compressão à medida que aumentaram o teor de amido na mistura.

Figura 35 – Curvas de tensão versus deformação obtidas pelo ensaio de compressão.



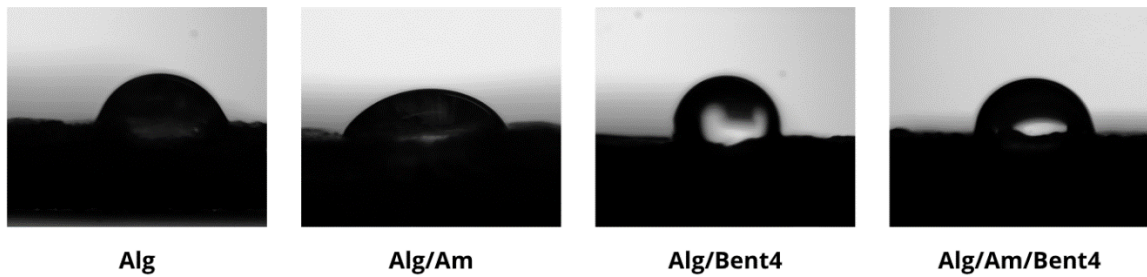
Fonte: Autoria própria.

Ao aumentar a temperatura para 37 °C (escolhida para simular a temperatura corporal), o *scaffold* Alg/Bent4 aumentou a sua resistência à compressão (Figura 35b), chegando próximo ao limite da análise e mantendo o mesmo nível de deformação, enquanto que a amostra sem Bent apresentou um comportamento oposto. Com o aumento da temperatura, o *scaffold* Alg/Am exibiu um amolecimento, com um decréscimo de sua resistência à compressão para 1,1 kPa e um aumento de sua deformação para 65%. Estes resultados indicam que a presença das nanopartículas de Mt atuam reforçando a estrutura polimérica e impedindo um escoamento a nível molecular das cadeias em maiores temperaturas.

5.3.4 Ângulo de contato com a água

A morfologia das gotas de água após entrarem em contato com os filmes estão representadas na Figura 36. Ângulos de contato maiores de 90° significam que a superfície é hidrofóbica, enquanto que para ângulos menores de 90° são consideradas hidrofílicas, e em ângulos menores de 5°, super hidrofílicas (Zhu; Goh; Shrestha, 2021). Todos os ângulos de contato mensurados obtiveram resultados entre 44° e 71°, sendo considerados hidrofílicos (Tabela 4). Tradicionalmente, *scaffolds* hidrofílicos são preferíveis pois promovem um ambiente propício para adesão celular (Boyan; Lotz; Schwartz, 2017).

Figura 36 – Morfologia das gotas de água após entrarem em contato com os filmes.



Fonte: Autoria própria.

É possível notar visualmente que a formulação Alg/Am obteve um maior espalhamento, o que foi confirmado ao medir o ângulo de contato, possuindo uma média de $44,5^\circ$, a menor obtida. Portanto, a adição de amido ao alginato resultou numa maior hidrofiliabilidade. Já a adição de Bent teve o efeito contrário, com as soluções Alg/Bent4 e Alg/Am/Bent4 apresentando os maiores valores de ângulo de contato dentre os medidos.

Tabela 4 – Ângulo de contato dos filmes.

Amostra	Ângulo de contato ($^\circ$)
Alg	$54,6 \pm 4,9$
Alg/Am	$44,5 \pm 14,4$
Alg/Bent4	$70,1 \pm 10,5$
Alg/Am/Bent4	$68,1 \pm 3,4$

Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, *scaffolds* produzidos com a combinação entre alginato, amido e nanopartículas da argila bentonita foram obtidos com sucesso. A análise das soluções indicou que o aumento do teor de Bent na solução resultou numa diminuição do diâmetro filamentar e no espalhamento, sendo possível a impressão de *scaffolds* com 20 camadas com um alto grau de fidelidade aparente ao modelo computacional quando utilizado 4% em massa.

A análise de FTIR demonstrou um processo de reticulação dependente da difusão, não sendo observadas diferenças nas bandas características da reticulação após 15 min. No entanto, o ensaio em fluido corporal simulado demonstrou que o aumento do tempo de reticulação com CaCl_2 influencia na taxa de degradação, sendo alcançado um tempo ótimo de 2 h para a formulação Alg/Am/Bent4. Os ensaios de degradação também demonstraram que a adição de amido a *scaffolds* de alginato reticulado com cloreto de cálcio tornam o processo de biodegradação mais uniforme. A interação amido e CaCl_2 pode ser positiva ao *scaffold* devido a suas interações físicas e iônicas, mas tempo demasiados de reticulação podem causar o efeito reverso, causando rachaduras na superfície, como as visualizadas nas imagens de microscopia. Os resultados do teste de degradação também indicaram uma possível interação benéfica entre amido e cloreto de ferro III, a qual necessita investigações adicionais.

Foi possível observar nas imagens de MEV que todos os *scaffolds* possuíram uma estrutura rugosa e porosa, o que é favorável para a aplicação proposta. Nos ensaios termogravimétricos, a adição de amido teve um maior efeito em desacelerar a degradação térmica do que a adição de Bent, demonstrando um efeito positivo da interação alginato/amido e cloreto de cálcio. A adição de Bent, por sua vez, proporcionou um melhor desempenho mecânico dos materiais, mostrando-se benéfica em melhorar a resistência à compressão a 37 °C, temperatura onde o *scaffold* seria utilizado. Embora ainda não se tenha atingido os valores desejáveis de propriedades mecânicas para aplicação na regeneração óssea, estes resultados trazem elementos importantes para o aperfeiçoamento do processo de produção dos *scaffolds*. Uma possibilidade seria a adição de polímeros sintéticos ao *scaffold*, já que esses normalmente possuem propriedades mecânicas superiores. Outra possibilidade seria revisar a geometria dos *scaffolds*, com diferentes ângulos,

tamanho e quantidade de poros, o que também pode influenciar na resistência à compressão.

Por fim, a continuidade dos estudos utilizando o cloreto de ferro III como agente reticulante é opção viável, já que o mecanismo de reticulação pode resultar em *scaffolds* com uma maior rigidez do que os reticulados com cloreto de cálcio. Os ensaios realizados com FeCl_3 demonstraram-se promissores. A pouca diferença do diâmetro dos filamentos antes e após o processo de reticulação indica a possibilidade de obter *scaffolds* altamente fidedignos e com grande estabilidade, evidenciada nos ensaios de degradação.

REFERÊNCIAS

- ABUSHAMA, Azza A. *et al.* Comparison of xenograft and allograft bone graft for oral and maxillofacial surgical preparation prior to dental implantation: A systematic review. **F1000Research**, v. 14, p. 718., jul.2025,
- AHMED, Jasim *et al.* **Starch-Based Polymeric Materials and Nanocomposites**, New York: CRC Press 2012. E-Book
- ALEXA, Rebeca Leu *et al.* Assessment of naturally sourced mineral clays for the 3d printing of biopolymer-based nanocomposite inks. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, p. 1–22, 2021.
- ALEXANDRE, Michael; DUBOIS, Philippe. Polymer-Layered Silicate Nanocomposites: Preparation, Properties and Uses of a New Class of Materials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 28, n. 1–2, p. 1–63, jun. 2000.
- ALLEN, Matthew R. *et al.* Basic Bone Biology. **Bone tissue engineer: Bench to bedside using 3D Printing**. Springer Nature, 2021. E-Book
- ARAÚJO, Aline F.O. *et al.* Films based on cellulose and starch obtained from agro-industrial residues. **Next Materials**, v. 8, p. 100816, Jun. 2025.
- ARAÚJO, Patrícia dos Santos *et al.* *Thermal degradation of calcium and sodium alginate: A greener synthesis towards calcium oxide micro/nanoparticles.* **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 749–760, Nov.2019.
- ASL, Maryam *et al.* Polyhydroxybutyrate-starch/carbon nanotube electrospun nanocomposite: A highly potential scaffold for bone tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 223, p. 524–542, Dez. 2022.
- BAEK, Miri; LEE, Jeong A.; CHOI, Soo Jin. Toxicological effects of a cationic clay, montmorillonite in vitro and in vivo. **Molecular and Cellular Toxicology**, v. 8, n.1, p. 95–101, 2012.
- BAKHTIARI, Hamed *et al.* Fatigue behaviour of load-bearing polymeric bone scaffolds: A review. **Acta Biomaterialia**, v. 172, p. 16–37, 2023.
- BARROS, Serafim Garcia *et al.* **Perfil de internações por fraturas ósseas pelo SUS no Brasil no período de 2012-2022 : um estudo ecológico.** Tese (Graduação em medicina) - Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça. 2023.
- BOM, Sara *et al.* Effects of starch incorporation on the physicochemical properties and release kinetics of alginate-based 3D hydrogel patches for topical delivery. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 1–20, 2020.
- BOYAN, Barbara D.; LOTZ, Ethan M.; SCHWARTZ, Zvi. Roughness and

hydrophilicity as osteogenic biomimetic surface properties. **Tissue Engineering - Part A**, v. 23, n. 23–24, p. 1479–1489, 2017.

BRUS, Jiri *et al.* Structure and Dynamics of Alginate Gels Cross-Linked by Polyvalent Ions Probed via Solid State NMR Spectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 8, p. 2478–2488, 2017.

BUDHARAJU, Harshavardhan; SUNDARAMURTHI, Dhakshinamoorthy; SETHURAMAN, Swaminathan. Efficient dual crosslinking of protein–in–polysaccharide bioink for biofabrication of cardiac tissue constructs. **Biomaterials Advances**, v. 152, p. 213486, Jan.2023.

CALORE, Andrea Roberto *et al.* Manufacturing of scaffolds with interconnected internal open porosity and surface roughness. **Acta Biomaterialia**, v. 156, p. 158–176, Jan.2023.

CHEN, Xiaojian *et al.* Physicochemical properties comparative analysis of corn starch and cassava starch, and comparative analysis as adhesive. **Journal of Renewable Materials**, v. 9, n. 5, p. 789–992, 2021.

CHEN, Yan; ZHOU, Yingge; WANG, Chi. Investigation of Collagen-Incorporated Sodium Alginate Bioprinting Hydrogel for Tissue Engineering. **Journal of Composites Science**, v. 6, n. 8, 2022.

CHUANG, Lillian *et al.* Calcium chloride effects on the glass transition of condensed systems of potato starch. **Food Chemistry**, v. 199, p. 791–798, 2016.

CYRAS, Viviana P. *et al.* Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 1, p. 55–63, 2008.

DATTA, Sudipto; *et al.* Alginate-honey bioinks with improved cell responses for applications as bioprinted tissue engineered constructs. **Journal of Materials Research**, v. 33, n. 14, p. 2029–2039, 2018.

DÁVILA, José Luis *et al.* A parameterized g-code compiler for scaffolds 3D bioprinting. **Bioprinting**, v. 27, n. Mar.2022.

DENARDIN, Cristiane Casagrande; SILVA, Leila Picolli da. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 945–954, 2009.

ECFR:: 40 CFR 180.930 - INERT INGREDIENTS APPLIED TO ANIMALS; EXEMPTIONS FROM THE REQUIREMENT OF A TOLERANCE. Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-E/part-180/subpart-D/section-180.930>. Acesso em: 21 Jan. 2024.

ELKHOURY, Kamil; ZUAZOLA, Julio; VIJAYAVENKATARAMAN, Sanjairaj. Bioprinting the future using light: A review on photocrosslinking reactions, photoreactive groups, and photoinitiators. **SLAS Technology**, v. 28, n. 3, p. 142–

151, 2023.

FENG, Wenjun; WANG, Zhengke. Tailoring the Swelling-Shrinkable Behavior of Hydrogels for Biomedical Applications. **Advanced Science**, v. 10, n. 28, p. 1–41, 2023.

FENG, Xu. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. **Current chemical biology**, v. 3, n. 2, p. 189, Maio.2009.

FERNANDES, Renan *et al.* Thermal, microstructural, and spectroscopic analysis of Ca²⁺ alginate/clay nanocomposite hydrogel beads. **Journal of Molecular Liquids**, v. 265, p. 327–336, 2018.

FREEMAN, Fiona E.; KELLY, Daniel J. Tuning alginate bioink stiffness and composition for controlled growth factor delivery and to spatially direct MSC Fate within bioprinted tissues. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

FU, Zhouquan *et al.* Printability in extrusion bioprinting. **Biofabrication**, v. 13, n. 3, p. 033001, 2021.

GAO, Qiqi; KIM, Byoung Soo; GAO, Ge. Advanced Strategies for 3D Bioprinting of Tissue and Organs Analogs Using Alginate Hydrogel Bioinks. **Marine Drugs**, v. 19, n. 12, p. 708, Dez.2021.

GARCIA-CRUZ, Crispin Humberto; FOGGETTI, Ulisses. Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800–1806, 2008.

GARCÍA-VILLÉN *et al.* Clay minerals as bioink ingredients for 3d printing and 3d bioprinting: Application in tissue engineering and regenerative medicine. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1806, out.2021.

GARCÍA, Gabriel *et al.* Electrospun scaffolds based on a PCL/starch blend reinforced with CaO nanoparticles for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 273, p. 132891, Maio.2024

GLEADALL, Andrew *et al.* Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. **Burns & Trauma**, v. 6, n.19, p. 1–16, Jul.2018.

HABIB, Ahasan; KHODA, Bashir. Development of clay based novel hybrid bio-ink for 3D bio-printing process. **Journal of Manufacturing Processes**, v. 38, p. 846-856 , 2019.

JAFARI, Arman *et al.* Latest Advances in 3D Bioprinting of Cardiac Tissues. **Advanced Materials Technologies**, v. 7, n. 11, p. 1–24, 2022.

JAYRAJSINH, Sarvaiya *et al.* Montmorillonite nanoclay as a multifaceted drug-delivery carrier: A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 200–209, 2017.

JOVIC, Thomas H. *et al.* Plant-Derived Biomaterials: A Review of 3D Bioprinting and Biomedical Applications. **Frontiers in Mechanical Engineering**, v. 5, p. 1–18, Abr.2019.

JUSOH, Wan Nazihah Liyana Wan *et al.* Recent Advances in 3D Bioprinting: A Review of Cellulose-Based Biomaterials Ink. **Polymers**, v. 14, n. 11, p. 1–25, 2022.

KABDRAKHMANOVA, Sana K., *et al.* Bentonite-Based Composites in Medicine: Synthesis, Characterization, and Applications. **Journal of Composites Science**, v. 9, n. 6, p. 310, jun.2025.

KALHORI, Dianoosh *et al.* Cardiovascular 3D bioprinting: A review on cardiac tissue development. **Bioprinting**, v. 28, p. e00221, Mar.2022.

KIM, Gyeong-ji *et al.* Effect of Nano-Montmorillonite on Osteoblast Differentiation, Mineral Density, and Osteoclast Differentiation in Bone Formation. **Nanomaterials**, v.10, n. 2, p. 1–22, 2020.

KNOWLTON, Stephanie *et al.* Bioprinting for cancer research. **Trends in Biotechnology**, v. 33, p. 504–513, Jul.2015.

KOSKI, Caitlin; BOSE, Susmita. Effects of amylose content on the mechanical properties of starch-hydroxyapatite 3D printed bone scaffolds. **Additive Manufacturing**, v. 30, p. 100817, dez. 2019.

LEE, Jung Bok *et al.* Development of 3D Microvascular Networks Within Gelatin Hydrogels Using Thermoresponsive Sacrificial Microfibers. **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 7, p. 781–785, 2016.

LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012.

LEE, Kuen Yong; YUK, Soon Hong. Polymeric protein delivery systems. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 7, p. 669–697, Jul. 2007.

LEE, Yuan Haun *et al.* Toxicity assessment of montmorillonite as a drug carrier for pharmaceutical applications: Yeast and rats model. **Biomedical Engineering - Applications, Basis and Communications**, v. 17, n. 2, p. 72–78, 2005.

LI, Dongying *et al.* Progress in Montmorillonite Functionalized Artificial Bone Scaffolds: Intercalation and Interlocking, Nanoenhancement, and Controlled Drug Release. **Journal of Nanomaterials**, v. 2022, n. 1, p. 7900382, jan.2022.

LI, Jiwei *et al.* A new insight to the effect of calcium concentration on gelation process and physical properties of alginate films. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 12, p. 5791–5801, 2016.

LIN, Che Wei *et al.* An environmental friendly tapioca starch-alginate cultured scaffold as biomimetic muscle tissue. **Polymers**, v. 13, n. 17, 2021.

LIU, Yuxin *et al.* Preparation of double cross-linked starch/CaCl₂/PVA conductive hydrogel for flexible solid-state supercapacitor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 320, p. 145908, Jun.2025.

LOZANO-VAZQUEZ, Gustavo *et al.* Characterization of Corn Starch-Calcium Alginate Xerogels by Microscopy, Thermal, XRD, and FTIR Analyses. **Starch/Staerke**, v. 73, n. 7–8, 2021.

MADRID, Ana Paula M. *et al.* Advances in additive manufacturing for bone tissue engineering scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 100, p. 631–644, Jul. 2019.

MALEKTAJ, Haniyeh; DROZDOV, Aleksey D.; CHRISTIANSEN, Jesper D. Mechanical Properties of Alginate Hydrogels Cross-Linked with Multivalent Cations. **Polymers**, v. 15, n. 14, 2023.

MARANGONI JÚNIOR, Luís *et al.* Sustainable Packaging Films Composed of Sodium Alginate and Hydrolyzed Collagen: Preparation and Characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 12, p. 2336–2346, 2021.

MASSANA, Daniel. Iron(iii)-cross-linked alginate hydrogels: A critical review. **Materials Advances**, v. 3, n. 4, p. 1849–1873, 2022.

MISHRA, R. K. *et al.* Antimicrobial and in vitro wound healing properties of novel clay based bionanocomposite films. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 8, p. 1925–1939, 2014.

MURAB, Sumit *et al.* Alginate based hydrogel inks for 3D bioprinting of engineered orthopedic tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 296, p. 119964, Nov.2022.

O'CONNELL, Cathal *et al.* Characterizing Biinks for Extrusion Bioprinting: Printability and Rheology. **Methods in Molecular Biology**, v. 2140, p. 111–133, 2020.

OLAD, Ali *et al.* Graphene oxide and montmorillonite enriched natural polymeric scaffold for bone tissue engineering. **Ceramics International**, v. 45, n. 12, p. 15609–15619, Agos. 2019.

ONG, Chin *et al.* Creation of cardiac tissue exhibiting mechanical integration of spheroids using 3D bioprinting. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 125, p. 2–6, 2017.

PARK, Ju Hwan; *et al.* Application of montmorillonite in bentonite as a pharmaceutical excipient in drug delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 46, n. 4, p. 363–375, 2016.

PATEL, Mitulkumar A. *et al.* The effect of ionotropic gelation residence time on alginate cross-linking and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 155, p. 362–371, 2017.

QIAN, Lei; ZHANG, Haifei. Controlled freezing and freeze drying: A versatile route for porous and micro-/nano-structured materials. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, n. 2, p. 172–184, 2011.

RAHMAN, Sazzadur *et al.* Sodium Alginate-chitosan-starch based glue formulation for sealing biopolymer films. **Next Materials**, v. 7, p. 100507, Jan.2025.

ROBYT, John F. Starch: Structure, Properties, Chemistry, and Enzymology. Inc BERTRAM, O. Fraser-Reid *et al* (org) : **Glycoscience**, Berlim: Springer, 2008. p. 1437–1472

RONG, Liyuan *et al.* The application of 3D printing technology on starch-based product: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 134, p. 149–161, Abr.2023.

ROSÁRIO, Rosely Carvalho *et al.* Novel low-amylose starch from white variety of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) fruit– nutritional, functional and pasting properties. **Lwt**, v. 218, p. 117531, Fev.2025.

ROSLAN, M. Riza *et al.* Engineering scaffold based on starch: A review. **International Conference on Electrical, Electronics, and Optimization Techniques, ICEEOT 2016** , p. 1857–1860, 2016.

SALGADO; A.J *et al.* Novel Starch-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Cytotoxicity, Cell Culture, and Protein Expression, **Tissue Engineering**, v. 10, n. 3, mar.2004. .

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, Raúl *et al.* Relationship between shear-thinning rheological properties of bioinks and bioprinting parameters. **International Journal of Bioprinting**, v. 9, n. 2, p. 422–431, fev.2023.

SANGKERT, Supaporn *et al.* 3D printed scaffolds of alginate/polyvinylalcohol with silk fibroin based on mimicked extracellular matrix for bone tissue engineering in maxillofacial surgery. **Materials Today Communications**, v. 26, p. 102140, set.2021

SCHWAB, Andrea *et al.* Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. **Chemical Reviews**, v. 120, n. 19, p. 11028–11055, 2020.

SILVA, A. R.; FERREIRA, H.C. Argilas bentoníticas: Conceitos, estruturas, propriedades, usos industriais, reservas, produção e produtores/fornecedores nacionais e internacionais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v. 3, n. 2, 2008.

SILVA, João *et al.* Metal alginates for polyphenol delivery systems: Studies on crosslinking ions and easy-to-use patches for release of protective flavonoids in skin. **Bioactive Materials**, v. 5, n. 3, p. 447–457, 2020.

SINGARAM, Sevani; NAIDOO, Mergan. The physical, psychological and social impact of long bone fractures on adults: A review. **African Journal of Primary**

Health Care and Family Medicine, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2019.

SOARES, J. P *et al.* Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. **Ecletica Quimica**, v. 29, n. 2, p. 57–63, 2004.

SREEKANTH REDDY, O. *et al.* Curcumin encapsulated dual cross linked sodium alginate/montmorillonite polymeric composite beads for controlled drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 11, n. 2, p. 191–199, 2021.

TANIGUCHI, Mariana Harue N. *et al.* Crosslinked alginate-xanthan gum blends as effective hydrogels for 3D bioprinting of biological tissues. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 28, p. 1–15, 2022.

TIAN, Shuyu; ZHAO, Hong; LEWINSKI, Nastassja. Key parameters and applications of extrusion-based bioprinting. **Bioprinting**, v. 23, p. e00156, Mar.2021.

VENTURA, Reiza Dolendo. An Overview of Laser-assisted Bioprinting (LAB) in Tissue Engineering Applications. **Medical Lasers**, v. 10, n. 2, p. 76–81, 2021.

VISAKH, P. M, *et al.* Starch-Based Bionanocomposites: Processing and Properties. In: YOUSSEF, Habibi, LUCIAN, A. Lucia (org.). **Polysaccharide Building Blocks: A Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials**. p. 287–306, 2012

WALSH, William R. *et al.* Does implantation site influence bone ingrowth into 3D-printed porous implants?. **Spine Journal**, v. 19, n. 11, p. 1885–1898, 2019.

WANG, Jialin *et al.* The influence of calcium chloride concentration on the mechanical and barrier properties of high amylose corn starch film. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115695, Nov.2022.

WEBB, Braeden; DOYLE, Barry J. Parameter optimization for 3D bioprinting of hydrogels. **Bioprinting**, v. 8, p. 8–12, dez.2017.

WEERAPOPASIT, Chayapa; PRACHAYAWARAKORN, Jutarat. Properties of Biodegradable Thermoplastic Cassava Starch/Sodium Alginate Composites Prepared From Injection Molding. **Polymers and Polymer Composites**, v. 16, n. 2, p. 101–113, 2016.

WITZLER, Markus *et al.* Polysaccharide-based systems for targeted stem cell differentiation and bone regeneration. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 1–26, 2019.

XU, Ke *et al.* Manipulating gelatinization, retrogradation, and hydrogel properties of potato starch through calcium chloride-controlled crosslinking and crystallization behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 357, p. 123371, jun.2025.

ZHANG, Hongcai *et al.* Insights into the interaction of CaCl₂ and potato starch: Rheological, structural and gel properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 934–941, 2022.

ZHANG, Minghui; CHEN, Hongyan. Development and characterization of starch-sodium alginate-montmorillonite biodegradable antibacterial films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 233, p. 123462, April.2023.

ZHU, Guanyin *et al.* Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds. **Bioactive Materials** v. 6, n. 11, p. 4110–4140, Nov.2021.

ZHU, Ting Ting *et al.* Exfoliation of montmorillonite and related properties of clay/polymer nanocomposites. **Applied Clay Science**, v. 169, p. 48–66, 2019.

ZHU, Yi; GOH, Cynthia; SHRESTHA, Annie. Biomaterial Properties Modulating Bone Regeneration. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, n. 4, p. 1–12, 2021.