

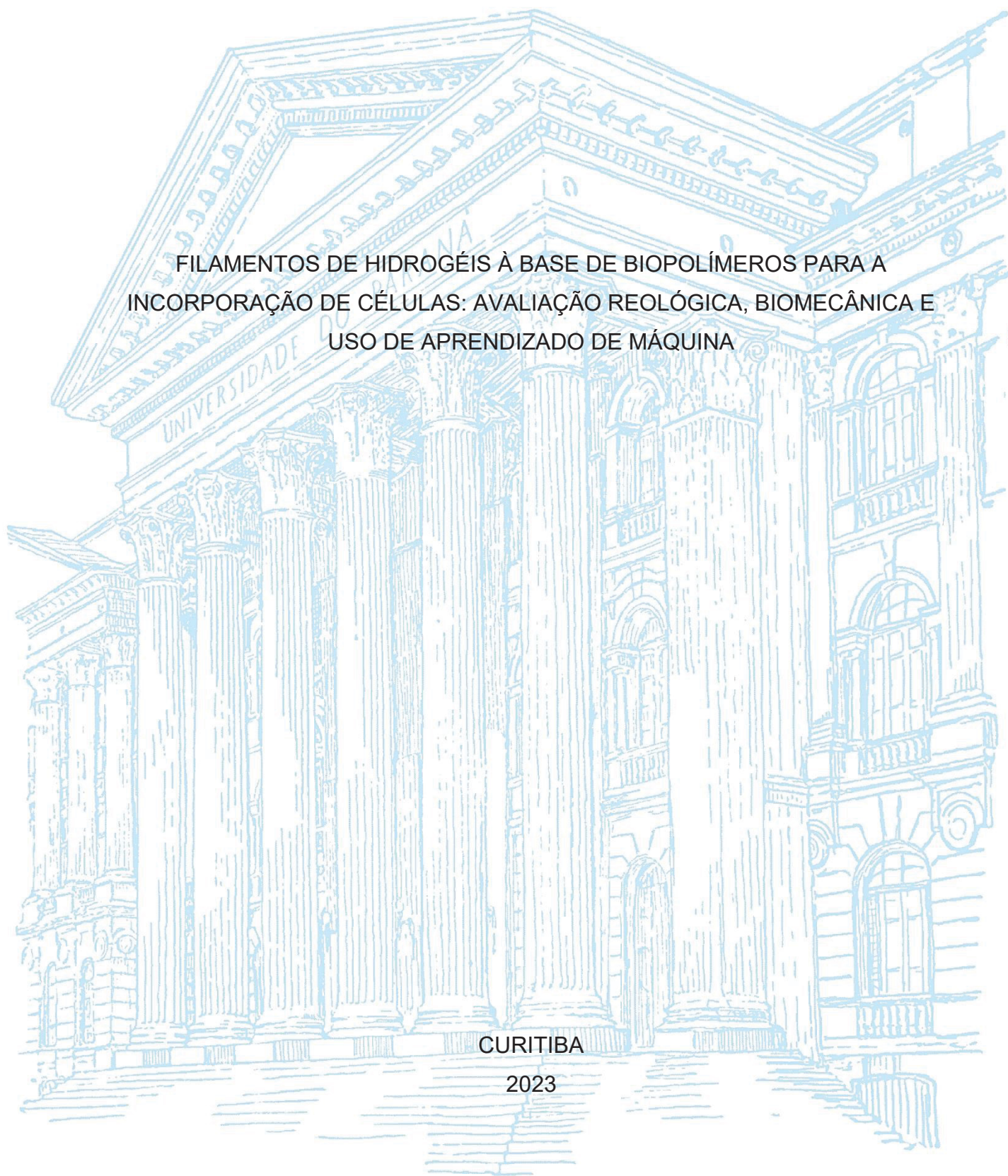
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIO DE ASSIS ARAUJO NETO

FILAMENTOS DE HIDROGÉIS À BASE DE BIOPOLÍMEROS PARA A
INCORPORAÇÃO DE CÉLULAS: AVALIAÇÃO REOLÓGICA, BIOMECÂNICA E
USO DE APRENDIZADO DE MÁQUINA

CURITIBA

2023



LUCIO DE ASSIS ARAUJO NETO

FILAMENTOS DE HIDROGÉIS À BASE DE BIOPOLÍMEROS PARA A
INCORPORAÇÃO DE CÉLULAS: AVALIAÇÃO REOLÓGICA, BIOMECÂNICA E
USO DE APRENDIZADO DE MÁQUINA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva

CURITIBA

2023

Araujo Neto, Lucio de Assis

Filamentos de hidrogéis à base de biopolímeros para a incorporação de células [recurso eletrônico]: avaliação reológica, biomecânica e uso de aprendizado de máquina / Lucio de Assis Araujo Neto – Curitiba, 2023.

1 recurso online : PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva

1. Hidrogéis. 2. Células. 3. Biopolímeros. 4. Inteligência artificial. I. Silva, Luciano Paulino da. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.1901



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LUCIO DE ASSIS ARAUJO NETO** intitulada:

FILAMENTOS DE HIDROGEIS À BASE DE BIOPOLÍMEROS PARA A INCORPORAÇÃO DE CÉLULAS: AVALIAÇÃO REOLÓGICA, BIOMECÂNICA E USO DE APRENDIZADO DE MÁQUINA, sob orientação do Prof. Dr. LUCIANO PAULINO DA SILVA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Setembro de 2023.

Assinatura Eletrônica
03/10/2023 12:56:08.0

LUCIANO PAULINO DA SILVA
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
05/10/2023 09:53:26.0

FÁBIO SEIGI MURAKAMI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
23/10/2023 12:27:54.0

ANA LUÍZA GARCIA MILLÁS MASSAGUER
Avaliador Externo (SOLUÇÕES EM BIOTECNOLOGIA 3D)

Assinatura Eletrônica
16/10/2023 10:30:16.0

VERA LUCIA PERUSSI POLEZ
Avaliador Externo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA)

Para todos aqueles que nunca sequer imaginaram que um dia conseguiriam chegar
até o fim, inclusive eu mesmo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Maria Aparecida de Oliveira Araujo e Edmundo Miranda de Araújo. Seu apoio incondicional à minha carreira acadêmica é um presente inestimável que carrego com profundo carinho. Independentemente das distâncias e desafios, eles sempre estiveram ao meu lado, encorajando-me a buscar minha formação onde fosse necessário. Desde Minas Gerais até o Distrito Federal e os meses em Curitiba, nossa jornada compartilhada moldou meu percurso acadêmico. Mesmo agora, com mais de 400 quilômetros de distância, seu amor e apoio continuam a me impulsionar. Sou imensamente grato por sua dedicação e confiança em mim, valores que carrego em cada passo da minha trajetória.

À minha família em Minas Gerais por todo o apoio incondicional que me deram durante o meu período acadêmico. Suas palavras de encorajamento e amor constante foram a força motriz por trás das minhas conquistas, e cada passo que dei em direção aos meus objetivos foi possível graças a vocês. Sou verdadeiramente abençoado por ter uma família tão incrível que sempre esteve ao meu lado, não importa a distância, e valorizo imensamente tudo o que fizeram por mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de Doutorado e pelos investimentos acadêmicos dedicados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Além disso, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio tecnológico-científico oferecido. Esses investimentos foram cruciais para a realização do meu trabalho e contribuíram significativamente para o avanço da ciência. Sou imensamente grato por essas instituições que apoiam e impulsionam o desenvolvimento acadêmico e científico no país.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo apoio técnico-científico que proporcionaram. Através desse suporte, pude contar com recursos valiosos para o avanço da minha pesquisa e para a realização de projetos significativos. Além disso, agradeço o papel crucial que desempenharam na promoção de eventos científicos, que não apenas enriqueceram o meu conhecimento, mas também contribuíram para a disseminação do saber na comunidade acadêmica. A participação nesses eventos foi uma experiência enriquecedora, e por isso sou grato às fundações pelo incentivo e oportunidades que proporcionaram.

Expresso meu sincero agradecimento à Universidade Federal do Paraná (UFPR) pelo valioso papel desempenhado em minha jornada acadêmica. A oportunidade, parceria e convênio estabelecidos com a Embrapa foram fundamentais para o progresso das minhas atividades. Através dessa colaboração, pude não apenas desenvolver minhas habilidades, mas também garantir a continuidade das atividades acadêmicas de maneira significativa.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por sua contribuição significativa em minha jornada de doutorado. Agradeço pela disponibilização da infraestrutura necessária, pelas oportunidades de participação em eventos científicos e, acima de tudo, pelo acolhimento caloroso que recebi ao longo desse período. Foi por meio dessa colaboração que pude desenvolver minhas atividades experimentais de maneira produtiva e enriquecedora. A Embrapa se mostrou um ambiente propício para o crescimento acadêmico e profissional.

Gostaria de expressar minha mais sincera gratidão à Dra. Ariane Pandolfo, à Ma. Ingrid Gracielle e à Dra. Sônia Nair Bão pelo inestimável auxílio e pelas impressionantes imagens registradas utilizando o microscópio eletrônico de varredura, do Laboratório de Microscopia e Microanálise da Universidade de Brasília. Esta colaboração foi fundamental para o sucesso deste projeto, proporcionando *insights* valiosos e dados de alta qualidade. Suas contribuições não apenas enriqueceram nossa pesquisa, mas também ampliaram nossa compreensão das complexidades em escala micro e nanométrica.

Gratidão à Dra. Tania Maria Bordin Bonfim. Seu acolhimento, ensinamentos, apoio e orientação foram essenciais durante os meses em que tive a oportunidade de realizar o estágio em docência, bem como me alocar no Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações. Além disso, agradeço por transcender o âmbito profissional, tornando-se uma amiga querida e minha mãe curitibana durante a minha estadia em Curitiba. A sua influência impactou profundamente minha jornada acadêmica e principalmente pessoal.

Minha mais profunda gratidão se estende ao João Macedo, meu psicólogo, cujo apoio foi fundamental durante esta fase final do doutorado. Sua presença significou mais do que palavras podem expressar, pois ele não apenas me ofereceu o suporte necessário, mas também me auxiliou a reencontrar a minha essência e compreender minha identidade. Através de sua orientação, tornei-me mais resiliente e confiante, redescobrando minha força interior. Além disso, ele reavivou minha paixão

pela ciência, encorajando-me a abraçar desafios e superar medos que outrora pareciam insuperáveis. Agradeço de coração por seu profissionalismo e empatia, que foram cruciais para meu crescimento pessoal e acadêmico.

Às minhas queridas amigas e colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), Alessandra Maia, Alice Vieira, Camila Letícia, Daniella Lagares, Gabriela Mendes, Tatiane de Melo, Thalita Fonseca, Victoria Baggi e em especial Beatriz Carvalho. Ao longo desses anos de convívio, vocês se tornaram uma parte essencial da minha jornada. Agradeço por suas companhias calorosas, as conversas inspiradoras, o entretenimento compartilhado e, acima de tudo, a amizade genuína que nos une. As memórias construídas dentro e fora da Embrapa tornaram esta experiência ainda mais significativa. Valorizo cada momento que compartilhamos e as conexões que criamos. Obrigado por iluminarem meu caminho com suas presenças especiais.

À Bruna Hoefling, Karoline Vieira, Mariana Gouveia, Quezia Lima e Vitória Araujo. Vocês foram verdadeiramente as melhores estagiárias com as quais tive a honra de trabalhar como supervisor no LNANO. A jornada que compartilhamos não apenas enriqueceu meu crescimento pessoal, mas também me permitiu testemunhar o talento e a dedicação de vocês enquanto as guiava durante todo o período. Obrigado por contribuírem imensamente para a equipe e por deixarem uma marca duradoura em minha jornada como cientista e como ser humano.

Aos meus amigos de coração: Patrícia Amaral, Kenzo Watanabe, Jess Rod, Ivy Garcez, Priscilla Davi, Francielly Dornelas, Stelamary Silva, Fábio Cruz, Kattiuscy Neves, Ester Araujo, Melina Marques, Marco Freitas e Rodrigo Borges. A presença de vocês em minha vida é um presente inestimável, e sou imensamente grato por tê-los ao meu lado. Cada um de vocês é uma pessoa maravilhosa e incrível, cujo apoio, amizade e carinho têm sido uma fonte constante de alegria e conforto. O valor das conexões que compartilhamos vai além das palavras, e considero-me verdadeiramente afortunado por ter amigos tão especiais. Obrigado por enriquecerem minha jornada com sua amizade e amor genuíno.

Ao Sebastian, meu fiel companheiro felino. Sua adoção não apenas trouxe alegria à minha vida, mas também um anjo protetor que me acompanha em todos os momentos. Sua presença é um presente inestimável, trazendo conforto e carinho em todas as situações. Ele é mais do que um gato; ele é o meu melhor amigo, sempre ao

meu lado, compartilhando momentos e emoções. Sou grato por ter um ser tão especial como parte da minha vida, um elo que permanecerá para sempre.

À Dra. Cíntia Caetano Bonatto. Seu notável domínio na ciência e tecnologia, aliado à sua sabedoria e perspicácia, têm sido uma fonte constante de aprendizado e inspiração. Sua dedicação em ensinar e apoiar em todos os momentos foi um farol em minha jornada acadêmica, proporcionando-me orientação inestimável. Além disso, sua trajetória brilhante se tornou uma meta de vida para mim, inspirando-me a buscar excelência em tudo o que faço. Agradeço profundamente por sua influência e por ser uma figura tão impactante em minha jornada.

E agradeço de maneira profunda e sincera gratidão que expresso meu reconhecimento ao Dr. Prof. Luciano Paulino da Silva, juntamente ao inspirador Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A minha jornada de pesquisa foi grandemente enriquecida pela crença incansável e confiança depositada. Sua orientação atenciosa e experiência inestimável moldaram meu desenvolvimento acadêmico, permitindo-me enfrentar desafios complexos e avançar no campo da nanobiotecnologia e bioengenharia. A colaboração e amizade compartilhada foram um privilégio, impulsionando meu crescimento profissional e pessoal de maneiras inestimáveis. Agradeço profundamente por essa oportunidade única e pelo apoio essencial em minha jornada de pesquisa.

*"Last but not least, I wanna thank me.
I wanna thank me for believing in me.
I wanna thank me for doing all this hard work.
I wanna thank me for having no days off.
I wanna thank me for, for never quitting.
I wanna thank me for always being a giver.
And tryna give more than I receive.
I wanna thank me for tryna do more right than wrong.
I wanna thank me for just being me at all times". (DOGG, S. 2019)*

RESUMO

Hidrogéis são materiais poliméricos com alta capacidade de retenção de água e são amplamente estudados devido às suas aplicabilidades em diversas áreas, incluindo medicina regenerativa e engenharia de tecidos. Suas propriedades mecânicas, como resistência à tração e elasticidade, são de grande importância para determinar sua viabilidade em aplicações biomédicas. A incorporação de células em hidrogéis permite criar ambientes tridimensionais propícios ao crescimento celular, a simulação de tecidos e a análise de interações celulares. Essa combinação de características torna os hidrogéis candidatos promissores para a criação de estruturas biomiméticas para regeneração de tecidos e estudos de células *in vitro*. O presente estudo avaliou a utilização de hidrogéis formulados com biopolímeros naturais, alginato de sódio e gelatina em diferentes concentrações, para confeccionar filamentos biopoliméricos resistentes à tração eletromecânica para uso como suporte celular. Os biopolímeros alginato de sódio e gelatina foram utilizados como base para os hidrogéis, assim como o cloreto de cálcio como o agente reticulante. A partir de delineamento experimental do tipo planejamento composto central, combinações entre os biopolímeros e o agente reticulante foram definidas. Utilizando a técnica de fiação úmida, foram fabricados variados filamentos que posteriormente foram avaliados mecanicamente (com e sem células) e microscopicamente (microscopia de luz, microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura). Foram encontradas sete combinações com melhores resistência à tração eletromecânica, nas quais o meio de cultivo celular *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) foi utilizado como solubilizante. Posteriormente a análise revelou variações nas propriedades de tração e nanorrugosidade dos filamentos, indicando que a modulação das concentrações desses polímeros influencia as características micro e nanomecânicas dos filamentos biopoliméricos resultantes, assim como a adição de células influencia nessas propriedades. O teste de armazenamento das formulações selecionadas evidenciou que a DMEM-10 (8,36% de alginato de sódio, 4% de gelatina e 2% de CaCl_2 – p/v – solubilizados em meio DMEM) não alterou suas propriedades de resistência em um intervalo de quatro semanas. A técnica de microscopia de luz foi fundamental para a compreensão morfológica dos materiais desenvolvidos, bem como para visualizar a organização da malha do biomaterial internamente. Pela microscopia eletrônica de varredura, utilizando a combinação DMEM-10 com e sem células OSCC-3 para a produção de filamentos, foi possível identificar estruturas externas lisas, poros íntegros e colapsados, bem como a adesão das células às redes poliméricas dos materiais testados. Ademais, o uso de inteligência artificial possibilitou classificar e prever as imagens obtidas por microscopia de luz, a partir da criação de um banco de dados, com considerável sucesso. Este estudo explorou a formulação de hidrogéis utilizando alginato de sódio e gelatina para confeccionar filamentos biopoliméricos resistentes à tração e suportar células. As combinações otimizadas (principalmente a combinação que produziu o hidrogel DMEM-10), influenciaram nas propriedades mecânicas, nanorrugosidades e as morfologias observadas pelas microscopias. A partir deste estudo, vislumbra-se um horizonte promissor na utilização de hidrogéis formulados com alginato de sódio e gelatina, especialmente na criação de estruturas biomiméticas para regeneração de tecidos e estudos de células *in vitro*.

Palavras-chave: Hidrogéis; propriedades mecânicas; celularização; biopolímeros; inteligência artificial.

ABSTRACT

Hydrogels are polymeric materials with a high-water retention capacity and are widely studied due to their applications in various fields, including regenerative medicine and tissue engineering. Their mechanical properties, such as tensile strength and elasticity, are of great importance in determining their viability in biomedical applications. The incorporation of cells into hydrogels allows for the creation of three-dimensional environments conducive to cell growth, tissue simulation, and cellular interaction analysis. This combination of characteristics makes hydrogels promising candidates for creating biomimetic structures for tissue regeneration and in vitro cell studies. The present study evaluated the use of hydrogels formulated with natural biopolymers, sodium alginate, and gelatin at different concentrations to manufacture electromechanically resistant biopolymeric filaments for use as cell supports. Sodium alginate and gelatin biopolymers served as the base for the hydrogels, with calcium chloride as the cross-linking agent. Combinations of biopolymers and the cross-linking agent were defined using a central composite design experimental approach. Various filaments were manufactured using the wet spinning technique, and these were subsequently mechanically and microscopically evaluated (with and without cells) using light microscopy, atomic force microscopy, and scanning electron microscopy. Seven combinations with the best electromechanical tensile strength were identified, using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) as the solubilizing medium. Subsequent analysis revealed variations in the tensile properties and nanoroughness of the filaments, indicating that the modulation of polymer concentrations influences the micro and nano-mechanical characteristics of the resulting biopolymeric filaments, as well as the addition of cells influencing these properties. Storage testing of the selected formulations demonstrated that DMEM-10 (8.36% sodium alginate, 4% gelatin, and 2% CaCl_2 w/v solubilized in DMEM medium) did not alter its tensile properties over a four-week period. Light microscopy was essential for understanding the morphology of the developed materials and visualizing the internal biomaterial mesh organization. Scanning electron microscopy, using the DMEM-10 combination with and without OSCC-3 cells for filament production, identified smooth external structures, intact and collapsed pores, as well as cell adhesion to the polymeric networks of the tested materials. Additionally, the use of artificial intelligence enabled the classification and prediction of light microscopy images, with considerable success, through the creation of a database. This study explored the formulation of hydrogels using sodium alginate and gelatin to manufacture tensile-resistant biopolymeric filaments for cell support. The optimized combinations, particularly the DMEM-10 hydrogel, influenced mechanical properties, nanoroughness, and the morphologies observed through microscopy. From this study, a promising future is envisioned for the use of hydrogels formulated with sodium alginate and gelatin, especially in the creation of biomimetic structures for tissue regeneration and in vitro cell studies.

Keywords: Hydrogels; mechanical properties; cell encapsulation; biopolymers; artificial intelligence.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Imagens representativas com os tipos de biomateriais existentes	28
Figura 2. Ilustrações de diferentes tipos de hidrogéis construídos com biopolímeros e suas estruturas microscópicas exemplificadas.....	33
Figura 3. Ilustração da composição molecular do polímero de alginato.	35
Figura 4. Ilustração de uma bioimpressora 3D construindo um mimético de órgão a partir de biopolímeros naturais.	37
Figura 5. Representação esquemática do processo de fiação úmida.	39
Figura 6. Ilustração tecidos biomiméticos evidenciando a capacidade de celularização e vascularização.....	41
Figura 7. Ilustração de uma IA que pode ser utilizada imitando a inteligência humana para realizar tarefas como a capacidade de solucionar desafios, tomar decisões e identificar padrões	42

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E CONCENTRAÇÃO DE AGENTE DE RETICULAÇÃO (CROSSLINKING) NA MODULAÇÃO DAS PROPRIEDADES MICRO- E NANOMECÂNICAS DE FILAMENTOS À BASE DE HIDROGEL

Figura I-1. Resumo gráfico apresentando as etapas desde a combinação dos biopolímeros alginato de sódio e gelatina, sua solubilização, produção dos filamentos utilizando a fiação úmida e o processo de estiramento mecânico para caracterização das propriedades do biomaterial	47
Figura I-2. Demonstração da extrusão manual utilizando seringas	54
Figura I-3. Imagens fotográficas mostrando as estruturas que compõem a extensora eletromecânica utilizada (software e hardware)	55
Figura I-4. Avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis produzidos por delineamento experimental, tendo como variáveis independentes alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio	58
Figura I-5. Gráficos de superfície de resposta 3D pelo modelo quadrático a partir da avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis a partir do	

delineamento experimental, tendo como variáveis independentes alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio	60
Figura I-6. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogel após o rompimento provocado pela extensora eletromecânica	61
Figura I-7. Imagens topográficas de superfície 3D de hidrogéis selecionados utilizando MFA operada em modo dinâmico	64
Figura I-8. Parâmetros de nanorrugosidade de hidrogéis selecionados obtidos utilizando MFA.....	66
Figura I-9. Análise de parâmetros extraídos de curvas de força-distância refletindo propriedades mecânicas de hidrogéis selecionados utilizando processo de nanoindentação	69
Figura I-10. Curvas de força-distância (aproximação e retração) e saltos de força (inserções) para todos os hidrogéis selecionados.....	71

CAPÍTULO II

INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO E FORÇA MECÂNICA DE FILAMENTOS À BASE DE HIDROGÉIS PRODUZIDOS POR FIAÇÃO ÚMIDA MANUAL E COM USO DE BIOIMPRESSORA 3D COM AGULHAS DE DIFERENTES CALIBRES E AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO AO LONGO DO TEMPO

Figura II-1. Resumo gráfico apresentando as etapas desde o emprego do hidrogel para extrusão de filamentos utilizando diferentes tipos de diâmetro de agulhas, até o processo de estiramento mecânico para caracterização do material até o momento da ruptura.	75
Figura II-2. Extrusão de filamentos pela técnica de fiação úmida utilizando bioimpressora 3D (Starter 3DBS).....	81
Figura II-3: Imagens fotográficas de filamentos de hidrogéis preparados com agulhas de diferentes calibres, antes e depois da aplicação de tensão eletromecânica	85
Figura II-4. Avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis utilizando agulhas de diferentes calibres.....	87
Figura II-5. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogel produzidos com diferentes diâmetros de agulhas após o rompimento provocado pela extensora eletromecânica	88

Figura II-6. Avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis utilizando diferentes tipos de agulhas utilizando uma bioimpressora 3D	90
Figura II-7. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogéis biopoliméricos produzidos com agulhas de diferentes calibres através da extrusão em bioimpressora 3D, até o rompimento provocado pela extensora eletromecânica.....	91
Figura II-8. Avaliação de filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis armazenados por até quatro semanas.....	96
Figura II-9. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogéis biopoliméricos armazenados e avaliados semanalmente durante quatro semanas, sendo avaliados até o rompimento provocado pela extensora eletromecânica	97
Figura II-10. Curva cinética indicativa da taxa de ganho e perda de massa dos hidrogéis pelos ensaios de intumescimento e desintegração, conduzidos por um período de sete dias e armazenados em incubadora a 37°C em PBS.....	99

CAPÍTULO III

ESTUDO DA APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS COMO BIOMATERIAL BASE PARA BIOTINTAS, CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E MICROSCÓPICA, E USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL EM ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Figura III-1. Resumo gráfico apresentando as etapas desde o processamento histológico dos filamentos de hidrogéis até a caracterização e avaliação das propriedades micro- e nanomecânicas após a adição de células ao hidrogel.	102
Figura III-2. Ilustração do teste de esterilidade dos hidrogéis em meios de cultivo microbiológicos Muller-Hinton e Sabouraud.....	109
Figura III-3. Representações esquemáticas das posições de cada parte dos filamentos com e sem células analisadas por MEV	112
Figura III-4. Representação esquemática da ferramenta Teachable Machine utilizada como inteligência artificial baseada em aprendizado de máquina para a predição das classificações de imagens de filamentos	114
Figura III-5. Ilustração da matriz de confusão, na qual as predições foram inseridas e gerada a confiabilidade do aprendizado da IA.	114
Figura III-6. Ensaio de eficácia de conservação o preparo dos hidrogéis.	116
Figura III-7. Ensaio de eficácia de conservação após a simulação de transporte ..	117

Figura III-8. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-6	119
Figura III-9. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-8	120
Figura III-10. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-10	121
Figura III-11. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-11	122
Figura III-12: Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-12	123
Figura III-13: Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-14	124
Figura III-14: Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-15	125
Figura III-15. Avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogel DMEM-10 celularizado com OSCC-3.....	127
Figura III-16. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogel DMEM-10 celularizados com OSCC-3, até o rompimento provocado em extensora eletromecânica	128
Figura III-17. Análise topográfica obtida por MFA e parâmetros de nanorrugosidade de superfície do hidrogel DMEM-10 contendo células OSCC-3.....	130
Figura III-18. Análise de medições de força refletindo propriedades mecânicas do hidrogel DMEM-10 celularizado usando nanoindentação	132
Figura III-19. Curvas de força-distância (aproximação e retração) e saltos de força (inserção) para o hidrogel DMEM-10 celularizado com OSCC-3.	134
Figura III-20. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filamentos não estirados produzidos a partir do hidrogel DMEM-10.	135
Figura III-21. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filamentos estirados produzidos a partir do hidrogel DMEM-10	136
Figura III-22. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filamentos não estirados celularizados produzidos a partir do hidrogel DMEM-10.....	137
Figura III-23. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filamentos estirados celularizados produzidos a partir do hidrogel DMEM-10.....	138

Figura III-24. Matriz de confusão da predição sobre os filamentos estirados e não estirados.....	141
Figura III-25. Matriz de confusão da predição sobre os sete diferentes tipos de hidrogéis.....	144

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Apresentação dos biopolímeros naturais e sintéticos, e suas aplicações na engenharia de tecidos e biomedicina.	32
--	----

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E CONCENTRAÇÃO DE AGENTE DE RETICULAÇÃO (CROSSLINKING) NA MODULAÇÃO DAS PROPRIEDADES MICRO- E NANOMECÂNICAS DE FILAMENTOS À BASE DE HIDROGEL

Tabela I-1. Pontos máximos e mínimos para as variáveis independentes do delineamento experimental com alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio.	52
Tabela I-2. Delineamento experimental com as variáveis independentes sendo as concentrações relativas iniciais (% p/v) de soluções de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio.	53
Tabela I-3. Exemplificação dos valores de módulos de Young de tecidos.	70

CAPÍTULO II

INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO E FORÇA MECÂNICA DE FILAMENTOS À BASE DE HIDROGÉIS PRODUZIDOS POR FIAÇÃO ÚMIDA MANUAL E COM USO DE BIOIMPRESSORA 3D COM AGULHAS DE DIFERENTES CALIBRES E AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO AO LONGO DO TEMPO

Tabela II-1. Nomes para as combinações de variáveis independentes, sendo as concentrações relativas (%p/v) de alginato de sódio e gelatina nos hidrogéis, e solução de cloreto de cálcio como agente de reticulação.....	80
Tabela II-2. Identificação das agulhas e seus respectivos diâmetros.	82
Tabela II- 3. Diâmetros dos filamentos produzidos com diferentes agulhas.	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

% – Porcentagem	N/m – Newton por metro
°C – Grau Celsius	nm – Nanômetro
2D – Bidimensional	nN- Nanonewton
3D – Tridimensional	OSCC-3 – Câncer escamoso oral humano
A – Alginato	OsO ₄ – Tetróxido de ósmio
ANOVA – Análise de variância	p/v – peso sobre volume
CaCl ₂ – Cloreto de cálcio	Pa - Pascal
DMEM – <i>Dulbecco's Modified eagle's medium</i>	PBS – Tampão Fosfato Salina
DoE – Desenho de experimentos	PCL - Policaprolactona
DP – Desvio Padrão	PdI – Índice de Polidispersividade
G – Gelatina	PEG - Polietilenoglicol
Ga - Gauge	PGA – Ácido poliglicólico
GPa – Giga Pascal	pH – Índice de acidez-alcalinidade
h – Hora(s)	PLA – Ácido polilático
IA – Inteligência Artificial	PLGA – Poli (ácido láctico-co-glicólico)
kPa – Quilo Pascal	s – Segundo
ksi - quilolibra por polegada quadrada	UV-Vis – Espectroscopia no ultravioleta - visível
kV - quilovolt	ω _f – Peso final
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura	ω _i – Peso inicial
MFA – Microscopia de Força Atômica	T – Proporção da massa final
mg – Miligrama	© - copyright
min – Minuto(s)	@ - arroba
mL – Mililitro	® - marca registrada
mm – milímetro	Σ - somatório de números
mV – Milivolt	Π - produto de números
N – Newton	

APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente Tese intitulada “Filamentos de hidrogeis à base de biopolímeros para a incorporação de células: avaliação reológica, biomecânica e uso de aprendizado de máquina” está distribuída em parte introdutória (referencial teórico, justificativa e objetivos) e três capítulos apresentados na forma de artigos científicos.

O referencial teórico contextualiza a Bioengenharia Tecidual no escopo desta pesquisa e aborda desde a definição de biomateriais, passando por hidrogéis de alginato e gelatina, os principais tipos de agentes reticulantes, a fabricação de filamentos por meio da fiação úmida, os aspectos principais sobre os biomiméticos teciduais e o uso da inteligência artificial. A seguir se encontra a justificativa para o desenvolvimento desta Tese e posteriormente os objetivos desta pesquisa.

O Capítulo I apresenta a utilização de um desenho experimental para prever as combinações de polímeros com vistas à confecção de filamentos de hidrogéis por fiação úmida, além de avaliar suas propriedades micro- e nanomecânicas utilizando uma extensora eletromecânica e o microscópio de força atômica. O Capítulo II é voltado ao teste e análise dos filamentos fabricados com diferentes diâmetros de agulhas, comparando a extrusão manual com a automática utilizando uma bioimpressora 3D, além da avaliação de durabilidade e desintegração ao longo do tempo destes materiais. O Capítulo III apresenta os testes realizados para averiguação da esterilidade dos filamentos desenvolvidos, suas análises utilizando a microscopia de luz em secções histológicas, microscopia eletrônica de varredura para avaliação ultraestrutural e a utilização de inteligência artificial para classificar e prever os grupos das imagens de microscopia de luz conforme a característica de cada uma delas. Este documento se encerra com as Conclusões e Considerações Finais, consistindo em um tópico que trata das principais conclusões obtidas nos Capítulos I, II e III diante dos objetivos propostos para as investigações realizadas na Tese e discute desafios e perspectivas no contexto desta pesquisa.

Parte do conteúdo do Capítulo I consta no artigo que está sob revisão final após correções no periódico *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, conforme a referência: Araujo Neto, L. A., Silva, L.P. “Influence of biopolymer composition and crosslinking agent concentration on the micro- and nanomechanical properties of hydrogel-based filaments”. Adicionalmente, parte do Capítulo II consta no artigo submetido em julho de 2023 ao periódico *Polymer Bulletin*, conforme a

referência: Araujo Neto, L. A., Silva, L.P. “Characterization of hydrogel filaments: Investigating behavior, mechanical strength, and degradation over time” (Em avaliação). Além disso, dois manuscritos contendo a pesquisa apresentada no Capítulo III estão sendo preparados para submissão com vistas à publicação em periódicos internacionais no Qualis de Farmácia.

Ao longo do desenvolvimento desta pesquisa, os principais resultados obtidos foram apresentados em eventos, nas seguintes modalidades:

- Envio de resumo e apresentação oral no II Simpósio Araucária em Biologia Celular e Molecular – Curitiba, PR (2019);
- Envio de resumo e apresentação oral no I, II, III e IV Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (CDNB) – Brasília, DF (2020 a 2023);
- Envio de resumos e apresentações orais nos VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV e XV Simpósios do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa/Cenargen – Brasília, DF (2019 a 2023);
- Envio de resumos e apresentação de painéis nos XXIV, XXV e XXVI Encontros do Talento Estudantil da Embrapa – Brasília, DF (2019 a 2023);
- Envio de resumo, apresentação de painel e apresentação oral na *2nd International Conference in Nanoscience and Nanobiotechnology* (ICONNANO) – Brasília, DF (2021);
- Apresentação no formato de Palestra no Panorama Geral da Bioengenharia pela UFTPR – Curitiba, PR (2020);
- Apresentação no formato de Palestra na I Semana Avançada da UFU – Uberlândia, MG (2020).

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA TESE.....	20
1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	26
1.1 BIOMATERIAIS	26
1.2 BIOMATERIAIS À BASE DE BIOPOLÍMEROS	30
1.3 HIDROGÉIS	33
1.3.1 HIDROGÉIS DE ALGINATO	34
1.3.2 HIDROGÉIS DE GELATINA.....	35
1.4 AGENTES RETICULANTES	36
1.5 MANUFATURA ADITIVA.....	37
1.6 FIAÇÃO ÚMIDA (DO INGLÊS <i>WET SPINNING</i>).....	38
1.7 FILAMENTOS X FIBRAS	39
1.8 BIOMIMÉTICOS TECIDUAIS	40
1.9 INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL	41
2 JUSTIFICATIVA.....	44
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVO GERAL.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
CAPÍTULO I.....	47
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E CONCENTRAÇÃO DE AGENTE DE RETICULAÇÃO (<i>CROSSLINKING</i>) NA MODULAÇÃO DAS PROPRIEDADES MICRO- E NANOMECÂNICAS DE FILAMENTOS À BASE DE HIDROGEL	47
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
1 INTRODUÇÃO	50
2 MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1 DESENHO EXPERIMENTAL	52
2.2. PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	53
2.3. PRODUÇÃO DOS FILAMENTOS DE HIDROGÉIS	54
2.4. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO ELETROMECAÂNICA DOS FILAMENTOS	54

2.5. CARACTERIZAÇÃO DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE DE HIDROGÉIS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	55
2.6. CURVAS DE FORÇA DE HIDROGÉIS POR ESPECTROSCOPIA DE FORÇA	56
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1. ANÁLISE DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO SUPORTADA PELOS FILAMENTOS PRODUZIDOS A PARTIR DOS DESENHOS EXPERIMENTAIS	57
3.2. CARACTERIZAÇÃO DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE DE HIDROGÉIS UTILIZANDO MFA	63
3.3. ANÁLISE DAS CURVAS DE FORÇA-DISTÂNCIA E PROPRIEDADES MICRO- E NANOMECÂNICAS DE HIDROGÉIS.....	67
4. CONCLUSÃO	73
CAPÍTULO II	75
INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO E FORÇA MECÂNICA DE FILAMENTOS À BASE DE HIDROGÉIS PRODUZIDOS POR FIAÇÃO ÚMIDA MANUAL E COM USO DE BIOIMPRESSORA 3D COM AGULHAS DE DIFERENTES CALIBRES E AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO AO LONGO DO TEMPO	75
RESUMO.....	76
ABSTRACT.....	77
1 INTRODUÇÃO	78
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	80
2.2 PRODUÇÃO DE FILAMENTOS A PARTIR DE HIDROGÉIS COM DIFERENTES TIPOS DE AGULHAS.....	81
2.3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ELETROMECÂNICA À TRAÇÃO DOS FILAMENTOS	82
2.4 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE FILAMENTOS A PARTIR DE HIDROGÉIS ARMAZENADOS.....	83
2.5 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO E DESINTEGRAÇÃO DOS HIDROGÉIS FABRICADOS	83
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84

3.1	ANÁLISE DA RESISTÊNCIA E COMPARAÇÃO DOS FILAMENTOS EXTRUSADOS MANUALMENTE E UTILIZANDO BIOIMPRESSÃO 3D COM AGULHAS DE DIFERENTES CALIBRES	84
3.2	AVALIAÇÃO DE FILAMENTOS DE HIDROGÉIS BIOPOLIMÉRICOS ARMAZENADOS POR ATÉ QUATRO SEMANAS	94
3.3	COMPORTAMENTOS DOS HIDROGÉIS NO ENSAIO DE INTUMESCIMENTO E DESINTEGRAÇÃO	98
4	CONCLUSÃO	100
	CAPÍTULO III	102
	ESTUDO DA APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS COMO BIOMATERIAL BASE PARA BIOTINTAS, CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E MICROSCÓPICA, E USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL EM ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	102
	RESUMO.....	103
	ABSTRACT.....	104
1.	INTRODUÇÃO	105
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	107
2.1	TESTE DE EFICÁCIA DE CONSERVAÇÃO.....	107
2.2	TESTE DE TRANSPORTE E EFICÁCIA DE CONSERVAÇÃO	109
2.3	MICROSCOPIA DE LUZ E HISTOLOGIA DOS FILAMENTOS DE HIDROGÉIS	109
2.4	PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO MECÂNICA DOS FILAMENTOS DO HIDROGEL OBTIDO PELA COMBINAÇÃO DMEM-10 ASSOCIADO À CÉLULAS OSCC-3.....	111
2.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS FILAMENTOS	111
2.6	UTILIZAÇÃO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL COMO ESTRATÉGIA PARA CLASSIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE IMAGENS DE BIOMATERIAIS	112
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	113
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	115
3.1	ANÁLISE DE EFICÁCIA DE CONSERVAÇÃO	115
3.2	ANÁLISE DAS SECÇÕES OBTIDAS DE CADA FILAMENTO POR MICROSCOPIA DE LUZ	117
3.3	ANÁLISE DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO SUPORTADA POR FILAMENTOS PRODUZIDOS COM CÉLULAS OSCC-3 UTILIZANDO AGULHAS COM DIFERENTES CALIBRES	126

3.4	CARACTERIZAÇÃO DA TOPOGRAFIA E PROPRIEDADES DE RUGOSIDADE DOS HIDROGÉIS CELULARIZADOS POR MFA	129
3.5	ANÁLISE DAS CURVAS DE FORÇA-DISTÂNCIA E PROPRIEDADES MICRO- E NANOMECÂNICAS DE HIDROGEL CELULARIZADO	131
3.6	CARACTERIZAÇÃO DE MICROESTRUTURAS DOS FILAMENTOS COM E SEM CÉLULAS OSCC-3 POR MEV	134
3.7	PREDIÇÃO POR IA APÓS APRENDIZADO COM AS IMAGENS DE SECÇÕES DE FILAMENTOS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE LUZ	139
4.	CONCLUSÃO	145
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	147
	REFERÊNCIAS.....	149
	CRONOGRAMA	178
	ANEXO 1 – LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DO DOUTORADO	

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 BIOMATERIAIS

Um biomaterial pode ser definido no contexto da bioengenharia como qualquer material utilizado para fabricar dispositivos com a finalidade de substituir uma parte ou uma função do corpo de maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável (EHRlich, 2010). No mesmo caminho, porém seguindo uma definição atualizada, um biomaterial é um tipo de material projetado e desenvolvido para interagir de forma segura e eficaz com sistemas biológicos, como o corpo humano (BISWAL; BADJENA; PRADHAN, 2020). Ademais, a Sociedade dos Biomateriais define biomaterial como “uma substância sistemicamente e farmacologicamente inerte projetada para implantação ou incorporação em sistemas vivos” (*Society for Biomaterials*, 2023). Tecnicamente, biomateriais são utilizados em uma variedade de aplicações médicas e biológicas, incluindo implantes, dispositivos médicos, engenharia de tecidos, diagnósticos e terapias.

De todas as particularidades que um biomaterial pode apresentar, a mais essencial é o seu potencial de ser compatível com os ambientes biológicos, consequentemente minimizando quaisquer reações adversas do corpo e permitindo o alcance da funcionalidade desejada (HUZUM et al., 2021). Para tal, a seleção de materiais que não causem rejeição imunológica, inflamação excessiva ou outros efeitos indesejados é indispensável de ser realizada (MARIANI et al., 2019).

A elaboração, desenvolvimento e aplicação de biomateriais oferecem relevantes vantagens devido às suas propriedades únicas e à sua capacidade de interagir com sistemas biológicos de maneira positiva (CHEN et al., 2016). Algumas das principais vantagens dos biomateriais frente a outros tipos de materiais incluem: I) compatibilidade biológica, na qual são projetados para serem compatíveis com o corpo humano e também para outros sistemas biológicos, reduzindo os riscos de desencadear processos inflamatórios ou de rejeição (LEWIS, 2018); II) ampla gama de aplicações, desde implantes médicos (como próteses), em engenharia de tecidos, terapias e diagnósticos (AL-SHALAWI et al., 2023); III) cicatrização de tecidos e aceleração dos processos

de regeneração e recuperação (BONFERONI et al., 2021); IV) tratamentos personalizados devido à fácil adaptação e tornando mais eficaz a para a necessidade de cada paciente (AGUADO et al., 2018); V) durabilidade longa, suportando as condições e demandas específicas do corpo e em ambientes de armazenamento corretos (KUMAR GUPTA et al., 2015); VI) resistência à colonização bacteriana, quando devidamente projetados, o que gera a redução ao risco de infecções (ANWAR et al., 2019); VII) possibilidade de integração ao tecido circundante, permitindo uma fusão natural e estável (TROY et al., 2021); VIII) possibilidade da criação de tecidos e órgãos artificiais, na medicina regenerativa, bem como a promoção da regeneração natural (RAHMATI et al., 2018); e IX) poderem ser selecionados para minimizar as reações alérgicas, em comparação aos materiais não compatíveis (SALTHOUSE et al., 2023). Ou seja, biomateriais são fundamentais para o avanço da ciência, principalmente no campo da bioengenharia, a fim de melhorar a saúde humana e a qualidade de vida.

Em contrapartida, existem alguns desafios que precisam ser considerados e que são desvantajosos, os quais incluem: I) o risco de desencadeamento de reações imunológicas no corpo (inflamação, rejeição ou alergias) (RAFIEI; CHUNG; CHAU, 2023); II) o risco de infecções associadas ao uso de implantes ou dispositivos médicos (NEGUT; BITA; GROZA, 2022); III) a degradabilidade inadequada pode ser problemático e requerer substituições frequentes, se forem utilizados como implantes de longo prazo (NUSS; RECHENBERG, 2008); IV) alguns materiais podem não serem aceitos por incompatibilidade com os sistemas biológicos (WILLIAMS, 2019); V) poderem ser considerados dispendiosos, influenciando nos custos dos tratamentos, dependendo do material utilizado (BHAT; KUMAR, 2013); VI) alguns biomateriais podem apresentar limitações em suas propriedades mecânicas, muitas das quais são essenciais para suportar as condições físicas e as demandas de carga do corpo (MOGHADASI et al., 2022); VII) necessidade de aprovações regulatórias rigorosas para a introdução no mercado (MASAELI; ZANDSALIMI; TAYEBI, 2019). De qualquer forma, esses desafios são considerados pelos avanços contínuos na pesquisa e no desenvolvimento de biomateriais. Não obstante, reconhecer as limitações e os potenciais desafios são essencialmente

fundamentais no desenvolvimento de novos biomateriais (MOYSIDOU; BARBERIO; OWENS, 2021).

A Figura 1 mostra os diferentes tipos de biomateriais existentes com base na natureza química, sendo que cada um possui sua própria característica e aplicação específica. Os biomateriais metálicos, como o próprio nome já diz, são materiais à base de metal, os quais são projetados e utilizados para aplicações médicas e biológicas, principalmente em implantes e dispositivos médicos (DAVIS et al., 2022; PRASAD et al., 2017). As suas resistência mecânica, durabilidade e biocompatibilidade são as principais características (NAKANO, 2010). Nesse sentido, alguns dos metais mais comuns utilizados em biomateriais incluem titânio, aço inoxidável e ligas à base de cobalto-cromo (SANTOS, 2017).

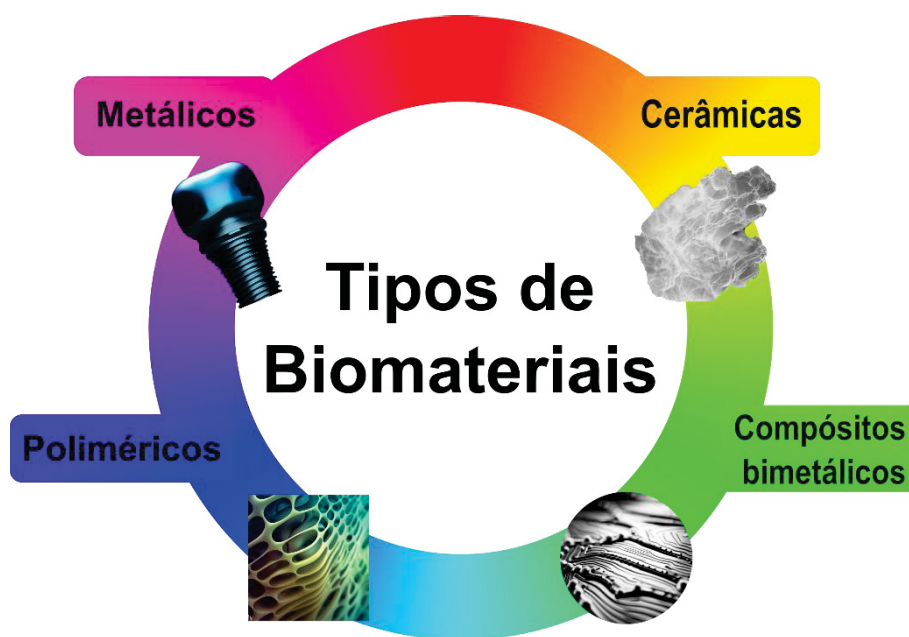


Figura 1. Imagens representativas com os tipos de biomateriais existentes. Figuras geradas pela inteligência artificial Bing.

Os biomateriais representados pelas cerâmicas, em geral, são materiais sólidos inorgânicos que têm propriedades de biocompatibilidade, resistência e durabilidade altas (ISMAIL; MOHAMAD, 2021). Usualmente, biomateriais cerâmicos são projetados para mimetizar as propriedades de ossos humanos e que interajam de maneira positiva com os sistemas biológicos. Suas aplicações incluem implantes ortopédicos, odontológicos e dispositivos médicos

(SZCZĘSNY et al., 2022). Os materiais representantes deste grupo são, essencialmente, hidroxiapatita, alumina, zircônia, cerâmicas de fosfato de cálcio e compostas (VAIANI et al., 2023).

Biomateriais compósitos bimetálicos, também conhecidos como bímateriais, consistem em duas ou mais camadas de diferentes metais ou ligas metálicas combinadas de forma estrutural e funcionalmente integrada (HATEFI ARDAKANI; MOSLEMZADEH; MOHAMMADI, 2019). A combinação de cada componente oferece vantagens quando comparado aos materiais individuais. Dentro desse grupo há aqueles biomateriais que possuem características de dissipadores de calor, sensores e componentes estruturais. São constituídos por latão-aço, níquel-ferro, níquel-titânio, cobre-alumínio e outros. Eles representam uma abordagem atrativa visto as suas aplicações tecnológicas e industriais (HOTRA; KOVTUN; DEKUSHA, 2021).

Os biomateriais poliméricos são materiais elaborados a partir de polímeros, os quais são projetados para interagirem com os sistemas biológicos de maneira segura e eficaz (SOCCI et al., 2023). Eles apresentam um protagonismo importante, justamente por apresentarem uma variedade de aplicações médicas e biológicas devido à sua versatilidade, propriedades mecânicas únicas e superfície ajustáveis (TANG et al., 2014). Os polímeros que constituem biomateriais poliméricos podem ser compostos por moléculas de origem natural, sintética ou até mesmo por uma combinação de ambas (REDDY et al., 2021). Os polímeros naturais são representados pelo colágeno, ácido hialurônico, fibrina, queratina, celulose, quitina, quitosana, alginato, agarose e gelatina (KRISHANI et al., 2023). Já os polímeros sintéticos incluem polietileno, polipropileno, polimetilmetacrilato, polietilenoglicol, poliuretano, policaprolactona, ácido polilático e ácido poliglicólico (MAITZ, 2015). Polímeros podem ser utilizados como arcabouços (*scaffolds*) celulares ou matrizes tridimensionais para cultivo de células, regeneração de tecidos e como suporte para a regeneração de tecidos (CHEN et al., 2022).

O avanço da ciência, tecnologia, pesquisa e desenvolvimento desempenham um papel importante no avanço da biotecnologia, bioengenharia e da saúde humana, mesmo que desafios estejam presentes constantemente. Transpondo essas fronteiras, a próxima seção explorará um tipo específico de biomateriais poliméricos: os biopoliméricos.

1.2 BIOMATERIAIS À BASE DE BIOPOLÍMEROS

Biopolímeros, assim como a maioria dos biomateriais poliméricos, são produzidos naturalmente a partir de organismos vivos, derivados de recursos biológicos, ou como também de origem sintética (DAS et al., 2023). Essencialmente biopolímeros atuam com papéis relevantes na estrutura e função dos sistemas biológicos, como plantas, animais e microrganismos (PAUL; DAS; SHARMA, 2021). O fornecimento de suporte estrutural, armazenamento de energia, auxílio nos processos metabólicos e atuação na comunicação celular representam algumas funções características (BARANWAL et al., 2022).

Na engenharia de tecidos e na biomedicina, os biopolímeros desempenham um papel essencial para mimetizar estruturas como matriz extracelular, suportam o crescimento e proliferação celular, promovem a regeneração de tecidos e possibilitam a liberação controlada de fármacos (LYNCH; KONDIAH; CHOONARA, 2021). Ademais, biopolímeros podem ser modulados para se degradarem ao longo do tempo, permitindo que células, quando presentes, preencham o espaço deixado pelo material (SILVA et al., 2023). Os biopolímeros também são utilizados para criar sistemas de liberação controlada de fármacos, onde o medicamento é incorporado no material e liberado de maneira lenta e controlada ao longo do tempo. Para terapias de longo prazo e até mesmo para tratamentos localizados, isso é benéfico (GHEORGHITA et al., 2021).

As propriedades que alguns biopolímeros apresentam os tornam úteis como componentes para o uso em curativos e produtos para a cicatrização de feridas, nas quais promovem a cicatrização e reduzem as chances de uma infecção (GARDIKIOTIS et al., 2022). Eles também são aplicados na regeneração de vários tipos de tecidos, como por exemplo os ossos, cartilagem, pele e outros, justamente por fornecer uma estrutura de apoio ao crescimento e conjuntamente à diferenciação celular (GUILLÉN-CARVAJAL et al., 2023).

Os biopolímeros são classificados com base na sua origem, propriedade e função, como proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e polímeros sintéticos (KASAAI, 2018). Ácido hialurônico, ágar, agarose, alginato, amido, celulose, colágeno, gelatina, pectina, queratina e quitosana são alguns exemplos

representativos de biopolímeros naturais encontrados em microrganismos, plantas ou animais (BUSTAMANTE-TORRES et al., 2022). Já o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poliuretano, polietilenoglicol (PEG), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), poliacrilamida e poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) são exemplos de biopolímeros sintéticos (RAHMAN; HASAN, 2019). A Tabela 1 mostra alguns exemplos de polímeros, bem como suas principais aplicações na engenharia de tecidos e biomedicina.

A utilização de biopolímeros na engenharia de tecidos e na biomedicina traz várias vantagens devido às suas propriedades intrínsecas e adaptáveis. Por serem derivados de fontes naturais, os riscos de reações adversas são reduzidos, aumentando a potencial compatibilidade celular (ALTOMARE et al., 2018). Concomitantemente, a degradabilidade do material à base de biopolímeros pode ser controlada, gerando produtos não prejudiciais. Nisso, alguns biomateriais biopoliméricos podem mimetizar a matriz extracelular, criando um ambiente particular para as células (KWILAS et al., 2015). Assim, a versatilidade devido à natureza química dos biopolímeros, permite que sejam ajustados a fim de controlar as suas taxas de rigidez, degradação e porosidade (SAMIR et al., 2022). Além disso, em aplicações como sistemas de entrega de fármacos (*drug delivery*), a liberação de fármacos pode ocorrer de maneira controlada e gradual (JACOB et al., 2018). Essencialmente, por serem biodegradáveis, contribuem diretamente para a redução de resíduos tóxicos, quando comparados aos materiais sintéticos (VROMAN; TIGHZERT, 2009).

Os biopolímeros desempenham um papel crucial na formação de hidrogéis e a combinação das propriedades como biocompatibilidade e capacidade de interação molecular, permite a criação de hidrogéis versáteis e funcionalmente adaptáveis. Ao incorporar biopolímeros na matriz de um hidrogel, é possível criar um ambiente propício para uma variedade de aplicações biomédicas e bioengenharia, onde as propriedades físicas e químicas dos hidrogéis podem ser ajustadas para atender a necessidades específicas.

Tabela 1. Apresentação dos biopolímeros naturais e sintéticos, e suas aplicações na engenharia de tecidos e biomedicina.

Biopolímeros	Polímero	Aplicação	Referência
Naturais	Ácido hialurônico	Veículo de liberação controlada para medicamentos	(Bayer, 2020)
	Ágar	Implantes de liberação controlada	(Agossa et al., 2020)
	Agarose	Sistema de liberação controlada	(Khodadadi Yazdi et al., 2020)
	Alginato	Fabricação de <i>scaffolds</i> para engenharia de tecidos	(Farshidfar; Irvani; Varma, 2023)
	Amido	Curativos e bandagens	(Torres; Commeaux; Troncoso, 2013)
	Celulose	Liberação controlada de medicamentos	(Sun et al., 2018)
	Colágeno	Regeneração de tecidos	(Sheehy; Cunniffe; O'brien, 2018)
	Gelatina	Componente em <i>scaffolds</i> e matrizes tridimensionais	(Rubio-Valle et al., 2021)
	Queratina	Cosméticos e cicatrização de feridas	(Konop; Rybka; Drapala, 2021)
	Quitosana	Sistemas para nanoveiculação de fármacos	(Li et al., 2018a)
Sintéticos	PLA	Fabricação de <i>scaffolds</i> para engenharia de tecidos	(Donate; Monzón; 2020)
	PGA	<i>Scaffolds</i> e liberação controlada de fármacos	(Martins et al., 2018)
	Poliuretano	Cateteres e <i>stents</i>	(Gadzhiev et al., 2020)
	PEG	Hidrogéis e matrizes tridimensionais	(Zhu et al., 2020)
	PLGA	Liberação controlada de fármacos	(Loureiro; Pereira, 2020)
	PCL	<i>Scaffolds</i> e liberação controlada de fármacos	(Dwivedi et al., 2020)
	Poliacrilamida PHEMA	Matriz para cultura celular Lentes de contato	(Charrier et al., 2020) (Zare et al., 2021)

1.3 HIDROGÉIS

Hidrogéis, por definição, são materiais poliméricos tridimensionais constituídos por cadeias poliméricas hidrofílicas as quais são normalmente organizadas como um gel coloidal, sendo produzidos pela simples reação de um ou mais tipo(s) de polímeros a um agente reticulante (AHMED, 2015b). Eles são capazes de reter uma quantidade expressiva de água devido à sua estrutura porosa e rede de ligações cruzadas (LOO et al., 2021). Por apresentarem esta característica, isso faz com que se assemelhem a tecidos biológicos, permitindo uma vasta aplicação em diversos campos, como medicina, engenharia de tecidos, agricultura, produtos farmacêuticos, etc (ILIĆ-STOJANOVIĆ; NIKOLIĆ; CAKIĆ, 2023). A Figura 2 ilustra visualmente como são os materiais de hidrogéis.

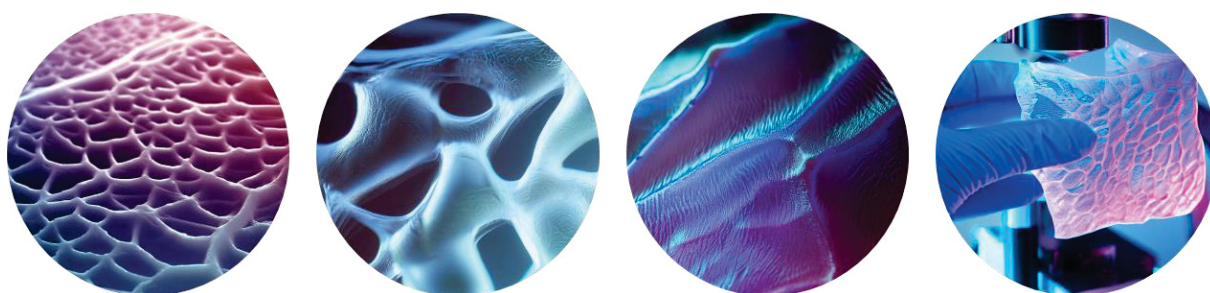


Figura 2. Ilustrações de diferentes tipos de hidrogéis construídos com biopolímeros e suas estruturas microscópicas exemplificadas. Imagens geradas com a inteligência artificial Bing.

Como os hidrogéis podem ser desenvolvidos a partir da utilização ou combinação de vários materiais, a sua composição química final pode variar amplamente, dependendo do tipo de polímero utilizado e das aplicações específicas desejadas (EL SAYED, 2023). Entretanto, existem alguns tipos polímeros que frequentemente são utilizados na composição de hidrogéis naturais, como alginato, agarose, quitosana, celulose, gelatina e colágeno naturais, assim como para hidrogéis sintéticos como, poliacrilamida, polietilenoglicol e carbopol (VASILE et al., 2020). Além disso, a ampla gama de variações possíveis determinam as suas propriedades, tais como a capacidade de retenção da água, elasticidade, viscosidade, degradação e biointerações (LI; MOONEY, 2016). Sendo assim, a seleção e otimização na escolha dos polímeros e a forma como são reticulados, permitem fazer ajustes dessas

propriedades, a fim de atender às necessidades específicas para cada aplicação (TRAN et al., 2020).

Os hidrogéis possuem inúmeras aplicações e em diversos campos, principalmente na engenharia de materiais, biomedicina e bioengenharia (HUANG et al., 2022). Entre tais áreas, se destacam as aplicações em engenharia de tecidos, nas quais hidrogéis são utilizados para criar ambientes tridimensionais semelhantes ao tecido biológico (conhecidos como miméticos teciduais) para o crescimento de células, principalmente para a regeneração de tecidos danificados (TRAN et al., 2020). Também são aplicados na liberação controlada de fármacos, assim ocorrendo de forma controlada e por um período de tempos maior (XING; ZENG; YANG, 2022). Outras aplicações se apresentam como uso na confecção de lentes de contato, sensores biológicos, na agricultura e engenharia de alimentos (HAMA et al., 2023). Ademais, uma aplicação de hidrogéis que vem sendo recentemente empregada é na bioimpressão 3D, sendo utilizados como biomateriais para obtenção de construtos, permitindo a criação de estruturas complexas de tecidos (PERSAUD et al., 2022).

No contexto de bioengenharia tecidual, a utilização de hidrogéis nas diversas áreas implica na avaliação de diversos aspectos que são a chave para a pesquisa científica nessa área, como biocompatibilidade, versatilidade e similaridade com tecidos biológicos. Entretanto, fatores como mecânica limitada, degradação dificultada e custo alto, podem ser algumas das principais desvantagens de alguns tipos de hidrogéis (AHMAD et al., 2022). Os candidatos mais favoráveis que podem superar algumas dessas desvantagens e imitar as propriedades físicas, químicas, elétricas e biológicas da maioria dos tecidos, como uma arquitetura complexa e fornecendo o microambiente celular essencial, são os hidrogéis sólidos (FISHER et al., 2010; MAJI, 2022; NIKOLOVA; CHAVALI, 2019), compostos por polissacarídeos (LI; LIN, 2021) e/ou proteínas/peptídeos, naturais ou sintéticos (RAZA et al., 2018), também denominados hidrogéis biopoliméricos.

1.3.1 HIDROGÉIS DE ALGINATO

Os hidrogéis de alginato são uma classe de hidrogéis biopoliméricos que têm como biopolímero base o alginato, que é um polissacarídeo extraído de algas marinhas e disponível comercialmente como alginato de sódio ou de cálcio (LEE; MOONEY, 2012). A sua estrutura molecular é composta por unidades de ácido

gulurônico (G) e ácido manurônico (M) conectadas alternadamente (TOUNSI et al., 2022). A proporção de G e M em uma molécula de alginato varia dependendo da fonte de algas e do processo de extração utilizado (Figura 3).

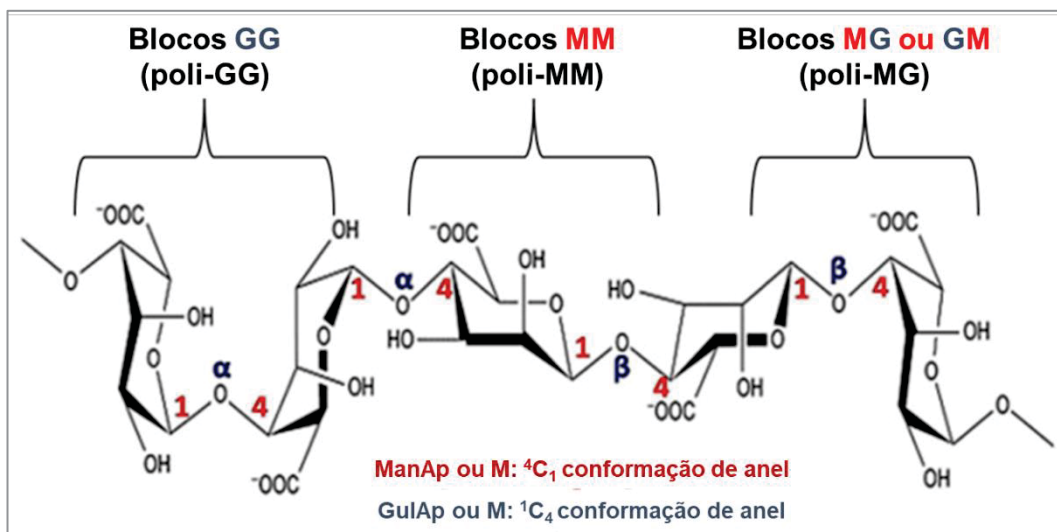


Figura 3. Ilustração da composição molecular do polímero de alginato. Porções de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) são mostradas. Imagem adaptada de Tounsi et al. (2022).

A principal característica dos hidrogéis de alginato é o seu processo de reticulação, a qual ocorre quando íons bivalentes, como o cálcio (Ca^{2+}), interagem com os grupos de ácidos presentes no alginato, levando à formação de uma rede tridimensional (MALEKTAJ; DROZDOV; DECLAVILLE CHRISTIANSEN, 2023). Na engenharia de tecidos são utilizados para encapsular células e criar ambientes tridimensionais para a regeneração de tecidos (SAHOO; BISWAL, 2021). Uma característica importante dos alginatos é sua adesão e interação celular limitada, que pode ser desvantajosas para aplicações em engenharia de tecidos (AHMAD RAUS; WAN NAWAWI; NASARUDDIN, 2021). Contudo, algumas dessas desvantagens podem ser superadas pela combinação com outros biopolímeros, como a gelatina.

1.3.2 HIDROGÉIS DE GELATINA

Os hidrogéis de gelatina são biomateriais proteicos, em que o biopolímero base é derivado da hidrólise parcial do colágeno, o qual é geralmente obtido a partir de tecidos de animais, como ossos e peles (ANDREAZZA et al., 2023). Esses

hidrogéis biopoliméricos são utilizados em diversas aplicações, principalmente devido à sua biocompatibilidade, além de suas propriedades de reticulação pela temperatura ser reversível (SKOPINSKA-WISNIEWSKA; TUSZYNSKA; OLEWNIK-KRUSZKOWSKA, 2021).

Na engenharia de tecidos e bioimpressão 3D hidrogéis de gelatina são utilizados para criar ambiente tridimensional para cultivo celular e estruturas de tecidos específicas. A gelatina pode até mesmo ser modificada para ajustar as propriedades do hidrogel de acordo com as necessidades da aplicação, quando combinada com outros tipos de biopolímeros, permitindo a criação de estruturas e dispositivos biomiméticos (WANG et al., 2022b).

1.4 AGENTES RETICULANTES

Os agentes de reticulação (reticuladores ou do inglês *crosslinkers*) são moléculas que contêm duas ou mais extremidades reativas capazes de se ligar quimicamente a grupos funcionais específicos em proteínas, polissacarídeos ou outras moléculas (JAYACHANDRAN et al., 2022). São utilizados como agentes para formar ligações cruzadas entre as cadeias de polímeros em hidrogéis, resultando na formação de uma estrutura tridimensional estável. Essas ligações cruzadas conferem aos hidrogéis suas propriedades mecânicas diferenciadas e a capacidade de retenção de água (MAITRA; SHUKLA, 2014).

Existem diversos tipos de agentes de reticulação que são utilizados na fabricação de hidrogéis, sendo que cada um apresenta características específicas. Eles são separados em dois grandes grupos: físicos e químicos (PARHI, 2017). Os agentes físicos são representados pela utilização de luz ultravioleta (fotopolimerização) e variação da temperatura (termopolimerização) (ZHANG; ZHANG; WU, 2013). Já os agentes químicos são representados por uma diversa variedade de compostos, como íons metálicos que formam ligações covalentes entre as repetições poliméricas, variações de pH e uso de enzimas (HU et al., 2019). Portanto, a escolha do agente reticulante e concentração empregada podem afetar as propriedades finais do hidrogel produzido, como por exemplo a porosidade, taxa de degradação, absorção de água e as respostas por estímulos ambientais (NASUTION et al., 2022).

1.5 MANUFATURA ADITIVA

A impressão 3D, como também é conhecida popularmente a manufatura aditiva, é um processo de fabricação tridimensional de objetos, construindo-os camada a camada, a partir de materiais como plástico, metal, cerâmica, biopolímeros e outros (PARK et al., 2022). Ela permite a construção de um objeto 3D de forma controlada, permitindo assim a possível criação de formas complexas e personalizadas que podem ser difíceis ou até mesmo impossíveis de serem produzidas por outros meios (MAHMOOD et al., 2022).

Em bioengenharia, a manufatura aditiva tem várias aplicações graças à sua capacidade de criar estruturas complexas e personalizadas (TALIB et al., 2021). Essas estruturas incluem implantes e próteses personalizadas, modelagem anatômica, impressões 3D precisas, ferramentas cirúrgicas personalizadas e mais recentemente bioimpressão de miméticos de tecidos e órgãos (ilustrado pela Figura 4) como a construção de *scaffolds* (TAPPA; JAMMALAMADAKA, 2018). Neste caso, para os últimos exemplos citados, os principais componentes utilizados são os hidrogéis biocompatíveis.

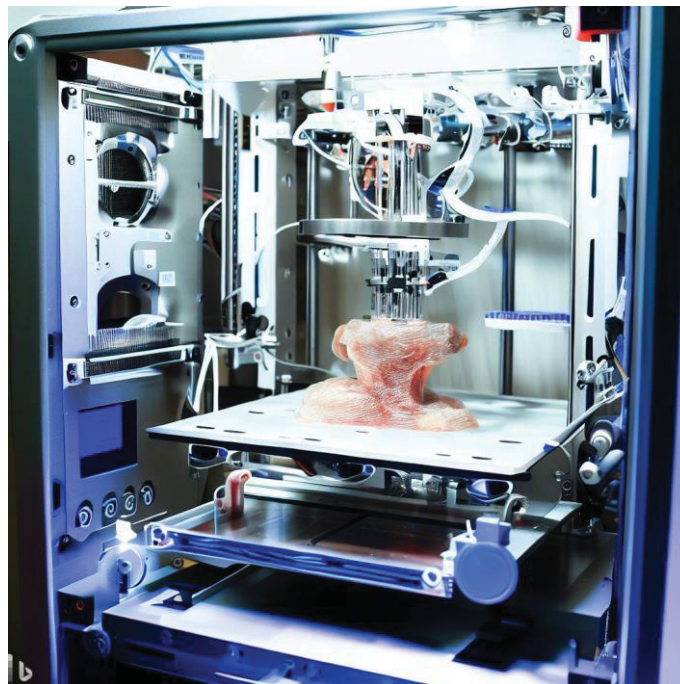


Figura 4. Ilustração de uma bioimpressora 3D construindo um mimético de órgão a partir de biopolímeros naturais. Imagem gerada pela inteligência artificial Bing.

À medida que a manufatura aditiva continua a revolucionar a criação de estruturas complexas com hidrogéis, uma abordagem complementar que tem ganhado destaque pela simplicidade técnica é a fiação úmida (PRADEEP; AND EDWIN RAJA DHAS, 2017). Devido às diversas maneiras e diferentes componentes que podem ser utilizados na produção de hidrogéis biocompatíveis e suas variadas aplicações, no campo biomédico, a construção de filamentos por fiação úmida vêm sendo uma vertente relevante no âmbito da engenharia de tecidos (CATOIRA et al., 2019; CHEN et al., 2016). A fiação úmida se destaca em relação a outras técnicas de bioconstrução por sua capacidade de criar estruturas contínuas e flexíveis, tornando-se uma alternativa promissora para aplicações que requerem características mecânicas específicas e um processo contínuo de fabricação (ROCHA et al., 2022).

1.6 FIAÇÃO ÚMIDA (DO INGLÊS *WET SPINNING*)

Essencialmente, o processo de fiação úmida se baseia na extrusão de uma solução de polímero em um solvente através de um orifício (fiandeira) em um banho químico, que é geralmente constituído por uma solução contendo o agente reticulador, o qual não dissolve o polímero e ainda possibilita que fibras e filamentos sejam formados (ilustrado pela figura 5) (YANG et al., 2017). Posteriormente a esta etapa, o material confeccionado pode ser lavado, estirado e processado para obter as propriedades desejadas (LUNDAHL et al., 2016).

A fiação úmida é um processo utilizado em diversas áreas e comumente empregado na bioengenharia e engenharia de tecidos. O principal uso envolve a construção de estruturas tridimensionais que mimetizem a matriz extracelular de tecidos, seja pela formação de *scaffolds*, como também estruturação em filamentos (COSTANTINI et al., 2019). Essas estruturas podem ser colonizadas por células vivas para criar tecidos funcionais em laboratório. Um exemplo de aplicação na bioengenharia é a criação de filamentos de colágeno por meio da fiação úmida. O colágeno é uma proteína importante na matriz extracelular dos tecidos biológicos, e filamentos formados por fibras de colágeno produzidas por fiação úmida podem ser utilizados para desenvolver *scaffolds* para regeneração de tecidos, engenharia de tecidos e aplicações médicas (YAARI et al., 2016).

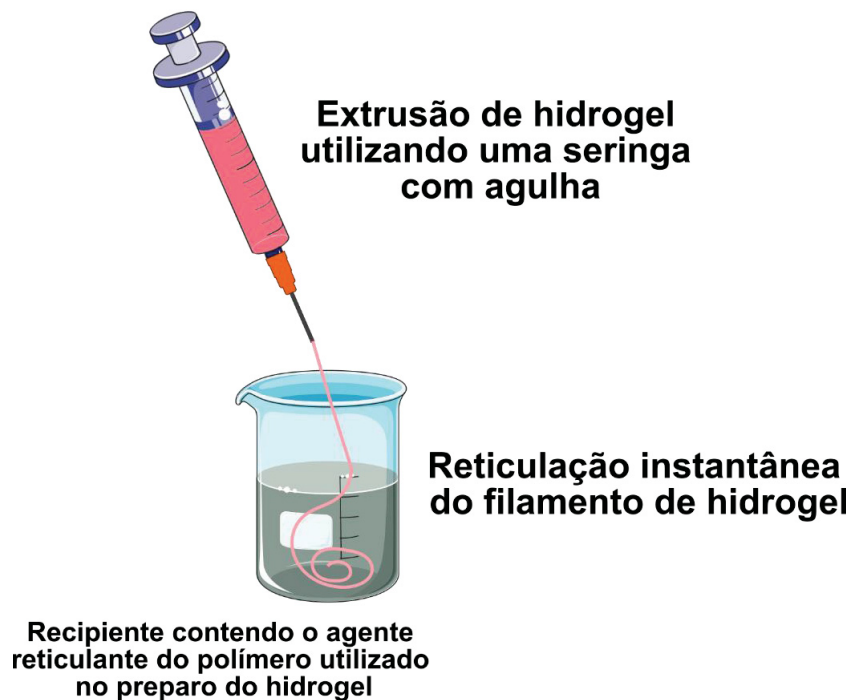


Figura 5. Representação esquemática do processo de fiação úmida. O agente reticulante quando banha o material extrusado promove de maneira instantânea a sua reticulação.

1.7 FILAMENTOS X FIBRAS

Na pesquisa científica, quando o termo "fibras" é mencionado geralmente se refere como a denominação para estruturas que são normalmente alongadas e finas, que essencialmente podem ser naturais ou sintéticas (KARIMAH et al., 2021). Fibras podem ser encontradas em diversos contextos, incluindo áreas como biologia, engenharia e ciência dos materiais. Em suma, suas composições podem ser de polímeros ou outros materiais, dependendo da sua aplicação (MANSOR et al., 2019). Geralmente elas são caracterizadas por suas propriedades físicas e químicas, como resistência à tração, elasticidade e durabilidade (PRADEEP; J, 2015).

Em contraste, ao se referir com o termo "filamentos", indicam-se estruturas finas e longas que têm um diâmetro uniforme e podem ser um tipo específico de fibras (GOKHIN et al., 2012), mas não raramente sendo tratados como sinônimos. Entretanto, este termo é mais frequentemente utilizado para descrever estruturas contínuas que podem ser enroladas ou trançadas, como filamentos de fibras têxteis ou filamentos de polímeros utilizados em impressão 3D (AHMED; SIRAJ; AL-MARZOUQI, 2021). Voltando os olhos para a pesquisa científica, os filamentos são

frequentemente estudados em contextos de engenharia de materiais, manufatura aditiva, tecidos e outros campos (WU et al., 2020).

Nesse contexto, a bioimpressão 3D é uma tecnologia de ponta que envolve o uso de biotintas contendo células vivas para criar estruturas tridimensionais. Os filamentos, ou fios de material, desempenham um papel crucial nesse processo, servindo como blocos de construção para a criação de estruturas teciduais (GUNGOR-OZKERIM, et al., 2017). Nisto, aplicam-se para a construção de *scaffolds*, estruturas vasculares, organoides e complexo mimético multimaterial (com diferentes tipos de filamentos) (P STENVINKEL, J PAINER, RJ JOHNSON, 2023). O seu uso no campo da bioimpressão 3D induz a uma rápida evolução com imenso potencial para revolucionar a medicina regenerativa, a descoberta de novos medicamentos e sobretudo na engenharia de tecidos. Assim, se disponibiliza a possibilidade de criar tecidos e órgãos personalizados para transplante e avançar a compreensão de processos biológicos complexos (LIN et al., 2021).

1.8 BIOMIMÉTICOS TECIDUAIS

Os tecidos biomiméticos referem-se a tecidos projetados para imitar a estrutura, função e comportamento dos tecidos biológicos naturais encontrados no corpo humano (STENVINKEL, et al., 2018). O termo "biomimético" vem de "bio" (vida) e "mimético" (imitar ou copiar), indicando que esses tecidos são criados para imitar as características e propriedades naturais dos tecidos nativos (ZAFAR et al., 2020). Esses materiais são desenvolvidos para criar ambientes artificiais que promovam a adesão, proliferação e diferenciação de células, para aplicação na engenharia de tecidos e a regeneração de órgãos (LIU et al., 2023).

Biomiméticos teciduais são desenvolvidos utilizando princípios da biologia, ciência dos materiais e engenharia. Eles geralmente envolvem o uso de biomateriais avançados, como hidrogéis à base de biopolímeros, juntamente com técnicas como bioimpressão 3D e fiação úmida, além de diversas metodologias em engenharia de tecidos e cultura de células (DELL et al., 2022). Essencialmente, o objetivo é replicar a complexidade e as funções de tecidos vivos para várias aplicações, incluindo medicina regenerativa, testes de novos fármacos, modelagem de doenças e outros (LEHMANN et al., 2019).

As principais características que abrangem os tecidos biomiméticos são a microarquitetura que conseguem replicar, funcionalidade, capacidade de celularização e vascularização, propriedades mecânicas e reológicas semelhantes aos tecidos naturais, incluindo rigidez, elasticidade e força de deformação (VYAS et al., 2017). Uma ilustração que identifica essas características é mostrada na Figura 6.

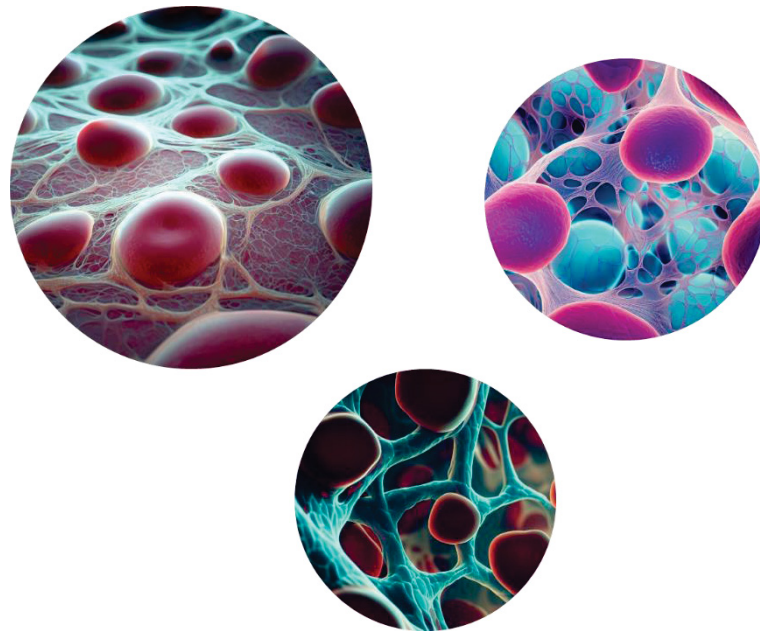


Figura 6. Ilustração tecidos biomiméticos evidenciando a capacidade de celularização e vascularização. Imagem gerada pela inteligência artificial Bing.

Os tecidos biomiméticos têm o potencial de revolucionar a medicina, fornecendo modelos mais precisos para testes de drogas, avançando a compreensão dos mecanismos de doenças e oferecendo soluções para reparo e substituição de tecidos e órgãos (LIU et al., 2023). À medida que a tecnologia continua a progredir, o desenvolvimento de tecidos biomiméticos promete criar substitutos funcionais para tecidos e órgãos danificados, principalmente quando associados a ferramentas que auxiliam o desenvolvimento de novas pesquisas (HAN et al., 2023), incluindo a inteligência artificial.

1.9 INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

A inteligência artificial (IA) é um campo da ciência da computação focado na criação de sistemas e algoritmos que podem imitar a inteligência humana para realizar

tarefas como resolução de problemas, tomada de decisões e reconhecimento de padrões (SOORI; AREZOO; DASTRES, 2023), como ilustrado na Figura 7. Uma das aplicações relevantes da IA é na previsão de imagens, também conhecida como reconhecimento de imagens ou visão computacional. Isto envolve o uso de técnicas de aprendizado de máquina, particularmente redes neurais profundas, para analisar e interpretar dados visuais, permitindo que os computadores entendam, classifiquem e façam previsões com base em imagens ou vídeos (TAYE, 2023).



Figura 7. Ilustração de uma IA que pode ser utilizada imitando a inteligência humana para realizar tarefas como a capacidade de solucionar desafios, tomar decisões e identificar padrões. Imagem gerada pela inteligência artificial Bing.

O uso da IA na previsão de imagens encontrou aplicações generalizadas em vários setores. Na área da saúde, os algoritmos de IA podem auxiliar os profissionais médicos no diagnóstico de doenças, analisando imagens médicas como raios X, ressonâncias magnéticas e tomografias computadorizadas (AL-ANTARI, 2023). Além disso, a previsão de imagens por IA tem sido amplamente utilizada em indústrias como a manufatura para controle de qualidade, na agricultura para monitoramento de colheitas e no comércio eletrônico para sistemas de recomendação de produtos. Esses aplicativos contam com IA para analisar vastos conjuntos de dados de imagens e fornecer *insights* ou previsões valiosas (JAVAID et al., 2023).

No geral, a IA revolucionou a previsão de imagens, permitindo que os computadores compreendam os dados visuais, e as suas aplicações abrangem vários setores, melhorando a eficiência, a precisão e os processos de tomada de decisão (SOORI; AREZOO; DASTRES, 2023).

2 JUSTIFICATIVA

O avanço da tecnologia tem desempenhado um papel fundamental na busca por alternativas eficientes e sustentáveis no campo de biomateriais e da engenharia de tecidos. Nesse contexto, a utilização de filamentos de hidrogéis biopoliméricos tem se destacado como uma abordagem promissora para a incorporação de células e a criação de tecidos funcionais.

Os hidrogéis biopoliméricos são materiais que apresentam alta biocompatibilidade e semelhança estrutural com o ambiente biológico, tornando-os arquétipos ideais para aplicações biomédicas, como a fiação úmida e a bioimpressão 3D de tecidos. O desenvolvimento desses hidrogéis por meio de desenhos experimentais robustos permite ajustar suas propriedades físicas e químicas de acordo com as necessidades específicas do tecido-alvo, garantindo a formação de estruturas 3D coerentes e funcionalmente competentes.

A produção de hidrogéis biopoliméricos por meio da técnica de fiação úmida oferece vantagens significativas. Essa abordagem permite a criação de filamentos contínuos com diâmetros variáveis, imitando a complexa rede de matriz extracelular de tecidos naturais. Além disso, a fiação úmida é uma técnica suave que preserva a integridade das macromoléculas biopoliméricas, resultando em hidrogéis com melhores características bioativas e biomecânicas quando comparados àqueles obtidos por outras técnicas.

Técnicas que investigam as propriedades mecânicas são de extrema importância para a caracterização de filamentos produzidos com hidrogéis. A resistência, a elasticidade, a capacidade de suportar cargas mecânicas e a rugosidade de superfície são características essenciais para garantir que filamentos possam ser manipulados e integrados de maneira eficaz nos processos de biofabricação 3D e na funcionalidade final de um tecido desenvolvido.

Portanto, são consideradas etapas essenciais desta pesquisa as investigações sobre:

- I. Realização de desenhos experimentais para a formulação dos hidrogéis, permitindo ajustes específicos das propriedades físicas e químicas;
- II. Aplicação de técnicas analíticas em alta resolução para investigar as propriedades mecânicas dos filamentos produzidos através de um extensor eletromecânico e microscopia de força atômica (MFA);

III. Avaliação morfológica dos filamentos de hidrogéis produzidos e estirados mecanicamente, na ausência ou presença de células incorporadas.

Em vista disto, este estudo propõe principalmente a utilização de filamentos de hidrogéis biopoliméricos, produzidos através da técnica de fiação úmida a partir de desenhos experimentais sofisticados, como base para a biofabricação de tecidos e possibilidade da incorporação controlada de células em ambiente biomecânico adequado. Assim, por meio dessa abordagem inovadora, haverá uma contribuição expressiva para o desenvolvimento de tecidos funcionais em laboratório, com aplicações que vão desde a medicina regenerativa até a produção de modelos de doenças para testes farmacológicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de hidrogéis formulados com polímeros naturais, alginato de sódio e gelatina em diferentes concentrações, para confeccionar filamentos biopoliméricos resistentes à tração eletromecânica, sua ação reológica e biomecânica para suporte celular e utilização do aprendizado de máquina para classificação de imagens de microscopia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir hidrogéis com três diferentes composições, variando as concentrações de gelatina, alginato de sódio e cloreto de cálcio utilizando uma plataforma de Desenho Experimental (Capítulo I);
- b) Caracterizar as propriedades micro- e nanomecânicas dos filamentos produzidos utilizando a extensometria e a microscopia de força atômica (Capítulo I);
- c) Avaliar a tração eletromecânica dos filamentos extrusados com diferentes calibres de agulhas e a estabilidade do material ao longo do tempo (Capítulo II);
- d) Avaliar a diferença da tração eletromecânica entre os filamentos extrusados manualmente ou automaticamente utilizando uma bioimpressora 3D (Capítulo II);
- e) Produzir hidrogéis e avaliar sua esterilidade após construção e simulação de transporte (Capítulo III);
- f) Caracterizar morfologicamente os filamentos de hidrogéis utilizando a microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (Capítulo III);
- g) Utilizar a inteligência artificial para aprendizagem e predição das imagens histológicas dos filamentos de hidrogéis, diferenciando aqueles estirados dos não estirados pela morfologia (Capítulo III);
- h) Avaliar e caracterizar as propriedades micro- e nanomecânicas dos filamentos celularizados utilizando a extensora eletromecânica e a microscopia de força atômica (Capítulo III);
- i) Construir um banco de imagens a partir da microscopia de luz para utilização ao aprendizado de máquina (Capítulo III).

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE BIOPOLÍMEROS E CONCENTRAÇÃO DE AGENTE DE RETICULAÇÃO (*CROSSLINKING*) NA MODULAÇÃO DAS PROPRIEDADES MICRO- E NANOMECÂNICAS DE FILAMENTOS À BASE DE HIDROGEL

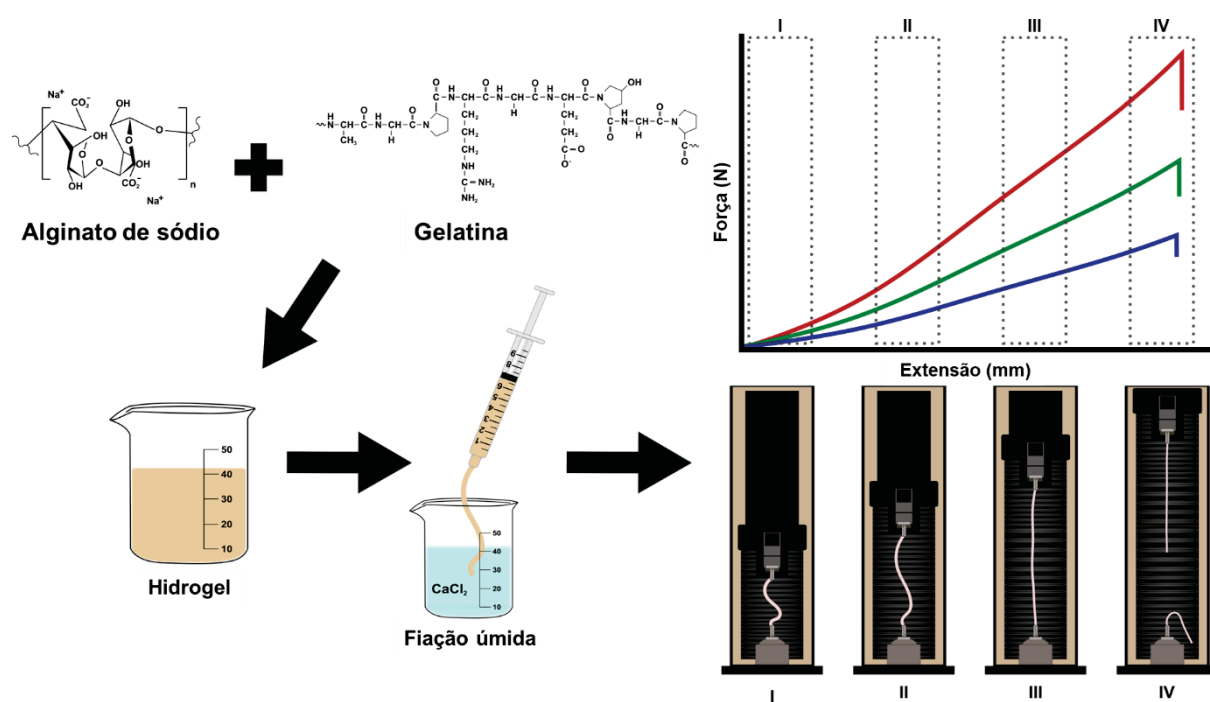


Figura I-1. Resumo gráfico apresentando as etapas desde a combinação dos biopolímeros alginato de sódio e gelatina, sua solubilização, produção dos filamentos utilizando a fiação úmida e o processo de estiramento mecânico para caracterização das propriedades do biomaterial

RESUMO

Hidrogéis são utilizados em diversas áreas e perspectivas, ampliando oportunidades para inovação em seu uso. A variação das concentrações de biopolímeros, relaciona-se diretamente com as características finais de hidrogéis biopoliméricos. O objetivo deste capítulo foi confeccionar filamentos de hidrogéis à base de biopolímeros e agente reticulante, a partir de um delineamento experimental. Filamentos de hidrogel foram fabricados utilizando a técnica de fiação úmida e construídos a partir de variações nas concentrações de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio (crosslinker). A combinação de concentrações de biopolímeros foi definida utilizando desenho de experimentos (DoE). As análises da resistência à tração e à verticalidade dos filamentos foram avaliadas utilizando um extensor eletromecânico. A rugosidade, viscoelasticidade, retração e deflexão dos hidrogéis foram avaliadas por microscopia de força atômica e espectroscopia de força. Quinze combinações diferentes de biopolímeros e reticulantes foram geradas pelo DoE para produzir os hidrogéis. Os filamentos dos hidrogéis apresentaram variações na tração eletromecânica (kPa), gerando picos de tensão distintos relacionados às concentrações dos constituintes. Destas, sete apresentaram maior resistência à tração eletromecânica, quando o meio de cultivo celular DMEM foi utilizado como agente solubilizante dos biopolímeros e foram selecionadas para os próximos passos. Em seguida, diferentes nanorrugosidades foram observadas nos materiais testados, e o maior módulo de Young (elasticidade) foi observado nas combinações com maiores concentrações de alginato de sódio e gelatina. As análises das curvas de força-distância forneceram informações valiosas sobre as propriedades mecânicas dos hidrogéis analisados, em que foi observado uma heterogeneidade entre as combinações, implicando em variação nas curvas obtidas conforme atributos dos biomateriais. Este estudo mostra que a avaliação de variadas proporções de biopolímeros e concentração de agente de reticulação podem modular as propriedades nanoestruturais, micro- e nanomecânicas de filamentos biopoliméricos com vistas a determinada aplicação pretendida.

Palavras-chave: Design de experimentos, filamentos, alginato, gelatina, módulo de Young.

ABSTRACT

Hydrogels are used in various fields and perspectives, expanding opportunities for innovation in their use. The variation in biopolymer concentrations is directly related to the final characteristics of biopolymeric hydrogels. The objective of this chapter was to manufacture hydrogel filaments based on biopolymers and a cross-linking agent using an experimental design. Hydrogel filaments were manufactured using the wet spinning technique, and they were constructed based on variations in the concentrations of sodium alginate, gelatin, and calcium chloride (cross-linker). The combination of biopolymer concentrations was defined using a Design of Experiments (DoE) approach. Tensile strength and filament verticality analyses were conducted using an electromechanical extensometer. Roughness, viscoelasticity, shrinkage, and deflection of the hydrogels were assessed through atomic force microscopy and force spectroscopy. Fifteen different combinations of biopolymers and cross-linking agents were generated by DoE to produce the hydrogels. The hydrogel filaments exhibited variations in electromechanical tensile strength (kPa), resulting in distinct stress peaks related to the constituent concentrations. Of these, seven demonstrated higher electromechanical tensile strength when the cell culture medium DMEM was used as the biopolymer solubilizing agent and were selected for further steps. Subsequently, different nanoroughness levels were observed in the tested materials, and the highest Young's modulus (elasticity) was observed in combinations with higher concentrations of sodium alginate and gelatin. Analyses of force-distance curves provided valuable information about the mechanical properties of the analyzed hydrogels, revealing heterogeneity among the combinations, resulting in variation in the obtained curves based on biomaterial attributes. This study demonstrates that the assessment of various biopolymer ratios and cross-linking agent concentrations can modulate the nanostructural, micro-, and nanomechanical properties of biopolymeric filaments with a view to a specific intended application.

Key words: Design of experiments; filaments; alginate; gelatine; Young's modulus.

1 INTRODUÇÃO

Hidrogéis, por definição, são materiais compostos por cadeias poliméricas hidrofílicas, que são tipicamente organizadas como um gel coloidal no qual a água é o meio dispersante, e são produzidos pela simples reação de um ou mais tipo(s) de monômero/polímero/unidades de reticulação (AHMED, 2015a; WARREN et al., 2017). Esses materiais são tridimensionais (3D), reticulados e estruturados como redes poliméricas capazes de reter uma grande quantidade de água e outros fluidos biológicos em seu estado inchado (SHAHZAMANI et al., 2020; SONG et al., 2020). As composições e variações de concentrações de polímeros utilizados em hidrogéis dependem da aplicação pretendida (CORREA et al., 2021).

Para formar hidrogéis, é necessário associar um ou mais polímeros a um agente de reticulação, que aumenta sua insolubilidade em água por meio de interações iônicas e ligações de hidrogênio (MANTHA et al., 2019; NASUTION et al., 2022), essenciais para a resistência mecânica e integridade física dos hidrogéis poliméricos (LU et al., 2017; NICHIFOR, 2023). Atualmente, uma grande variedade de métodos tem sido utilizada para estabelecer reticulação apropriada para a preparação de hidrogéis (AHMAD et al., 2022). Essencialmente, esses agentes que atuam como reticulantes das matrizes poliméricas são divididos em dois grupos: físicos (como luz UV e temperatura) e químicos (como moléculas que formam ligações covalentes entre as repetições do polímero e as variações de pH) (BASHIR et al., 2020; HO et al., 2022).

Atualmente, hidrogéis estão sendo aplicados a aditivos alimentares (MANCHA SÁNCHEZ et al., 2020), produtos farmacêuticos (JACOB et al., 2021), implantes biomédicos (ASWATHY; NARENDRAKUMAR; MANJUBALA, 2020), engenharia de tecidos (SPICER, 2020), mobilidade celular e encapsulamento (BALION et al., 2020), biossensores e dispositivos microeletromecânicos (LIU et al., 2019). Nesse sentido, hidrogéis têm sido utilizados em várias aplicações, como a produção de músculos artificiais (PARK; KIM, 2020), administração controlada de fármacos (VIGATA et al., 2020), lentes de contato (ZHAO et al., 2021), curativos de feridas e materiais superabsorventes (OLADOSU et al., 2022).

Hoje, hidrogéis sólidos são os candidatos mais promissores que podem imitar as propriedades físicas, químicas, elétricas e biológicas da maioria dos tecidos, proporcionando uma arquitetura complexa e microambiente celular essencial

(NIKOLOVA; CHAVALI, 2019). Além disso, a maioria dos hidrogéis é composta por polissacarídeos naturais (RAZA et al., 2018) e/ou proteínas/peptídeos naturais ou sintéticos (VASILE et al., 2020). Os principais componentes utilizados na produção de hidrogéis formados a partir de substâncias naturais incluem colágeno, gelatina, fibrina e derivados de outros biopolímeros naturais, como quitosana, celulose, alginato e agarose (ABASALIZADEH et al., 2020).

Dentre os componentes moleculares utilizados para o preparo de hidrogéis, os polissacarídeos apresentam propriedades e características desejáveis, como não toxicidade, solubilidade em água, alta capacidade de inchaço (intumescência) e uma variedade de estruturas químicas baseadas em grupos funcionais (PASQUI; DE CAGNA; BARBUCCI, 2012; SONG et al., 2018). Além disso, os polissacarídeos são biocompatíveis, biodegradáveis, bioestáveis, abundantes e frequentemente suscetíveis à hidrólise por enzimas presentes no corpo humano (CATOIRA et al., 2019). Devido às diversas formas e diferentes componentes que podem ser utilizados na produção de hidrogéis biocompatíveis e suas diversas aplicações no campo biomédico, a construção de fibras e filamentos tem sido um aspecto relevante na engenharia de tecidos (MIRABEDINI, 2017).

Vários tipos de filamentos têm sido confeccionados por meio de técnicas como fusão, fiação a seco, eletrofiação ou fiação úmida (LEE; PATHAK; JEONG, 2019). Entre eles, a técnica de fiação úmida é amplamente utilizada como um método clássico para a preparação de matrizes à base de filamentos na engenharia de tecidos. Além disso, a fiação úmida é uma técnica para fabricar filamentos poliméricos a partir de biopolímeros em solução. Durante a fiação úmida, a fiandeira (tipicamente uma agulha acoplada a uma seringa) é submersa em um banho químico e os filamentos subsequentemente solidificam e precipitam a partir da solução polimérica comumente empregando agentes de reticulação (ALJOHANI et al., 2017).

Ao contrário de outras técnicas, a fiação úmida tem muitas vantagens, como simplicidade, velocidade, custo baixo, condições moderadas e alto rendimento. Além disso, o diâmetro dos filamentos formados pela fiação úmida pode ser facilmente ajustado controlando os parâmetros de fiação, como composição do polímero, taxa de infusão, diâmetro de extrusão, etc (NGO et al., 2018). Além disso, os filamentos produzidos são fáceis de montar por extrusão manual ou robótica, ou mesmo empregando impressão 3D, para fabricar andaimes com estrutura filamentosa orientada em escala macro ou micro (NAGHIZADEH; KARKHANEH; KHOJASTEH,

2018). No entanto, ainda há necessidade de mais estudos na busca por filamentos de hidrogéis à base de inúmeros biopolímeros naturais que apresentem citocompatibilidade, ao mesmo tempo em que possibilitem um ambiente adequado não apenas para a manutenção celular, mas também para o crescimento e diferenciação. Assim, ainda existe uma lacuna, onde os hidrogéis biopoliméricos são utilizados em cultura celular 3D, incluindo o uso de filamentos biopoliméricos com células incorporadas e a indução para diferenciação celular utilizando estímulos físicos.

O objetivo deste capítulo foi produzir diversos hidrogéis com combinações distintas de proporções de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio obtidas por delineamento experimental, produzir filamentos utilizando fiação úmida e avaliar as propriedades micro- e nanomecânicas desses biomateriais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

As variações nas concentrações de biopolímeros e agente de reticulação a serem utilizadas na produção dos hidrogéis foram obtidas utilizando o software Chemoface® por meio de delineamento experimental do tipo composto central. A Tabela I-1 apresenta as variáveis independentes para as concentrações de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio, apresentadas e selecionadas a partir da literatura, assim como por experimentação inicial em bancada. Já a Tabela I-2 mostra as 17 combinações obtidas (oito pontos fatoriais (1-8), seis pontos axiais (9-14) e três pontos centrais idênticos (15-17)) pelo delineamento experimental gerado com auxílio do software.

Tabela I-1. Pontos máximos e mínimos para as variáveis independentes do delineamento experimental com alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio.

Variáveis independentes	(-1)	(+1)
Alginato de sódio (%)	3	7
Gelatina (%)	3	5
Cloreto de cálcio (%)	1	3

Tabela I-2. Delineamento experimental do tipo composto central com as variáveis independentes sendo as concentrações relativas iniciais (% p/v) de soluções de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio.

Identificação	Alginato de sódio (%)	Gelatina (%)	CaCl ₂ (%)	
1	3	3	1	Pontos Fatoriais
2	3	3	3	
3	3	5	1	
4	3	5	3	
5	7	3	1	
6	7	3	3	
7	7	5	1	
8	7	5	3	
9	1,6364	4	2	Pontos axiais
10	8,3636	4	2	
11	5	2,3182	2	
12	5	5,6818	2	
13	5	4	0,318	
14	5	4	3,6818	Pontos centrais
15	5	4	2	
16	5	4	2	
17	5	4	2	

2.2. PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS

Os hidrogéis foram preparados a partir de combinações dos biopolímeros alginato de sódio (CRQ, Brasil) e gelatina (Vetec, Brasil) de acordo com o desenho experimental apresentado na seção 2.1. Três diferentes solventes (água ultrapura – tipo I, solução tampão fosfato salina – PBS e meio de Eagle Modificado por Dulbecco – DMEM) foram utilizados para a solubilização. Em temperatura ambiente, um béquer de vidro (Pyrex®, EUA) foi colocado em uma placa de agitação magnética (Lucadema, Brasil), onde o alginato de sódio foi adicionado para solubilização em cada solvente, seguido pelo aquecimento. A gelatina foi adicionada ao mesmo béquer, e

gradualmente a temperatura foi aumentada para aproximadamente 40°C por 30 minutos, até que a solubilização completa e a homogeneidade fossem alcançadas. Posteriormente, os hidrogéis foram armazenados a temperatura ambiente em seringas descartáveis de 10 mL (SR[®] Ltda, Brasil) e identificados.

2.3. PRODUÇÃO DOS FILAMENTOS DE HIDROGÉIS

Os hidrogéis foram transferidos para uma seringa de 1 mL (Embramac[®], Brasil) e, em seguida, por extrusão manual, foram depositados filamentos, os quais foram produzidos em béqueres de vidro contendo uma solução de agente reticulante cloreto de cálcio (Dinâmica, Brasil), pela técnica de fiação úmida (Figura I-2). Os filamentos foram mantidos imersos por aproximadamente 10-15 minutos e lavados com PBS. Posteriormente, os filamentos foram colocados em toalhas de papel e secos suavemente.

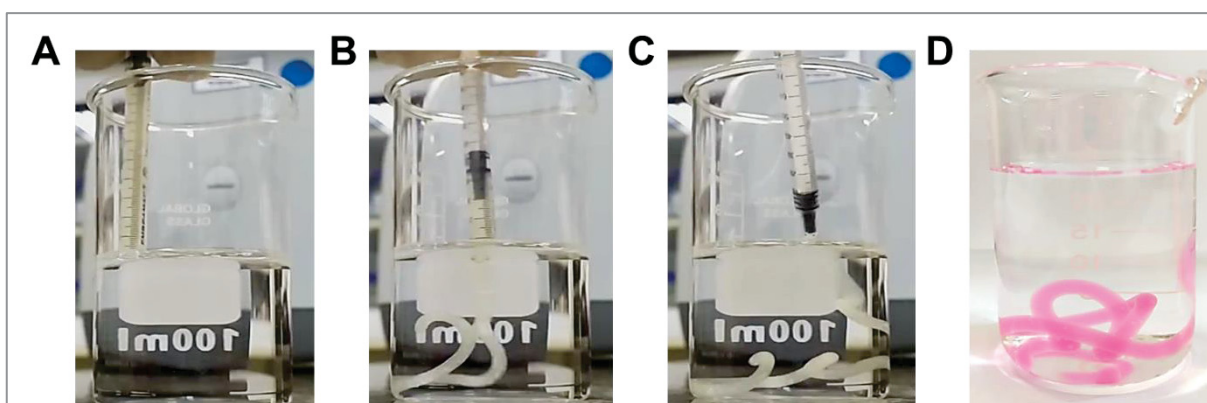


Figura I-2. Demonstração da extrusão manual utilizando seringas. (A) Inserção da seringa em CaCl₂. (B) Extrusão inicial do hidrogel. (C) Formação do filamento após a finalização da extrusão do hidrogel no agente reticulante. (D) Exemplo de filamento produzido com meio DMEM como agente solubilizando dos biopolímeros.

2.4. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO ELETROMECÂNICA DOS FILAMENTOS

A resistência à tração e a resistência à tensão vertical dos filamentos foram avaliadas utilizando um extensor eletromecânico acoplado a uma célula de carga (MTS Insight[®], EUA), mostrado na Figura I-3. Os filamentos, medindo 12 cm de comprimento × 2,5 mm de largura, foram acondicionados pelas extremidades e os

testes foram realizados em triplicata, protegendo os filamentos com papel e fita adesiva nas garras do equipamento. As amostras foram submetidas à tração utilizando o software TestWorks® 4.10 a uma velocidade de 10 mm/minuto até a ruptura, medindo a carga máxima suportada por cada filamento de hidrogel, a taxa de alongamento, o pico de tensão e o módulo de elasticidade. Os dados obtidos foram coletados e analisados estatisticamente.

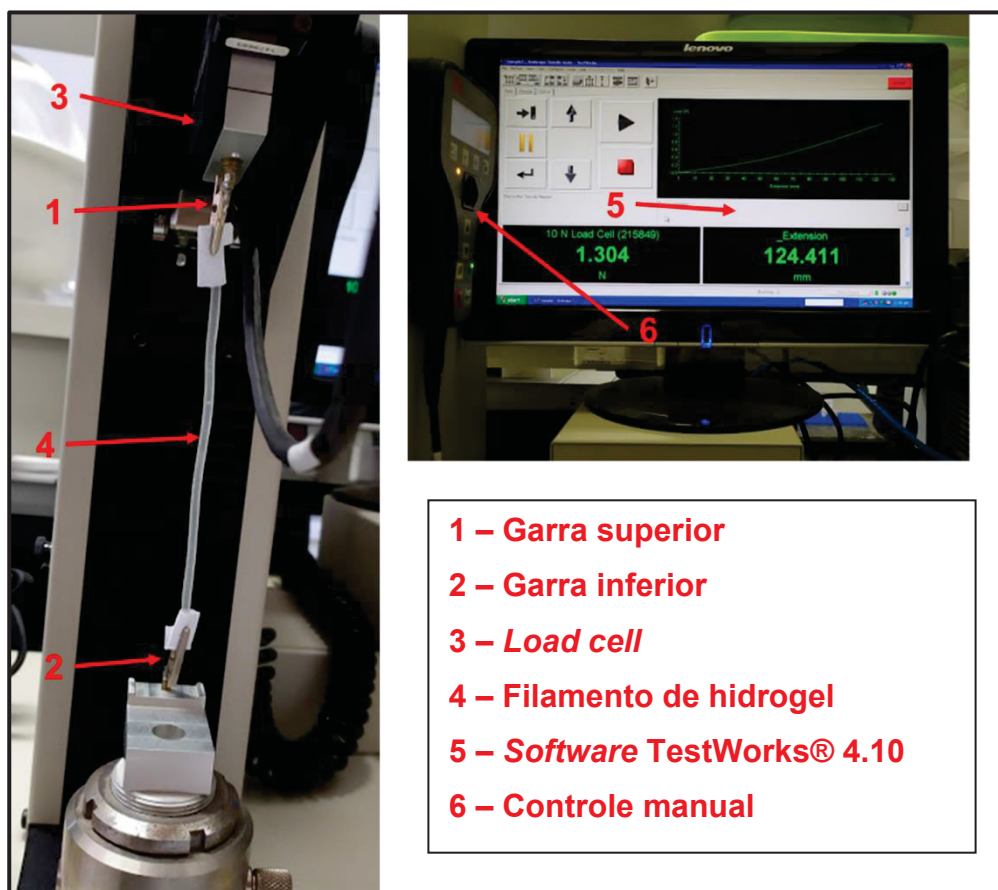


Figura I-3. Imagens fotográficas mostrando as estruturas que compõem a extensora eletromecânica utilizada (software e hardware). (1) e (2) representam as garras superiores e inferiores, respectivamente, nas quais os filamentos são mantidos; (3) identifica a parte no equipamento (célula) que é responsável por realizar o movimento mecânico para tração da fibra; (4) mostra a colocação do material a sofrer a deformação pela força exercida no equipamento; (5) apresenta a tela principal do software TestWorks®4.10 utilizado; (6) representa o controle manual do equipamento.

2.5. CARACTERIZAÇÃO DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE DE HIDROGÉIS POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Amostras dos hidrogéis foram depositadas em lâminulas de vidro circulares de 10 mm de diâmetro e analisadas utilizando um microscópio de força atômica comercial SPM-9600 (Shimadzu, Kyoto, Japão) operando no modo dinâmico (fase). O escâner utilizado percorre até 125 μm nas direções XY e 7 μm na direção Z. As imagens de topografia (altura) foram obtidas em temperatura ambiente (22°C) e umidade relativa de aproximadamente 40-50%. As áreas das imagens adquiridas foram de até 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ em formato quadrado, obtidas a uma taxa de varredura de 1 Hz. Procedimentos de traço e retraço foram realizados para garantir a integridade da amostra durante a aquisição das imagens. Todas as imagens obtidas continham 512 $\times$ 512 pontos de dados e foram processadas offline utilizando o software SPM-9600 (Shimadzu, Kyoto, Japão). O processamento incluiu correção planar, nivelamento automático das linhas no eixo X e correção de linhas. Após o processamento, análises de superfície foram conduzidas, e os parâmetros de nanorrugosidade foram obtidos, incluindo rugosidade média aritmética (R_a), altura máxima (R_z), rugosidade média de 10 pontos (R_{zj10}), rugosidade quadrática média (R_q), altura média (R_p) e profundidade média (R_v).

2.6. CURVAS DE FORÇA DE HIDROGÉIS POR ESPECTROSCOPIA DE FORÇA

Para analisar as forças de interação superficial dos hidrogéis, o mesmo instrumento de MFA comercial foi utilizado para medidas de espectroscopia de força no modo de contato. Foi empregada uma ponteira (sonda) piramidal de nitreto de silício com um raio de curvatura inferior a 20 nm. Um cantilever com comprimento de 200 μm , constante de mola de 0,15 N/m e frequência de ressonância de aproximadamente 24 kHz foi utilizado para adquirir curvas de força em 25 pontos distintos de cada amostra. A taxa de aquisição foi de 1 Hz, e a tensão de operação foi de 3 V. O software *Scanning Probe Image Processor* (versão 5.0, Image Metrology, Lyngby, Dinamarca) foi utilizado, ajustando os parâmetros para uma constante de mola de 0,15 N/m e 23°C utilizando o modelo de indentação de cone de Sneddon.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Análise de Variância (ANOVA) com o teste de Tukey para comparação das médias e determinação da

significância estatística entre as características dos hidrogéis e filamentos produzidos em triplicata. Diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. O software PAST 3 foi utilizado para a análise (HAMMER, O. et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ANÁLISE DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO SUPOSTA PELOS FILAMENTOS PRODUZIDOS A PARTIR DOS DESENHOS EXPERIMENTAIS

Os filamentos produzidos a partir do delineamento experimental baseado em planejamento composto central apresentaram resultados variados para carga, pico de tensão, deformação na ruptura e módulo quando comparadas as 17 combinações distintas de biopolímeros/agente de reticulação e os agentes utilizados para a solubilização dos biopolímeros. A Figura I-4 apresenta os valores coletados após a tensão eletromecânica aplicada a cada filamento durante o teste. A Figura I-4A mostra os valores de força em carga (N) enquanto a Figura I-4B mostra os valores do pico de tensão (Pa) correspondentes à tensão máxima suportada até a ruptura. A Figura I-4C representa os valores de proporção de extensão (%), indicando o alongamento do material quando esticado até sua ruptura. Adicionalmente, a Figura I-4D exibe os valores de módulo (ksi), representando a tensão ou pressão resultante de uma força de um quilolibra atuando em uma área de uma polegada quadrada.

Observou-se que menores concentrações dos biopolímeros (alginato e gelatina) e agente de reticulação (cloreto de cálcio) resultaram em desempenho mecânico inferior em comparação com combinações com maiores concentrações de componentes. A combinação 9, em particular, apresentou completa instabilidade e fragilidade devido à sua concentração extremamente baixa de agente de reticulação. Uma concentração adequada de reticulante é de importância crucial para alcançar a estruturação ideal de hidrogéis biopoliméricos. No caso do processo de fiação úmida, a concentração de cloreto de cálcio afeta especificamente a resistência do filamento (KOPAČ, 2020). Por outro lado, as combinações 6, 8, 10, 11, 12, 14 e 15-17 demonstraram desempenho mecânico superior considerando os três agentes de solubilização de biopolímeros, pois foram capazes de suportar maiores tensões verticais durante os testes.

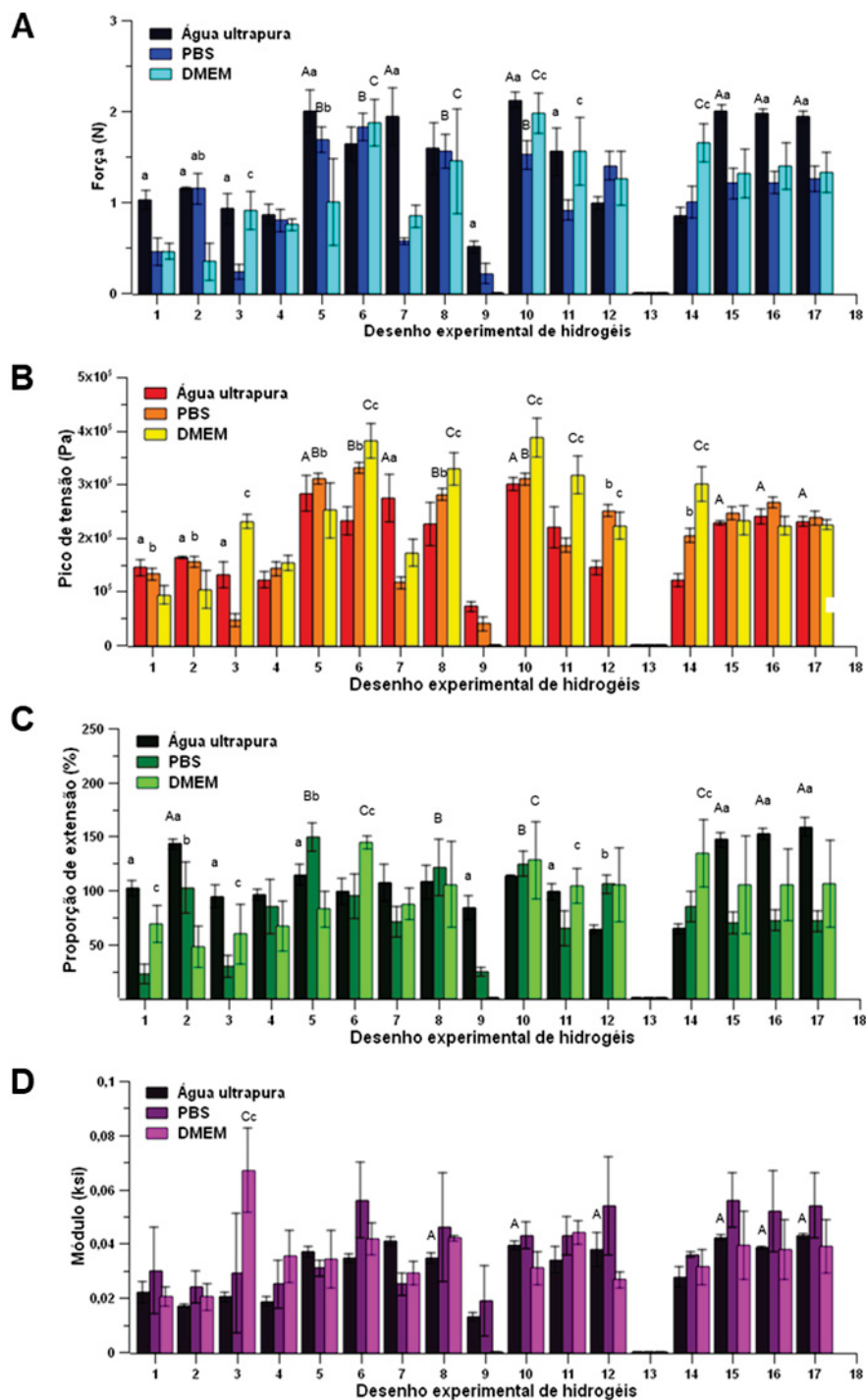


Figura I-4. Avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis produzidos por delineamento experimental, tendo como variáveis independentes alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio. (A) Força máxima; (B) Pico de tensão; (C) Tensão na ruptura; (D) Módulo. Análise estatística ($p < 0,05$): A = diferença estatística entre as combinações de água ultrapura; B = diferença estatística entre combinações de PBS; C = diferença estatística entre combinações de DMEM. a $\neq$ PBS e DMEM em cada combinação; b $\neq$ água ultrapura e DMEM em cada combinação; c $\neq$ água ultrapura e PBS em cada combinação.

A Figura I-5A (água ultrapura), I-5B (PBS) e I-5C (DMEM) mostram a superfície de resposta utilizando um modelo quadrático com os dados obtidos do pico de estresse das 17 combinações para cada agente solubilizante de biopolímero. Esta é uma representação gráfica 3D que ilustra como uma resposta (como uma propriedade química ou física) varia em relação a duas ou mais variáveis independentes. Isso permitiu a visualização de como diferentes combinações de variáveis independentes afetam uma resposta ou resultado específico, como os valores de carga, pico de tensão, tensão na ruptura e módulo. Observou-se que a coloração avermelhada corresponde à melhor combinação de biopolímeros e reticulante que conferem a característica de melhor resistência mecânica. Por outro lado, a cor mais azulada corresponde às combinações de menor resistência mecânica.

Nas Figuras I-6A-C é apresentada a representação gráfica das deformações dos filamentos durante a tração vertical aplicada pelo extensor eletromecânico, com base na razão de extensão. Consistente com os dados apresentados anteriormente, os biopolímeros solubilizados em água ultrapura (Figura I-6A) apresentam maior resistência à tração para os filamentos desenvolvidos. Por outro lado, filamentos formulados em PBS (Fig. I-6B) ou DMEM (Fig. I-6C) apresentaram menor resistência mecânica. O solvente no qual o material biopolimérico é solubilizado influencia diretamente nas propriedades mecânicas dos hidrogéis, principalmente devido à complexação em nível molecular, que pode resultar em alterações durante o processo de fabricação, como reticulação de filamentos (GUO et al., 2021; PAMPLONA et al., 2023).

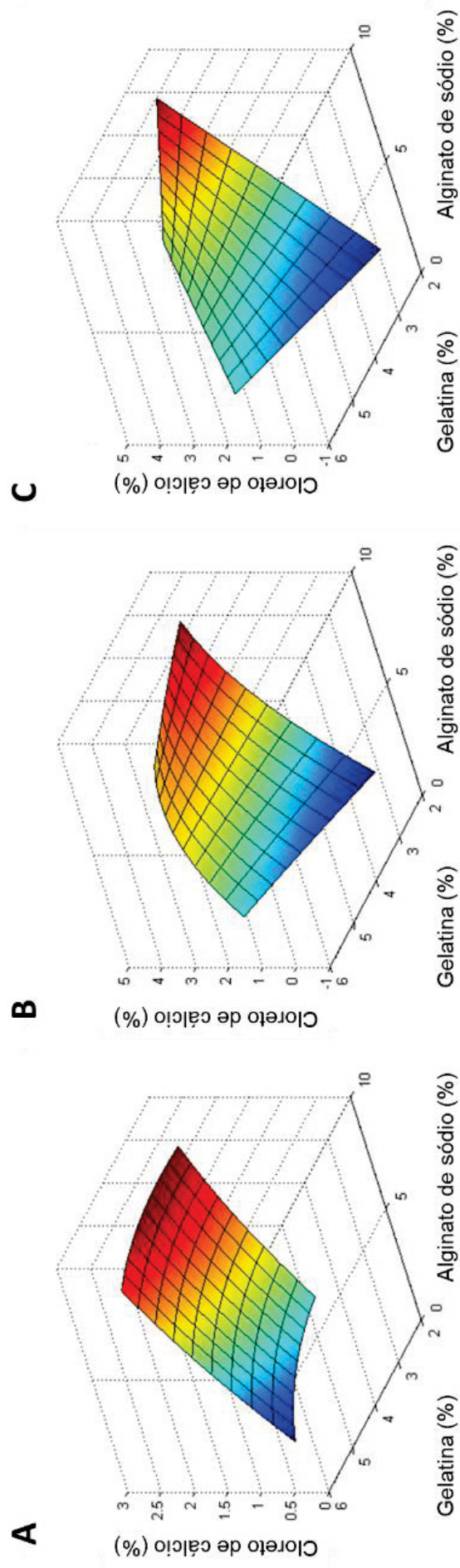


Figura I-5. Gráficos de superfície de resposta 3D pelo modelo quadrático a partir da avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis a partir do delineamento experimental, tendo como variáveis independentes alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio. (A) Superfície de resposta para filamentos de hidrogel produzidos com água ultrapura; (B) Superfície de resposta para filamentos de hidrogel produzidos com PBS; (C) Superfície de resposta para filamentos de hidrogel produzidos com DMEM;

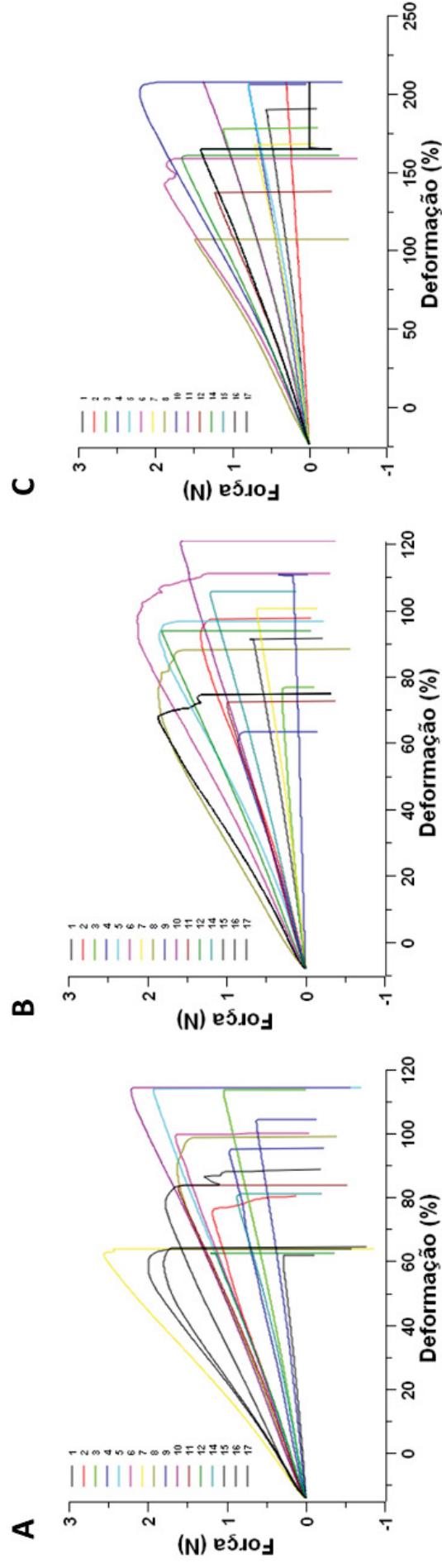


Figura I-6. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogel após o rompimento provocado pela extensora eletromecânica. A) Filamentos produzidos com hidrogéis produzidos com água ultrapura; B) Filamentos produzidos com hidrogéis produzidos com PBS; C) A) Filamentos produzidos com hidrogéis produzidos com DMEM. A deformação dos filamentos ocorre devido à aplicação de uma tensão vertical sobre cada amostra, resultando na força máxima suportada por cada uma até seu rompimento, resultando na queda abrupta nas linhas do gráfico.

Hidrogéis à base dos biopolímeros gelatina e alginato de sódio também podem ser formulados para interagir quimicamente uns com os outros. Isso pode ser conseguido por meio da introdução de grupos funcionais que permitem a formação de ligações covalentes ou iônicas diretamente entre os biopolímeros. Essas interações podem levar a uma estrutura de rede única, na qual as propriedades de ambos os biopolímeros podem ser combinadas ou alteradas (WANG et al., 2021). A combinação dos biopolímeros gelatina e alginato de sódio é formada por meio de uma reação conhecida como reação de base de Schiff entre os grupos aldeído do alginato e os grupos amino da gelatina. Além da gelatina, outros biopolímeros contendo grupos amino, como a quitosana e o colágeno, também podem ser empregados para ligação do tipo bases de Schiff com alginato. Além disso, foi demonstrado que a combinação de alginato de sódio e gelatina modulou a resistência mecânica e exibiu estabilidade em solução salina fisiológica (FARSHIDFAR; IRAVANI; VARMA, 2023).

Rinold et al. (2019), desenvolveram uma biotinta utilizando a técnica de fiação úmida, empregando uma combinação de alginato e gelatina metacrilada juntamente com a adição de células-tronco mesenquimais humanas de medula óssea. Aplicando estimulação eletromecânica, com e sem adição de hormônios, eles induziram com sucesso o processo de diferenciação em tenócitos (células encontradas em tendões humanos) (RINOLDI et al., 2019). Por outro lado, foi desenvolvida uma rede polimérica supramolecular que exhibe simultaneamente condutividade elétrica e propriedades miméticas de tecido. Em outro estudo, um hidrogel composto de poli(3,4-etilenodioxítiofeno):poli(estireno sulfonato) (PEDOT:PSS) conferiu elasticidade, compressibilidade e autorrecuperação da rede, mantendo simultaneamente um módulo de Young baixo (O'NEILL et al., 2023).

Como esperado, os filamentos produzidos com água ultrapura apresentaram desempenho mecânico superior conforme os dados avaliados, pois não continham nenhum fator que pudesse interferir nas ligações moleculares, assim como previamente sugerido por outros autores (JIAO et al., 2021). No entanto, os filamentos produzidos com PBS ou DMEM apresentaram menor desempenho mecânico, mas ainda demonstraram capacidade de suportar tensões eletromecânicas moderadas (1-2N e 20-40 kPa), mesmo com a presença de moléculas que fornecem tamponamento ou propriedades de nutrientes para cultura de células. Considerando que as aplicações desses materiais envolverão a incorporação futura de células vivas, os

hidrogéis produzidos utilizando o DMEM como agente solubilizante de biopolímeros foram selecionados para uma investigação mais aprofundada.

Os filamentos do desenho experimental realizado exibiram resultados diversos quanto à carga, pico de tensão, proporção de extensão e módulo de elasticidade, com combinações em proporções distintas e agentes de solubilização de biopolímeros variados. Concentrações mais baixas de biopolímeros e agente de reticulação levaram a um desempenho mecânico inferior, enquanto certas combinações demonstraram maior estabilidade sob tensão. Filamentos produzidos com água ultrapura apresentaram desempenho geral superior das propriedades mecânicas, enquanto aqueles com PBS ou DMEM mostraram tolerância à tensão moderada, apesar de que em algumas condições os resultados foram semelhantes aos da água. Então, o DMEM foi escolhido como agente de solubilização de biopolímeros para uma investigação mais aprofundada devido à potenciais aplicações envolvendo incorporação de células.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA TOPOGRAFIA E RUGOSIDADE DE HIDROGÉIS UTILIZANDO MFA

As imagens obtidas por MFA revelaram diferenças estruturais em nanoescala entre os hidrogéis selecionados para avaliação: DMEM-6, DMEM-8, DMEM-10, DMEM-11, DMEM-12, DMEM-14 e DMEM-15. As combinações DMEM-16 e DMEM-17, representantes do grupo do ponto central do desenho composto central, compartilham as mesmas características do DMEM-15. Cada amostra de hidrogel exibiu propriedades topográficas distintas, com variações em picos e vales, contribuindo para a rugosidade de cada material.

A Figura I-7 apresenta imagens representativas de altura em 3D obtidas por MFA, ilustrando a variação na topografia de cada amostra. Os hidrogéis DMEM-8, DMEM-10, DMEM-12 e DMEM-15 exibiram alturas máximas semelhantes, variando entre aproximadamente 300 e 400 nm, enquanto DMEM-6 e DMEM-11 apresentaram alturas máximas próximas a 500 nm. DMEM-14 apresentou-se como uma das superfícies mais lisas com a altura máxima em cerca de 150 nm. Estudos têm demonstrado que a topografia de hidrogéis à base de alginato variam entre 300 a 500 nm de altura devido às diferenças na concentração do agente reticulante, o que está de acordo com os presentes achados (AKBARZADEH SOLBU et al., 2022).

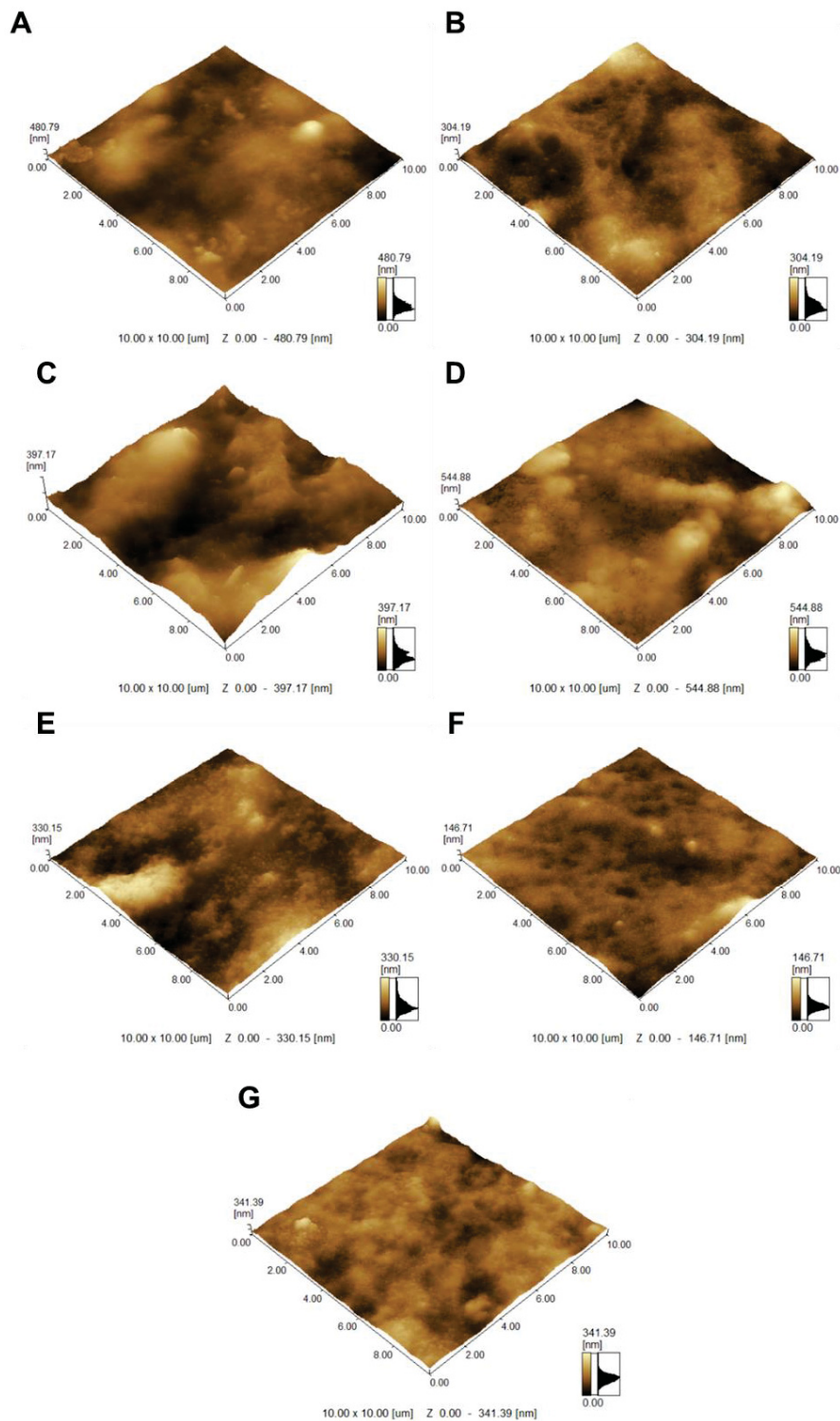


Figura I-7. Imagens topográficas de superfície 3D de hidrogéis selecionados utilizando MFA operada em modo dinâmico. (A) DMEM-6, (B) DMEM-8, (C) DMEM-10, (D) DMEM-11, (E) DMEM-12, (F) DMEM-14 e (G) DMEM-15. As regiões mais claras indicam maior altura (picos), enquanto as regiões mais escuras indicam maior profundidade (vales), representando a rugosidade do material.

Para Naghizadeh et al. (2018), a adição de gelatina e quitosana a hidrogéis de alginato modulou a altura topográfica entre 300 e 450 nm. Assim, a combinação e variação de diferentes concentrações de alginato de sódio, gelatina e cloreto de sódio podem influenciar a rugosidade dos hidrogéis analisados (ŁABOWSKA et al., 2021).

A Figura I-8 apresenta a caracterização quantitativa das superfícies de hidrogel realizada pela obtenção de parâmetros de rugosidade. Os parâmetros R_a e R_q indicaram uma planicidade da superfície, com os hidrogéis DMEM-14 e DMEM-15 apresentando valores mais baixos do que os outros hidrogéis. Já o parâmetro R_z revelou que DMEM-11 e DMEM-12 têm alturas máximas globais mais altas em comparação com os outros hidrogéis. Por outro lado, os parâmetros R_{zjis} e R_p apresentaram comportamento semelhante entre as amostras, com DMEM-8, DMEM-10, DMEM-11, DMEM-14 e DMEM-15 exibindo os valores maiores. Por fim, o parâmetro R_v demonstrou que DMEM-14 tem menor profundidade média dos vales presentes na superfície topográfica em comparação com os demais hidrogéis. Em ciência dos materiais, esses parâmetros relacionados à nanorrugosidade são importantes, pois desempenham um papel crucial na adesão de outros materiais ou mesmo de células vivas (JOSHI; HOMBURG; EHRMANN, 2022). Além disso, diferentes agentes de reticulação podem modular a nanorrugosidade dos hidrogéis, levando a características variadas, especialmente em termos de picos e vales observados utilizando MFA (VIRUMBRALES-MUÑOZ et al., 2019). Portanto, hidrogéis biopoliméricos com maiores concentrações de alginato de sódio e/ou gelatina, bem como cloreto de cálcio, apresentam características de nanorrugosidade semelhantes, que podem estar diretamente relacionadas à sua viscosidade e elasticidade (CUI; YAO; YIM, 2021; GOUDOULAS et al., 2023). Além disso, a nanorrugosidade desempenha um papel central nas medições de força (ŁABOWSKA et al., 2023).

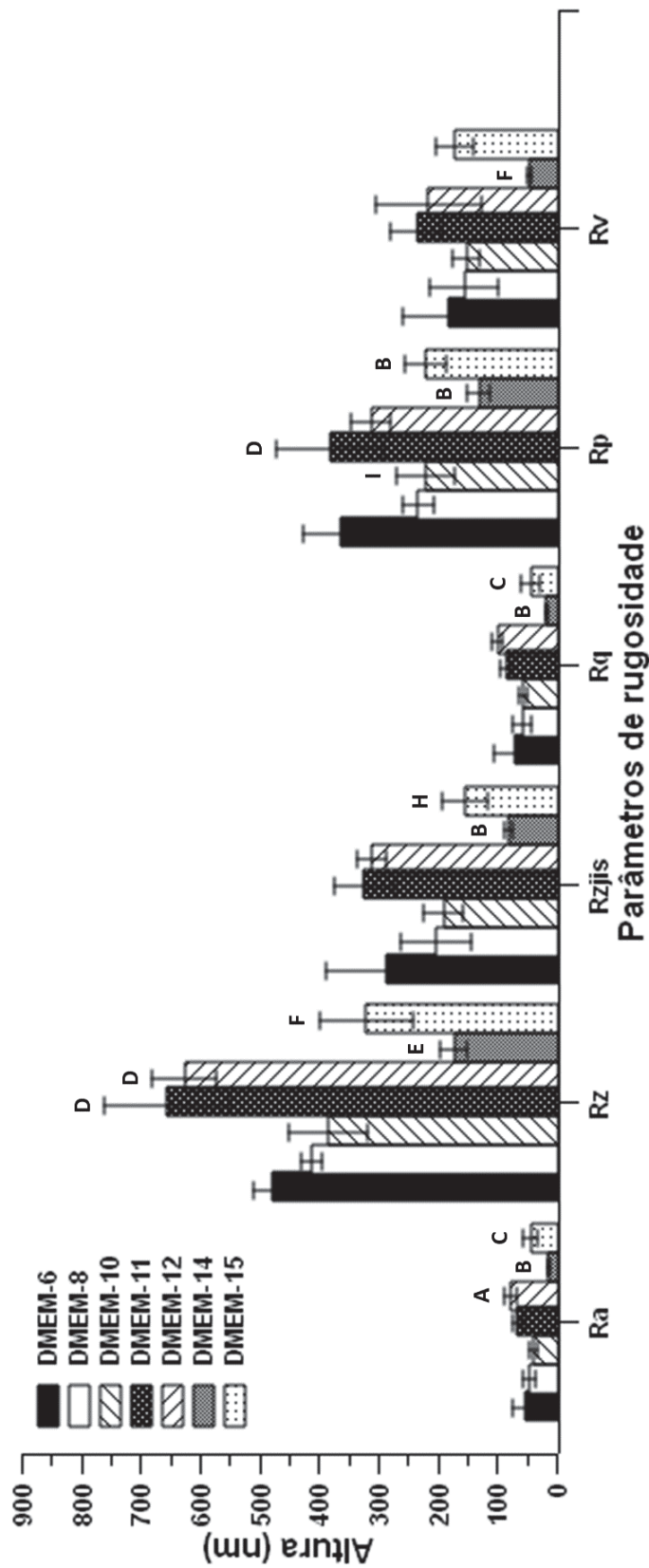


Figura I-8. Parâmetros de nanorugosidade de hidrogéis selecionados obtidos utilizando MFA. Os parâmetros incluem a rugosidade média aritmética (Ra), altura máxima (Rz), altura de dez pontos do perfil de rugosidade (Rzjs), rugosidade quadrática média (Rq), altura máxima dos picos do perfil (Rp) e profundidade máxima dos vales do perfil (Rv). Os resultados mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de hidrogel: A $\neq$ DMEM-10; B $\neq$ DMEM-6, 11 e 12; C $\neq$ DMEM-8 e 10; E $\neq$ DMEM-11; D $\neq$ DMEM-6, 8, 11 e 12; F $\neq$ DMEM-11 e 12; G $\neq$ DMEM-10 e 11; H $\neq$ DMEM-6, 11 e 12; e I $\neq$ DMEM-6.

As imagens obtidas por MFA revelaram variações topográficas entre os hidrogéis selecionados: DMEM-6, DMEM-8, DMEM-10, DMEM-11, DMEM-12, DMEM-14 e DMEM-15. Cada hidrogel exibiu características topográficas distintas, contribuindo para a nanorrugosidade dos biomateriais. A caracterização quantitativa utilizando parâmetros de nanorrugosidade mostra diferenças na planicidade e alturas (distribuição de picos e vales) da superfície topográfica entre os hidrogéis. Tais parâmetros são importantes para as propriedades adesivas do biomaterial, incluindo a propensão à adesão celular, e podem ser influenciados por agentes de reticulação. Nesse sentido, hidrogéis com maiores concentrações de alginato, gelatina e cloreto de cálcio exibiram nanorrugosidades semelhantes, relacionada à viscosidade e elasticidade, além de cruciais para medições de força.

3.3. ANÁLISE DAS CURVAS DE FORÇA-DISTÂNCIA E PROPRIEDADES MICRO- E NANOMECÂNICAS DE HIDROGÉIS

A Figura I-9 apresenta os dados obtidos a partir da análise das curvas de força-distância para cada hidrogel. A Figura I-9A mostra a força máxima de tração, indicando que todos os hidrogéis testados apresentaram valores semelhantes, com média de aproximadamente 90 nN. A Figura I-9B apresenta o toque de encaixe, que mostrou que os hidrogéis DMEM-11, DMEM-12, DMEM-14 e DMEM-15 apresentaram valores inferiores aos demais, com valores médios em torno de 0,5 nN. Esse resultado pode ser atribuído à maior concentração de gelatina em suas composições, o que lhes confere características mais viscosas. A Figura I-9C mostra a força de separação, revelando que os hidrogéis com maior viscosidade também apresentaram valores menores em relação aos demais, com valores médios em torno de 20 nN. A Figura I-9D representa a separação do desprendimento mostrando que apenas o hidrogel DMEM-11 exibiu um valor maior em comparação aos demais, com valor médio em torno de 10 nN. A Figura I-9E apresenta o módulo de Young, indicando que não houve diferença entre os hidrogéis, com valores médios de aproximadamente 5×10^8 Pa. Por fim, a Figura I-9F mostra a energia dissipada, onde apenas o DMEM-15 exibiu valor estatisticamente superior aos demais hidrogéis ($p < 0,05$), com valor médio em torno de $2,5 \times 10^{-15}$ J.

Embora diversos hidrogéis biopoliméricos tenham sido amplamente estudados, testes envolvendo a obtenção de curvas de força-distância são escassos

na literatura para fins de comparação com os estudos desenvolvidos. No entanto, a presente investigação revela que as superfícies de hidrogel exibem propriedades nanomecânicas semelhantes, incluindo rigidez, adesão, elasticidade e dissipação de energia. Essas características foram determinadas por meio de medidas de curvas de força-distância ajustadas com a equação de Hertz, principalmente para avaliar o módulo de elasticidade de cada biomaterial, como já realizado anteriormente para outros materiais (BARBOSA; SILVA, 2013). O presente estudo se concentrou em medir o comportamento da dureza superficial das amostras, calculando a força de carga máxima aplicada durante a etapa de indentação em uma avaliação da curva de força-distância.

O módulo de Young, também conhecido como módulo de elasticidade, é uma medida da rigidez de um material. Ele descreve a capacidade de resistir à deformação elástica quando submetido a forças de tração ou compressão (ERIK SJØNTOFT, 1987). Essencialmente o módulo de Young é a razão entre o aumento relativo do estresse (força aplicada por unidade de área) e o aumento relativo da deformação (mudança de comprimento por unidade de comprimento original), dentro da região elástica do material. De forma comparativa, a tabela I-3 exemplifica os valores do módulo de Young de alguns tipos de tecidos já estudados e disponíveis no estado da arte da literatura científica. Os valores obtidos utilizando a MFA mostraram que os módulos de Young dos biomateriais desenvolvidos são próximos àqueles de tecidos da córnea, fibra muscular e tendão.

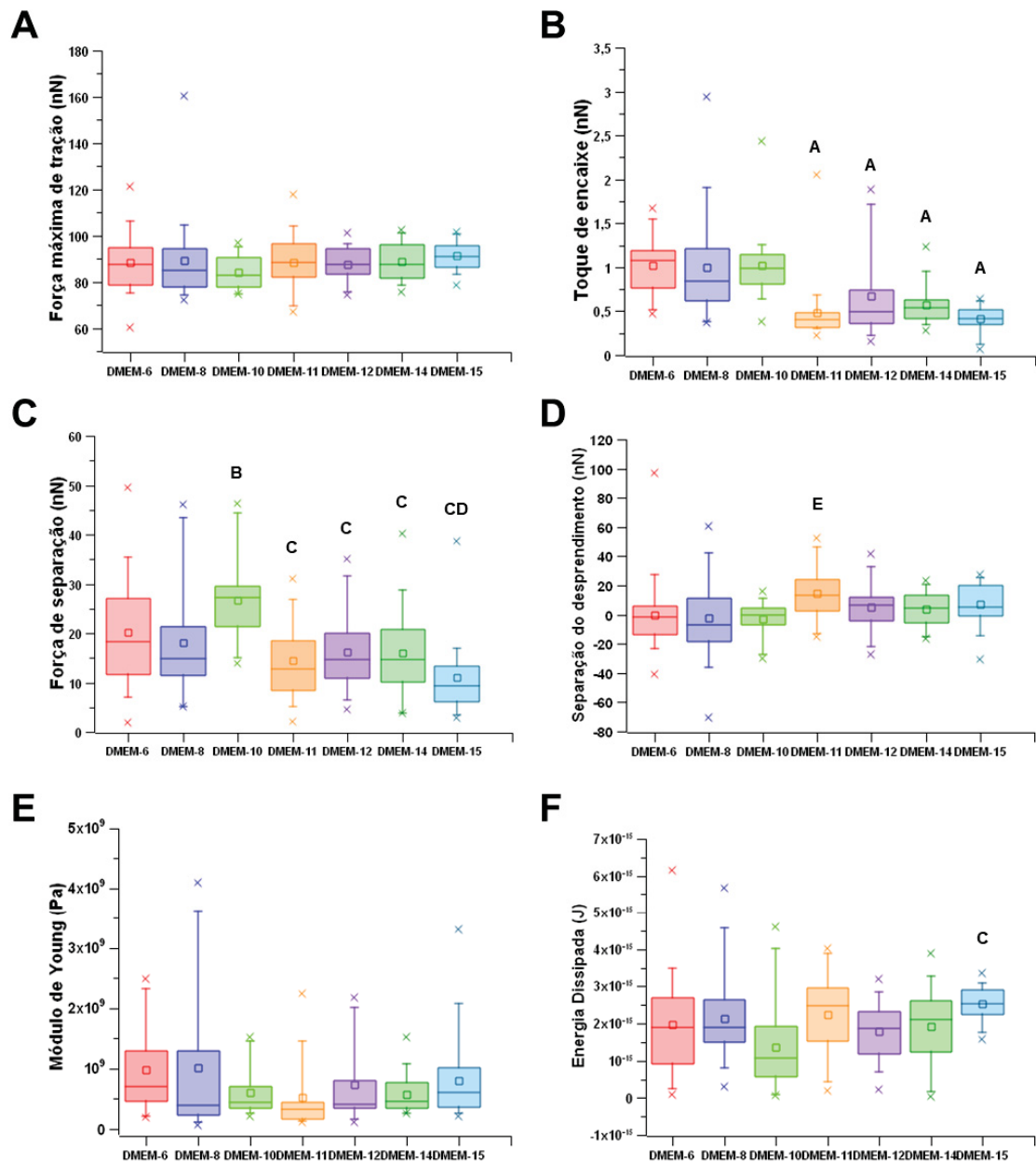


Figura I-9. Análise de parâmetros extraídos de curvas de força-distância refletindo propriedades mecânicas de hidrogéis selecionados utilizando processo de nanoindentação. (A) Força de tração máxima, (B) Força de encaixe, (C) Força de desprendimento, (D) Separação de desprendimento, (E) Módulo de Young e (F) Energia dissipada. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$): A $\neq$ DMEM-6, DMEM-8 e DMEM-10; B $\neq$ DMEM-8; C $\neq$ DMEM-10; D $\neq$ DMEM-6; e E $\neq$ DMEM-8 e DMEM-10.

Tabela I-3. Exemplificação dos valores de módulos de Young de tecidos.

Tecidos	Módulo de Young	Referência
Córnea	~ 290 kPa	(HAMILTON; PYE, 2008)
Epiderme	~ 25 kPa	(KALRA; LOWE, 2016)
Epiderme tumoral	~ 52 kPa	(TILLEMANN, 2004)
Fibra muscular	~ 258 kPa	(SHINOHARA et al., 2010)
Fígado	~ 10,5 kPa	(EVANS et al., 2013)
Ossos	~ 30 GPa	(MIURA et al., 2011)
Rim	~ 95 kPa	(KARIMI; SHOJAEI, 2017)
Tecido mamário	~ 56,3 kPa	(BRIOT et al., 2022)
Tendão	~ 2GPa	(MAGANARIS; NARICI, 2005)

As análises das curvas de força-distância forneceram informações valiosas sobre as propriedades mecânicas dos hidrogéis analisados. As curvas apresentadas na Figura I-10 revelaram diferenças expressivas entre os hidrogéis. As linhas azuis representam as curvas de aproximação, enquanto as linhas vermelhas representam as curvas de retração, indicando a direção do movimento pelas setas correspondentes. Elas se referem aos perfis de força ponto a ponto que a ponteira do MFA obtém ao ser aproximada e retraída da superfície da amostra, respectivamente. Durante a fase de aproximação, a ponteira se move em direção à superfície da amostra. À medida que a ponta se aproxima, a interação entre a ponta e a superfície da amostra gera uma força mensurável. Essa força é registrada em função da distância entre a ponta e a superfície. A curva de aproximação fornece informações sobre as interações força-distância entre a ponta e a amostra à medida que a ponta se aproxima. Observou-se então uma heterogeneidade, implicando em variação nas curvas obtidas conforme atributos dos biomateriais.

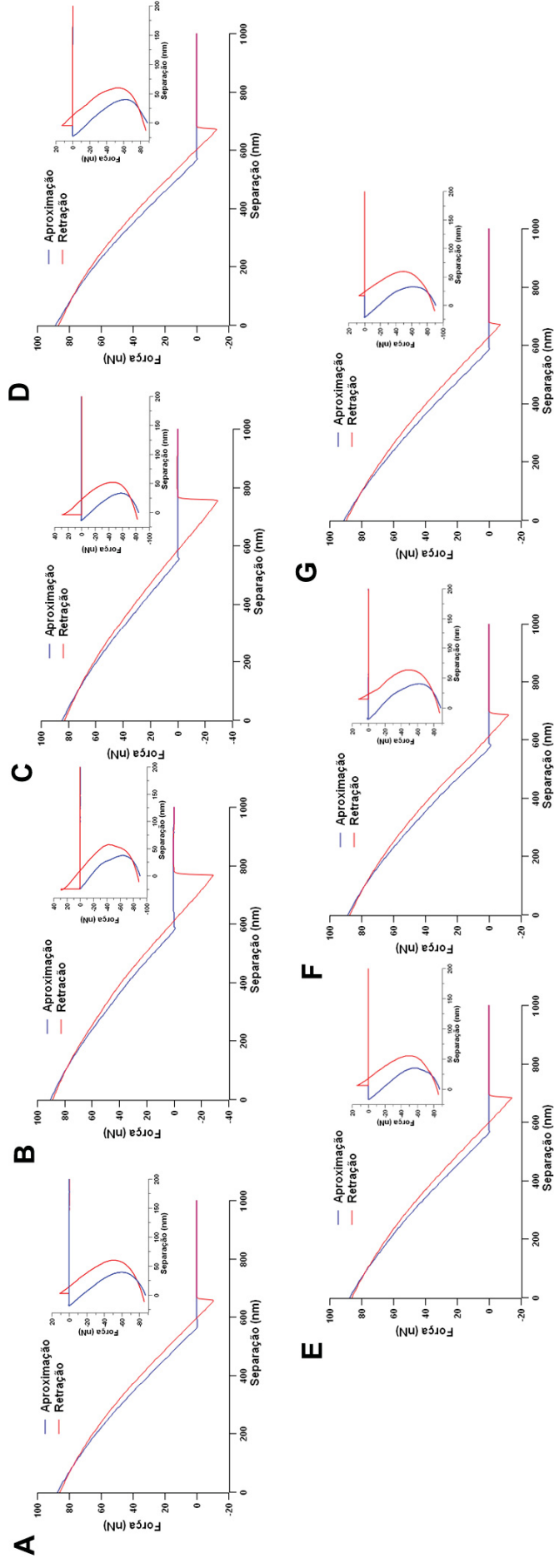


Figura I-10. Curvas de força-distância (aproximação e retração) e saltos de força (inserções) para todos os hidrogéis selecionados. (A) DMEM-6, (B) DMEM-8, (C) DMEM-10, (D) DMEM-11, (E) DMEM-12, (F) DMEM-14 e (G) DMEM-15. As curvas de aproximação e retração são mostradas.

Notavelmente, um aumento na distância de separação foi observado nas amostras DMEM-8 e DMEM-10, mantendo a força aplicada, resultando em pontos de descontinuidade das forças de interação entre a ponteira e a superfície do hidrogel. Isso demonstra que as proporções de alginato de sódio e gelatina utilizadas em sua combinação, bem como as do agente de reticulação, permitem a criação de biomateriais mais elásticos, conforme observado por outros autores em diversos tipos de materiais (ARNOLD et al., 2023; CUOMO; COFELICE; LOPEZ, 2019). As curvas de aproximação e retração coincidiram para DMEM-6, DMEM-11 e DMEM-15, mas não para DMEM-12 e DMEM-14, indicando histerese nas curvas de força-separação e decorrente das forças adesivas que dificultavam o descolamento da ponteira do MFA como observado anteriormente por outros autores (MENEZES et al., 2013). A histerese também pode indicar comportamento viscoelástico, pois materiais perfeitamente elásticos não apresentam esse fenômeno (WANG et al., 2022). Os hidrogéis de alginato de sódio são conhecidos por terem considerável elasticidade e porosidade em sua estrutura (OMIDIAN; ROCCA; PARK, 2006), enquanto os hidrogéis à base de gelatina tendem a ter características mais viscosas (LI; KUMACHEVA, 2018; SAHOO; BISWAL, 2021). Combinações de ambos os biopolímeros tendem a expressar características intermediárias tendo a deslocar na direção daquele biopolímero presente em maior concentração no hidrogel. De fato, essa distinção observada entre as curvas de força-separação reflete diretamente as combinações utilizadas, onde os materiais com maior proporção de alginato de sódio apresentam maior elasticidade e menor viscosidade em relação aos demais. Em contraste, os hidrogéis com maiores concentrações de gelatina são mais viscosos e menos elásticos. Em resumo, as características micro- e nanomecânicas estão diretamente associadas às concentrações dos biopolímeros utilizados neste estudo, bem como a concentração do agente de reticulação.

As combinações ricas em alginato de sódio exibiram maior elasticidade, enquanto as combinações ricas em gelatina apresentaram maior viscosidade. No geral, as características micro- e nanomecânicas se correlacionam diretamente com as concentrações de biopolímeros e o agente de reticulação. No campo das aplicações biomédicas, a seleção de propriedades dos biomateriais considerados ideais e suas combinações desempenham um papel fundamental na obtenção de resultados bem-sucedidos. Embora o presente estudo tenha mostrado diversas propriedades mecânicas e de superfície de hidrogéis produzidos à base de

biopolímeros, é imediato o reconhecimento de que as propriedades mais desejáveis e as combinações ideais dependem do contexto considerado e estão intimamente alinhadas com a aplicação biomédica específica. A engenharia de tecidos, a administração de fármacos, a cicatrização de feridas e outras estratégias terapêuticas têm pré-requisitos distintos que exigem características do biomaterial personalizadas. Por exemplo, a engenharia de tecidos exige hidrogéis com resistência mecânica semelhante aos tecidos nativos, suportando adesão celular e proliferação.

Em contraste, a administração de fármacos requer degradação controlada e cinética de liberação prolongada, enquanto aplicações para cicatrização de feridas podem priorizar adesão celular aprimorada, propriedades antimicrobianas e biocompatibilidade. Portanto, essas descobertas ressaltam a importância de uma abordagem holística que integre perfeitamente as propriedades mecânicas e de superfície dos hidrogéis com a aplicação biomédica direcionada, garantindo a obtenção de biomateriais otimizados adequados para enfrentar desafios clínicos futuros os quais tendem a ser multifacetados.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar quantitativamente a resistência eletromecânica à tração de filamentos biopoliméricos e as propriedades topográficas de hidrogéis, empregando dezessete combinações distintas de biopolímeros, variadas concentrações de agente reticulante e três diferentes agentes solubilizantes de biopolímeros. Os achados obtidos revelaram uma correlação positiva direta entre concentrações mais altas de biopolímeros e agente de reticulação com o aumento da resistência do filamento, ressaltando o papel fundamental da composição do material na determinação do comportamento mecânico. Notavelmente, os hidrogéis formulados com DMEM demonstraram resistência mecânica expressiva, tornando-os candidatos promissores para a incorporação de células vivas. Sendo assim, as sete combinações que resistiram à tração eletromecânica acima de 1 N, seguiram para os demais experimentos. Por meio da análise topográfica em nanoescala, características superficiais distintas foram obtidas, apresentando alturas variadas e a presença de vales (porosidade) com diferentes profundidades, indicativos de rugosidade inerente a qual pode ser benéfica em processos que envolvam incorporação de células. Criticamente, essas características de nanorugosidade exibiram modulabilidade à

medida que foram ajustadas as concentrações de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio, influenciando assim a morfologia da superfície, um parâmetro essencial com implicações em diversas áreas, particularmente na engenharia de tecidos. A integração da análise de resistência à tração eletromecânica e investigação topográfica fornece informações valiosas para o desenvolvimento de materiais biopoliméricos de precisão. Ao elucidar a interação entre composição, atributos mecânicos e topografia de superfície, este estudo capacita os pesquisadores a adaptarem biomateriais com funcionalidades e características de superfície ajustadas, alinhando-se com as demandas multifacetadas das mais variadas aplicações. A contribuição deste estudo está relacionada com o avanço da ciência dos biomateriais, ampliando a compreensão dos hidrogéis baseados em biopolímeros. Ao descobrir os efeitos diferenciados da composição nas propriedades dos filamentos biopoliméricos e dos hidrogéis, pode ser traçado um fluxo sistemático de trabalho para novas abordagens de pesquisa que sejam pioneiras na criação de materiais inovadores para bioengenharia e exibindo características únicas. Em resumo, a investigação realizada neste capítulo enfatiza a importância fundamental da composição do biomaterial na aquisição de resistência mecânica e do papel da topografia da superfície nas propriedades finais, apresentando implicações profundas em uma variedade de aplicações, desde a engenharia de tecidos até o *design* de biomateriais. Outras pesquisas poderão se beneficiar dessas percepções fundamentais e assim aproveitar o potencial dos filamentos à base de biopolímeros em um amplo espectro de campos científicos e tecnológicos.

CAPÍTULO II

**INVESTIGAÇÃO DO COMPORTAMENTO E FORÇA MECÂNICA DE
FILAMENTOS À BASE DE HIDROGÉIS PRODUZIDOS POR FIAÇÃO ÚMIDA
MANUAL E COM USO DE BIOIMPRESSORA 3D COM AGULHAS DE
DIFERENTES CALIBRES E AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO AO LONGO DO
TEMPO**

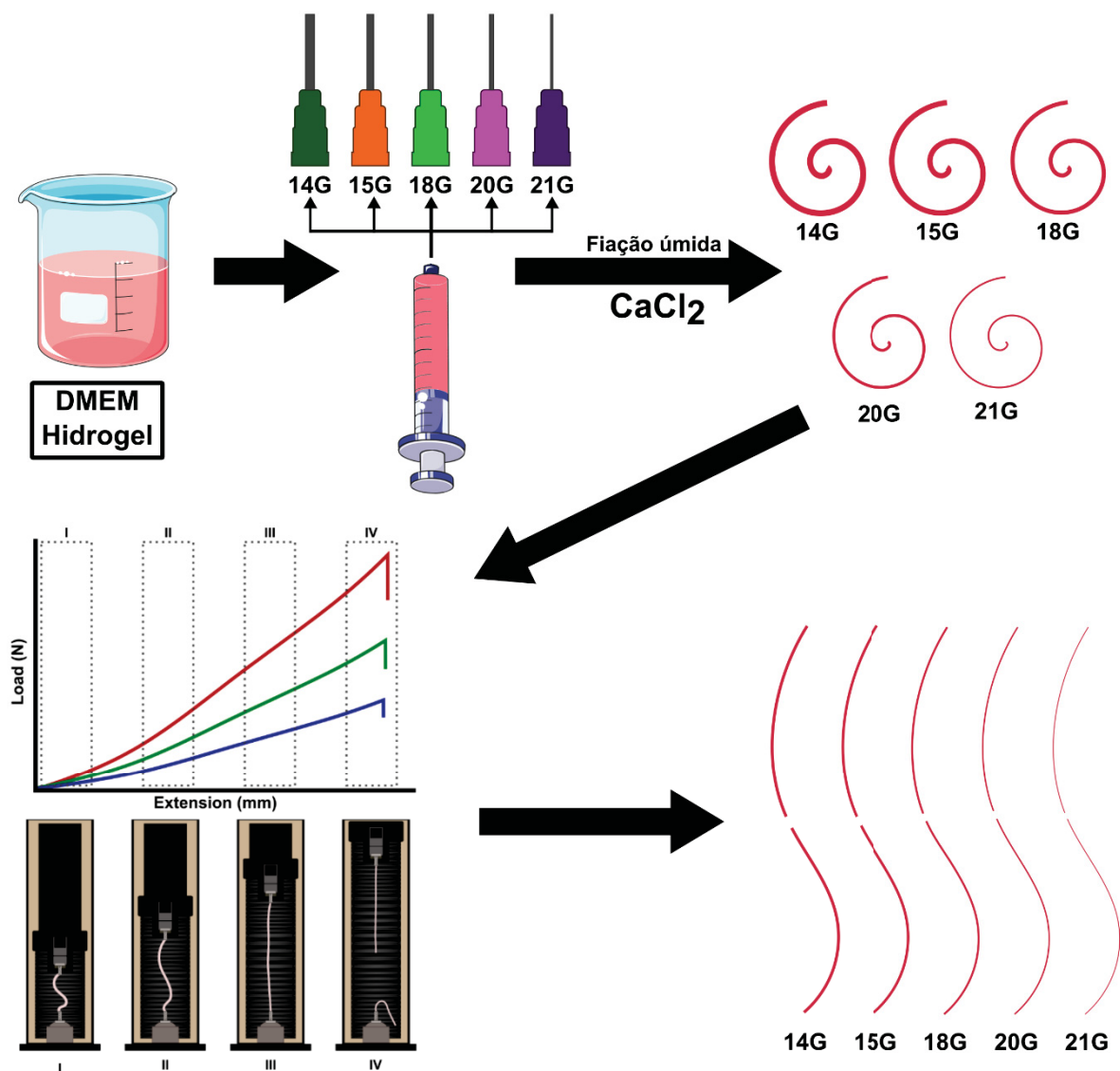


Figura II-1. Resumo gráfico apresentando as etapas desde o emprego do hidrogel para extrusão de filamentos utilizando diferentes tipos de diâmetro de agulhas, até o processo de estiramento mecânico para caracterização do material até o momento da ruptura.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo construir filamentos de hidrogel com diâmetros variados e investigar seu comportamento ao longo do tempo. Os hidrogéis foram produzidos utilizando diferentes concentrações de alginato de sódio e gelatina. A técnica de fiação úmida foi empregada para produzir os filamentos de hidrogel, utilizando seringas com agulhas de calibres variados (14, 15, 18, 20 e 21 Ga) e cloreto de cálcio como agente de reticulação por extrusão manual e utilizando uma bioimpressora 3D. Os filamentos biopoliméricos foram submetidos a testes de extensão eletromecânica para avaliar a resistência mecânica. Além disso, foram realizados testes de desintegração em PBS para avaliar a estabilidade do biomaterial de hidrogel. Os resultados mostraram que os filamentos produzidos com agulhas de calibre maior apresentaram maior resistência à tração e menor alongamento, enquanto aqueles produzidos com agulhas de calibre menor exibiram menor resistência à tração, mas maior capacidade de estiramento. O tempo de armazenamento não afetou significativamente o comportamento dos filamentos, indicando sua durabilidade ao longo do tempo, porém a formulação DMEM-10 (8,36% de alginato de sódio, 4% de gelatina e 2% de CaCl_2 – p/v – solubilizados em meio DMEM) não apresentou nenhuma variação em seus dados de resistência eletromecânica. Além disso, os testes de intumescimento e desintegração demonstraram que os hidrogéis contendo maiores concentrações de alginato de sódio absorveram líquido mais rapidamente e degradaram-se mais lentamente, enquanto aqueles com menores concentrações de gelatina absorveram líquido mais lentamente, mas degradaram-se mais rapidamente. Em conclusão, os filamentos de hidrogéis biopoliméricos desenvolvidos apresentaram resistências eletromecânicas variadas, dependendo de seus diâmetros. Além disso, eles mantiveram suas propriedades ao longo do tempo, e suas características de absorção e desintegração foram diretamente influenciadas pela composição do biomaterial de hidrogel.

Palavras-chave: Manufatura aditiva; agulha; diâmetro; filamentos; meio DMEM.

ABSTRACT

This study aimed to construct hydrogel filaments with varying diameters and investigate their behavior over time. Hydrogels were produced using different concentrations of sodium alginate and gelatin. The wet spinning technique was employed to manufacture the hydrogel filaments using syringes with various needle gauges (14, 15, 18, 20, and 21 Ga), with calcium chloride as the cross-linking agent, using manual extrusion and a 3D bioprinter. Biopolymeric filaments were subjected to electromechanical tensile tests to assess their mechanical strength. In addition, disintegration tests in PBS were conducted to evaluate the stability of the hydrogel biomaterial. The results indicated that filaments produced with larger gauge needles exhibited greater tensile strength and lower elongation, whereas those produced with smaller gauge needles displayed lower tensile strength but higher stretching capability. Storage time did not significantly affect the behavior of the filaments, indicating their durability over time. However, the DMEM-10 formulation (8.36% sodium alginate, 4% gelatin, and 2% CaCl_2 w/v solubilized in DMEM medium) showed no variation in its electromechanical strength data. Furthermore, swelling and disintegration tests demonstrated that hydrogels containing higher concentrations of sodium alginate absorbed liquid more rapidly and degraded more slowly, while those with lower concentrations of gelatin absorbed liquid more slowly but degraded more quickly. In conclusion, the developed biopolymeric hydrogel filaments exhibited varying electromechanical strengths depending on their diameters. Additionally, they maintained their properties over time, and their absorption and disintegration characteristics were directly influenced by the hydrogel biomaterial composition.

Key words: Additive manufacturing; needle; diameter; filaments; DMEM medium.

1 INTRODUÇÃO

Hidrogéis apresentam características fundamentais que os tornam altamente relevantes na bioengenharia e na mimetização de tecidos (HO et al., 2022). Esses biomateriais exibem alta biocompatibilidade, permitindo a interação e crescimento de células e tecidos em um ambiente tridimensional (SAYD et al., 2021). Sua estrutura porosa e capacidade de retenção de água possibilitam a regulação do fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos metabólicos (HUIYUAN LUO, FUPING DONG , QIAN WANG, 2021). Além disso, hidrogéis podem ser projetados para exibir propriedades físicas e químicas específicas, como rigidez ajustável, degradação controlada e liberação sustentada de moléculas bioativas (LIU et al., 2023). Esses atributos tornam hidrogéis promissores para a engenharia de tecidos, regeneração de órgãos e o desenvolvimento de modelos *in vitro* (XU et al., 2022).

A fabricação ou manufatura aditiva surgiu como uma abordagem promissora em várias áreas, incluindo a bioengenharia tecidual (BOSE et al., 2019; CHIMENE; KAUNAS; GAHARWAR, 2019). Hidrogéis são biomateriais adequados para a fabricação precisa de estruturas complexas em 3D, fornecendo um ambiente biocompatível para o crescimento celular e regeneração de tecidos devido à sua capacidade de aprisionar células e maturógenos (fatores de crescimento), bem como devido às suas propriedades físicas e químicas ajustáveis (ZASZCZY, 2021). A combinação da fabricação aditiva com hidrogéis oferece uma plataforma versátil para a engenharia de tecidos e o desenvolvimento de modelos *in vitro* cada vez mais precisos (MEROTTO; PAVAN, 2023; PARIHAR, 2022; XIE et al., 2023).

Filamentos de hidrogéis produzidos por meio da técnica de fiação úmida têm despertado interesse na bioengenharia (PARK et al., 2022). Esse método de fabricação envolve a extrusão de uma solução de hidrogel através de uma seringa acoplada com uma agulha, enquanto um agente de reticulação é adicionado para proporcionar estabilidade estrutural (FATIMI et al., 2022). Os filamentos de hidrogel resultantes podem exibir diferentes diâmetros e composições, permitindo a criação de estruturas personalizadas para aplicações biomédicas (LI et al., 2020a). Sua porosidade e capacidade de retenção de água são vantajosas para o crescimento celular, interação de tecidos, difusão de nutrientes e eliminação de resíduos (LUTZWEILER; HALILI; VRANA, 2020). Além disso, a produção de filamentos de hidrogel por meio da fiação úmida oferece uma abordagem versátil e econômica para

a fabricação de estruturas biomiméticas (ELKHOURY et al., 2021; VOLPI et al., 2022), sendo fortemente influenciado por fatores como as concentrações dos constituintes e calibre da agulha.

Adicionalmente, agulhas de diferentes calibres são ferramentas cruciais na área de bioimpressão, pois permitem a deposição precisa de materiais com modulação de propriedades, como por exemplo as biotintas (YI et al., 2023). Agulhas de menor calibre, que normalmente produzem filamentos com diâmetros na faixa de dezenas de micrômetros, são utilizadas para impressão de detalhes finos, permitindo estruturas de tecido complexas. Agulhas de maior calibre, por outro lado, são empregadas para deposição rápida, permitindo a criação de construções de tecidos (KAHL et al., 2019). A seleção do calibre da agulha depende da aplicação específica da bioimpressão, do nível desejado de resolução e velocidade, com um equilíbrio cuidadoso necessário para alcançar resultados ideais (HAITAO CUI, MARGARET NOWICKI, PROF. JOHN P. FISHER, 2017).

A reologia e o teste eletromecânico de tração são técnicas comumente utilizadas para caracterizar hidrogéis biopoliméricos (BASHIR et al., 2020). A reologia fornece informações sobre o comportamento mecânico e as propriedades estruturais de hidrogéis biopoliméricos (HERRADA-MANCH; ALEJANDRO; AGUILAR, 2023; STOJKOV et al., 2021). O teste eletromecânico de tração permite a caracterização da resistência mecânica de hidrogéis produzidos ou armazenados em condições variadas, fornecendo informações valiosas para seu desenvolvimento e otimização com vistas às aplicações pretendidas (JI et al., 2023; WIRANATA et al., 2022).

O armazenamento de hidrogéis e biotintas por longos períodos de tempo é essencial não apenas para garantir que suas propriedades reológicas permaneçam estáveis, mas também para manter a viabilidade e funcionalidade de células encapsuladas (WINDISCH et al., 2023). O armazenamento prolongado (vida de prateleira) permite avaliações de controle de qualidade, consistência entre lotes e transporte conveniente para diferentes instalações clínicas ou de pesquisa. Além disso, oferece flexibilidade no agendamento de procedimentos de bioimpressão e experimentos de pesquisa, reduzindo a urgência do uso imediato (KOSTENKO; CONNON; SWIOKLO, 2023). No entanto, condições adequadas de armazenamento, tais como baixas temperaturas ou métodos de criopreservação, devem ser meticulosamente mantidas para evitar a degradação e preservar a integridade

estrutural e biológica destes materiais críticos para futuras aplicações biomédicas (WARBURTON; RUBINSKY, 2023).

O objetivo deste estudo foi utilizar a técnica de fiação úmida manual e utilizando uma bioimpressora 3D, para produzir filamentos de hidrogéis utilizando seringas com agulhas de diferentes calibres e cloreto de cálcio como agente de reticulação. A resistência mecânica dos filamentos foi avaliada por meio do teste eletromecânico de tração, e sua desintegração em PBS foi avaliada para determinar a taxa de absorção de líquidos dos hidrogéis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

As concentrações de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio para a preparação dos hidrogéis foram determinadas utilizando o software Chemoface® com um delineamento experimental do tipo planejamento composto central. A Tabela II-1 mostra as 7 combinações escolhidas geradas pelo software. Os hidrogéis foram preparados seguindo a mesma metodologia apresentada na seção 2.2 do Capítulo I.

Tabela II-1. Nomes para as combinações de variáveis independentes, sendo as concentrações relativas (% p/v) de alginato de sódio e gelatina nos hidrogéis, e solução de cloreto de cálcio como agente de reticulação.

Nome	Polímeros		Agente reticulante
	Alginato de sódio (%)	Gelatina (%)	CaCl ₂ (%)
DMEM-6	7	3	3
DMEM-8	7	5	3
DMEM-10	8,364	4	2
DMEM-11	5	2,318	2
DMEM-12	5	5,682	2
DMEM-14	5	4	3,682
DMEM-15	5	4	2

2.2 PRODUÇÃO DE FILAMENTOS A PARTIR DE HIDROGÉIS COM DIFERENTES TIPOS DE AGULHAS

Os hidrogéis foram transferidos para seringas descartáveis do tipo *luer lock* de 5 mL (Rynco, Brasil) e extrusados manualmente em recipientes de vidro contendo solução de cloreto de cálcio como agente de reticulação (Dinâmica, Brasil), seguindo a técnica de fiação úmida. Paralelamente, para fins de comparação, foi utilizada a bioimpressora 3D Starter (3D *Biotechnological Solutions* - 3DBS, Brasil) utilizando as mesmas condições, mostrado na Figura II-2. Para a extrusão, foram utilizados cinco tipos de agulhas com diferentes calibres (Tabela II-2) para produzir filamentos de diâmetros variados. Esses filamentos foram imersos por aproximadamente 10-15 minutos, lavados com PBS e, em seguida, secos delicadamente em toalhas de papel.

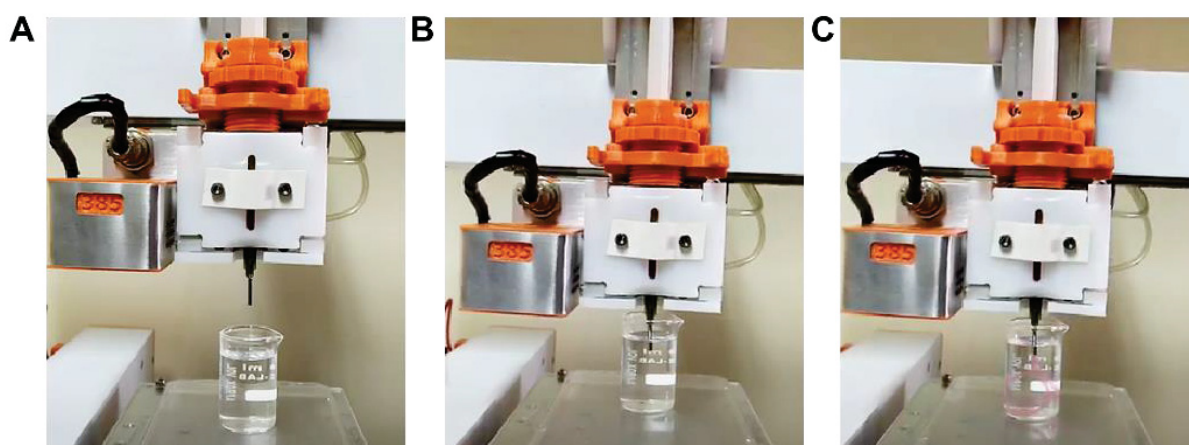


Figura II-2. Extrusão de filamentos pela técnica de fiação úmida utilizando bioimpressora 3D (Starter 3DBS). (A) Posicionamento inicial para a extrusão do filamento. (B) Posição final para extrusão do filamento. (C) Filamento extrusado.

Tabela II-2. Identificação das agulhas e seus respectivos diâmetros internos.

Número da agulha (Gauge)	Diâmetro interno (mm)	Comprimento das agulhas (mm)
14	2,0	15
15	1,8	15
18	1,2	15
20	0,9	15
21	0,8	15

2.3 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ELETROMECHANICA À TRAÇÃO DOS FILAMENTOS

A resistência à tração e a resistência à tensão vertical dos filamentos foram avaliadas utilizando um extensômetro eletromecânico acoplado a uma célula de carga (MTS Insight®, EUA). Os filamentos foram produzidos medindo 12 cm de comprimento, enquanto o diâmetro variou para cada agulha utilizada (Tabela II-3). Eles foram condicionados pelas extremidades, e os testes foram realizados em triplicatas, protegendo os filamentos com papel e fita adesiva nas garras do equipamento. As amostras foram submetidas à tensão utilizando o software TestWorks® 4.10 a uma velocidade de 10 mm/min até a ruptura, medindo a tração máxima suportada por cada filamento de hidrogel, a taxa de extensão, o pico de tensão e o módulo de elasticidade. Os dados obtidos foram coletados e analisados estatisticamente.

Tabela II-3. Diâmetros médios dos filamentos produzidos com diferentes agulhas.

Número da agulha (Gauge)	Diâmetro do filamento (mm)
14	2,50
15	2,00
18	1,50
20	1,25
21	1,00

2.4 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE FILAMENTOS A PARTIR DE HIDROGÉIS ARMAZENADOS

Os sete hidrogéis preparados foram armazenados a aproximadamente 4°C dentro de seringas. A extremidade foi selada com Parafilm (Bemis Company, EUA) para evitar que o material secasse. Uma vez por semana, os hidrogéis foram utilizados para produzir filamentos pela técnica de fiação úmida (com o uso da agulha 14 Ga) totalizando quatro vezes por mês. Após a extrusão, os filamentos obtidos foram submetidos à extensora eletromecânica. Os parâmetros utilizados foram os mesmos mencionados anteriormente.

2.5 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO E DESINTEGRAÇÃO DOS HIDROGÉIS FABRICADOS

Discos dos hidrogéis foram colocados individualmente em béqueres e preenchidos com PBS até ficarem completamente recobertos. Papel-filme foi utilizado para recobri-los, evitando a perda de umidade, e foram mantidos em uma incubadora LUCA-81/81 (Lucadema, Brasil) a 37°C ± 2°C. Os discos foram mantidos nessas condições por sete dias. Diariamente, o tampão foi removido e a amostra foi pesada, após o qual uma nova solução de PBS foi adicionada. No final do experimento, os pesos em 24, 48, 72, 96 e 168 horas após o início do experimento foram coletados e as taxas de ganho ou perda de peso calculadas de acordo com a fórmula matemática:

$$\tau = \left(\frac{\omega_f - \omega_i}{\omega_i} \right) \times 100$$

Onde, τ é equivalente ao valor da taxa de ganho de peso (inchamento) ou perda de peso (desintegração) dos discos, ω_i é igual ao peso inicial dos discos (antes do início do teste) e ω_f é igual ao peso final dos discos após a remoção do PBS no dia.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Análise de Variância (ANOVA) com o teste de Tukey para comparar as médias e determinar a significância estatística entre as características dos hidrogéis e filamentos produzidos em triplicatas. Diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$. O software PAST 3 foi utilizado para a análise (HAMMER, O. et al., 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA E COMPARAÇÃO DOS FILAMENTOS EXTRUSADOS MANUALMENTE E UTILIZANDO BIOIMPRESSÃO 3D COM AGULHAS DE DIFERENTES CALIBRES

Os filamentos produzidos a partir do planejamento experimental e selecionados para este estudo apresentaram resultados variados para carga, pico de tensão, proporção de extensão e módulo ao comparar as 7 combinações distintas e as concentrações do agente de reticulação utilizadas. A Figura II-3 mostra os filamentos antes e após o estiramento até a ruptura, de acordo com cada agulha utilizada para as extrusões. Foi possível identificar que todos os biomateriais desenvolvidos sofreram deformação estrutural até suas rupturas. Ademais, quanto menor o diâmetro da agulha utilizada, mais fino o filamento produzido e estirado ficava. Também, conforme o tempo deixado em bancada após a tensão eletromecânica à temperatura ambiente, os biomateriais secavam mais rápido.

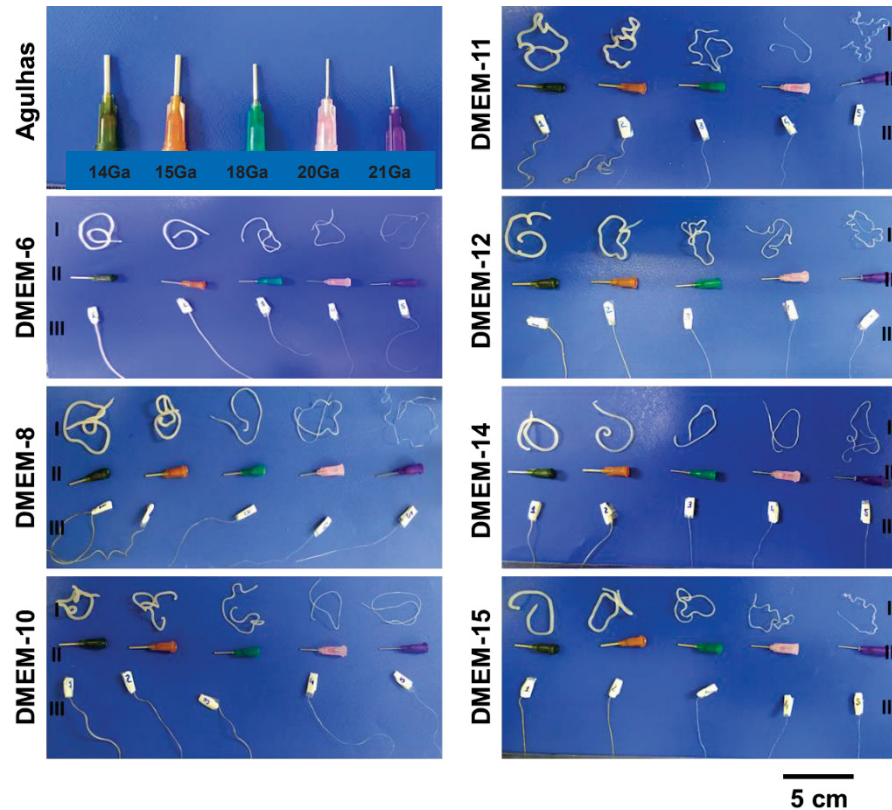


Figura II-3: Imagens fotográficas de filamentos de hidrogéis preparados com agulhas de diferentes calibres, antes e depois da aplicação de tensão eletromecânica. Apresentação das agulhas utilizadas nas seringas para obtenção de filamentos de diferentes calibres e fotografias dos filamentos após a secagem (I), das agulhas utilizadas (II) e dos resultados após serem submetidos à extensora eletromecânica (III).

A Figura II-4 apresenta os valores coletados após a aplicação de tensão eletromecânica em cada filamento durante o teste. Nesse caso, a Figura II-4A mostra os valores de força de carga (N), enquanto a Figura II-4B exibe os valores do pico de tensão (Pa) correspondentes à máxima tensão suportada e a Figura II-4C representa os valores de proporção de extensão (%), indicando o alongamento do material quando esticado. Além dessas medidas, a Figura II-4D mostra os valores de módulo (ksi), representando a tensão ou pressão resultante de uma força de um quilolibra atuando em uma área de uma polegada quadrada.

Na Figura II-4A, observou-se que os filamentos produzidos com uma agulha de calibre 14Ga foram capazes de suportar maior tração ($p < 0,05$), sendo que o hidrogel DMEM-10 se destacou devido às suas maiores concentrações de alginato de sódio e gelatina, tornando-o menos viscoso e mais elástico. À medida que o diâmetro da agulha diminuiu, a resistência mecânica dos filamentos também diminuiu gradativamente. Isso corrobora a hipótese de que o diâmetro influencia diretamente

na força máxima aplicada que os biomateriais estudados resistem. Além disso, os filamentos de hidrogel DMEM-10 também foram capazes de suportar cargas mais altas em comparação com os demais hidrogéis quando comparados todos os calibres de agulha ($p < 0,05$). Na Figura II-4B, os valores mais altos para o pico de tensão estavam principalmente concentrados nos filamentos produzidos com uma agulha de calibre 21Ga. Isso demonstra que, à medida que o diâmetro do filamento diminui, a resistência máxima gerada aumenta. Na Figura II-4C, houve uma diferença na proporção de extensão durante o processo de estiramento, em que os materiais produzidos com as agulhas de maiores calibres se deformaram muito mais comparado aos demais, variando entre 100 a 170% do seu comprimento inicial. No entanto, os filamentos confeccionados utilizando as duas agulhas de menor calibre (20Ga e 21Ga) não se expandiram tanto quanto os outros no mesmo experimento ($p < 0,05$). Na Figura II-4D, os dados do módulo de elasticidade mostraram tendências similares quando comparados ao estresse máximo, indicando que os filamentos produzidos com uma agulha de calibre 21Ga exibem menor rigidez estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação aos outros, e isso influencia seu alongamento durante o teste.

Nas Figuras II-5A-E são apresentadas as representações gráficas das curvas de deformações dos filamentos produzidos com agulhas de diferentes calibres durante a tração vertical aplicada pelo extensor eletromecânico, com base na razão de extensão de cada um. Essencialmente foi observado que os filamentos produzidos com agulhas de calibres menores apresentaram deformação bem menor do que aqueles produzidos com agulhas de calibres maiores.

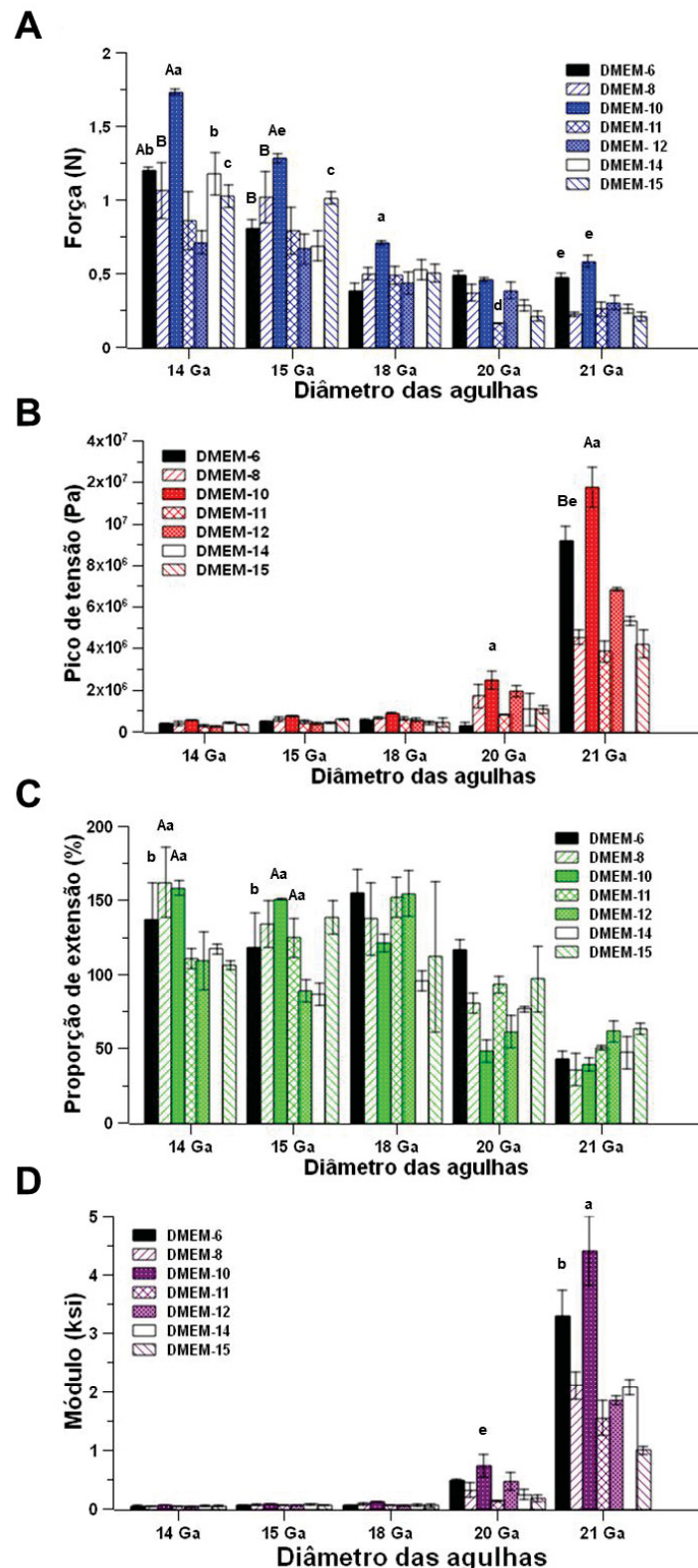


Figura II-4. Avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis utilizando agulhas de diferentes calibres. (A) Força máxima; (B) Pico de tensão; (C) Tensão na ruptura; (D) Módulo. Análise estatística ($p < 0,05$): a = diferença estatística para todos; b = diferença estatística para DMEM-11 e DMEM-12; c = diferença estatística para DMEM-11, DMEM-12 e DMEM-14; d = diferença estatística para DMEM-6, DMEM-8, DMEM-10, DMEM-12 e DMEM-14; e = diferença estatística para todos, exceto para DMEM-10; A = diferença estatística para todos os DMEM-6; B = diferença estatística para as agulhas 18Ga, 20Ga e 21Ga.

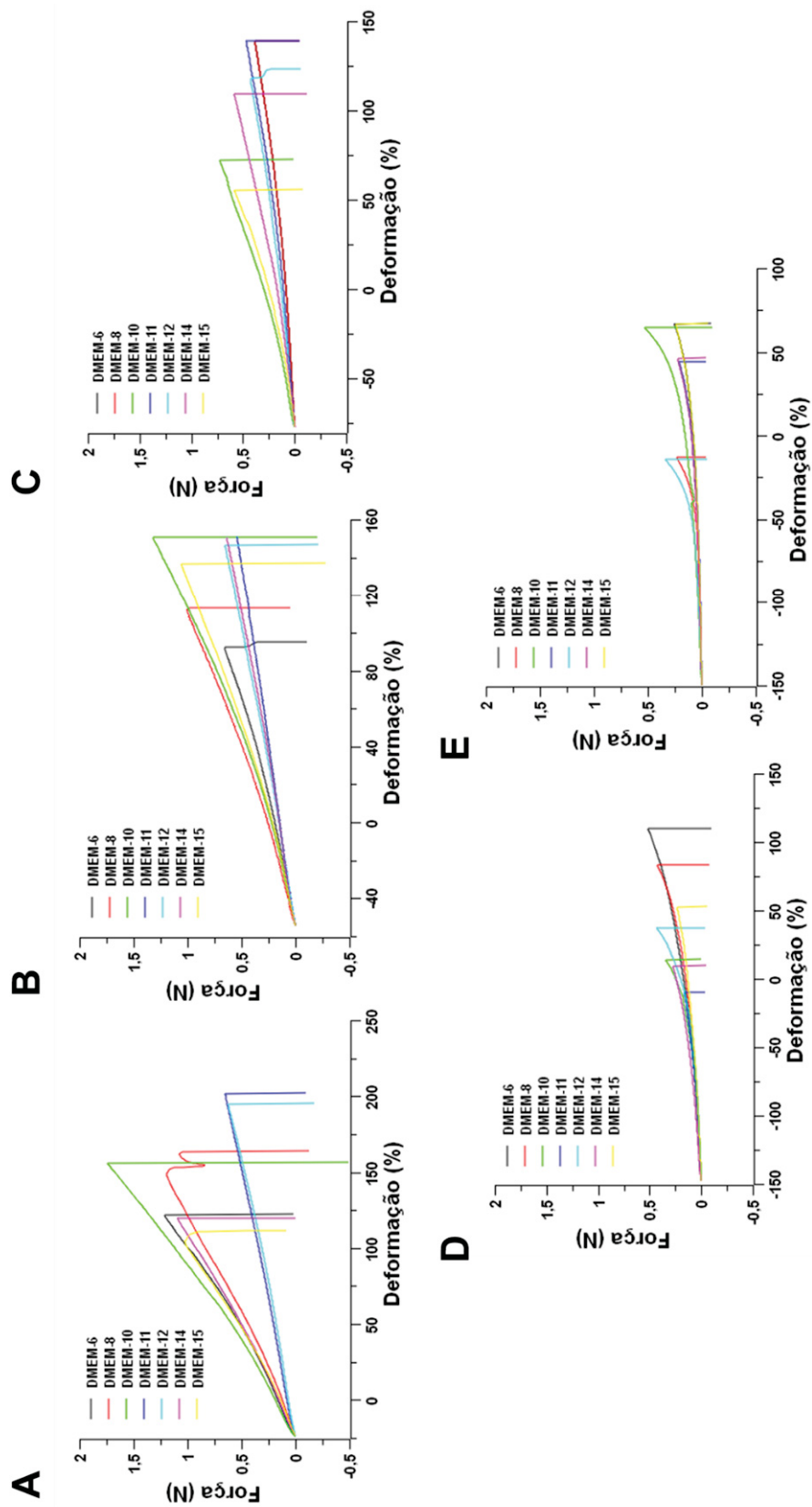


Figura II-5. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogel produzidos com diferentes diâmetros de agulhas após o rompimento provocado pela extensora eletromecânica. A) Filamentos produzidos com agulha 14Ga; B) Filamentos produzidos agulha 15Ga; C) Filamentos produzidos agulha 18Ga; D) Filamentos produzidos agulha 20Ga; E) Filamentos produzidos com agulha 21Ga. A deformação dos filamentos ocorre devido à aplicação de uma tensão vertical sobre cada amostra, resultando na força máxima suportada por cada um até seu rompimento, quando ocorreu uma queda abrupta nas curvas dos gráficos.

Os filamentos biopoliméricos produzidos com a variação do diâmetro das agulhas e extrusados com bioimpressora 3D foram apresentados na Figura II-6. Na Fig. II-6A, observou-se que os filamentos produzidos com agulhas de calibres 14Ga e 15 Ga suportaram maior tração, destacando aqueles produzidos com hidrogel DMEM-10 ($p < 0,05$). Novamente à medida que o diâmetro da agulha diminui, a resistência mecânica dos filamentos também diminui de maneira progressiva. A Fig. II-6B, mostra os valores de picos de tensão variando de acordo com o biomaterial utilizado, com destaque para os filamentos produzidos com DMEM-10 utilizando a agulha de calibre 15Ga que diferiram significativamente das demais ($p < 0,05$). Na Fig. II-6C, as variações observadas acompanharam os dados dos picos de tensão, exceto para as agulhas de menores calibres, sofrendo menores deformações. Já os dados apresentados na Fig. II-6D revelam que os módulos de elasticidade mostraram tendências similares quando comparados ao ensaio anterior, ou seja, que possuem uma elasticidade maior.

A uniformidade da extrusão de filamentos em bioimpressoras 3D representa um fator crítico na fabricação de estruturas biomiméticas com repetibilidade. Uma extrusão uniforme assegura a consistência das dimensões e as propriedades mecânicas finais dos filamentos, influenciando diretamente na qualidade do produto final (SCHWAB et al., 2020). A precisão no controle da taxa de deposição, pressão e viscosidade do biomaterial é essencial para evitar variações indesejadas na espessura e densidade do filamento (GREGORY et al., 2017). A otimização desses parâmetros, aliada a sistemas de calibração e feedback em tempo real, contribui para a obtenção de filamentos de mais alta qualidade, promovendo a confiabilidade e a eficácia das bioimpressoras 3D (FU; ANGELINE; SUN, 2021). Essa uniformidade pode estar relacionada com os dados obtidos para este experimento.

Nas Figuras II-7A-E são apresentadas as representações gráficas das curvas de deformações dos filamentos produzidos com agulhas de diferentes calibres durante a tração vertical aplicada com a extensora eletromecânica, com base na razão de extensão de cada um. Novamente, foi observado que os filamentos produzidos com agulhas de calibres menores apresentaram deformação bem menor do que aqueles produzidos com agulhas de calibres maiores, entretanto a condição DMEM-10 se destacou em todas as variações das agulhas utilizadas, conseguindo suportar maior tração e tendo maiores deformações.

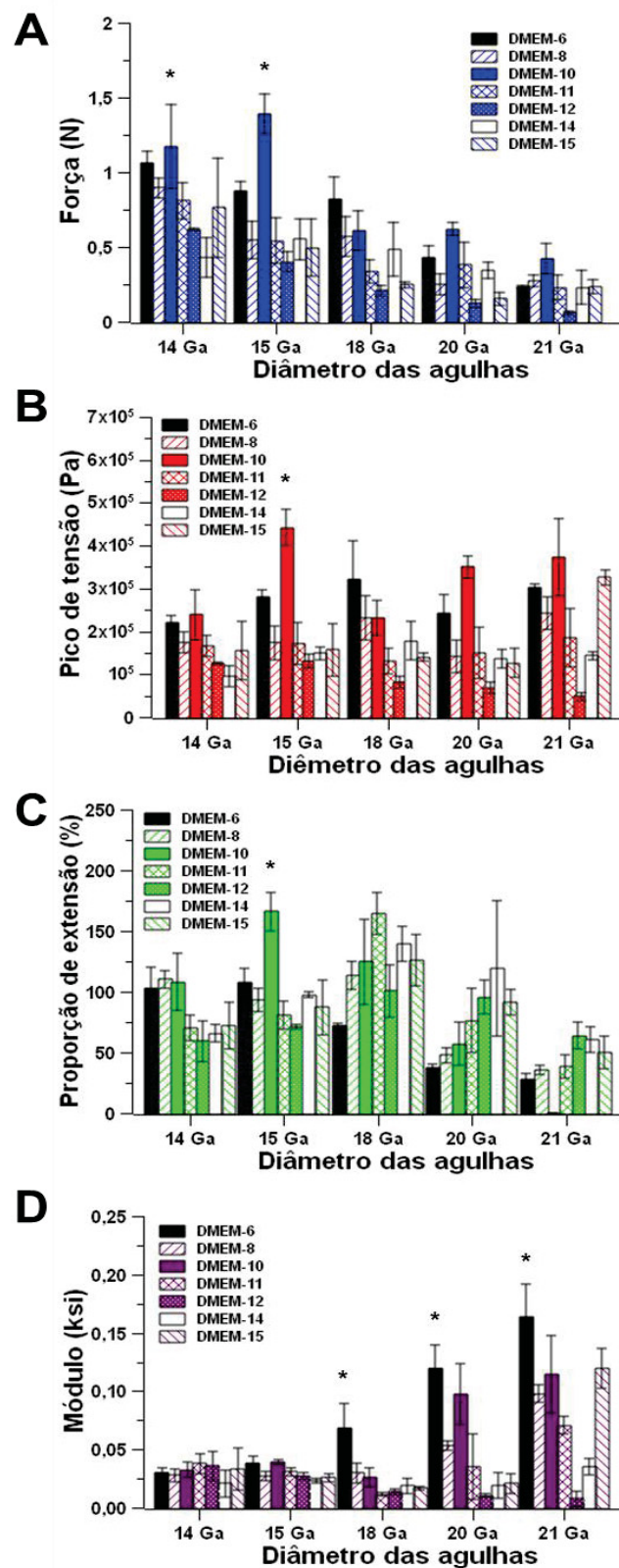


Figura II-6. Avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis utilizando diferentes tipos de agulhas utilizando uma bioimpressora 3D. (A) Força máxima; (B) Pico de tensão; (C) Proporção de extensão; (D) Módulo. Análise estatística ($p < 0,05$): * =diferença estatisticamente significativa de DMEM-10 em relação aos demais filamentos produzidos utilizando agulha do mesmo calibre.

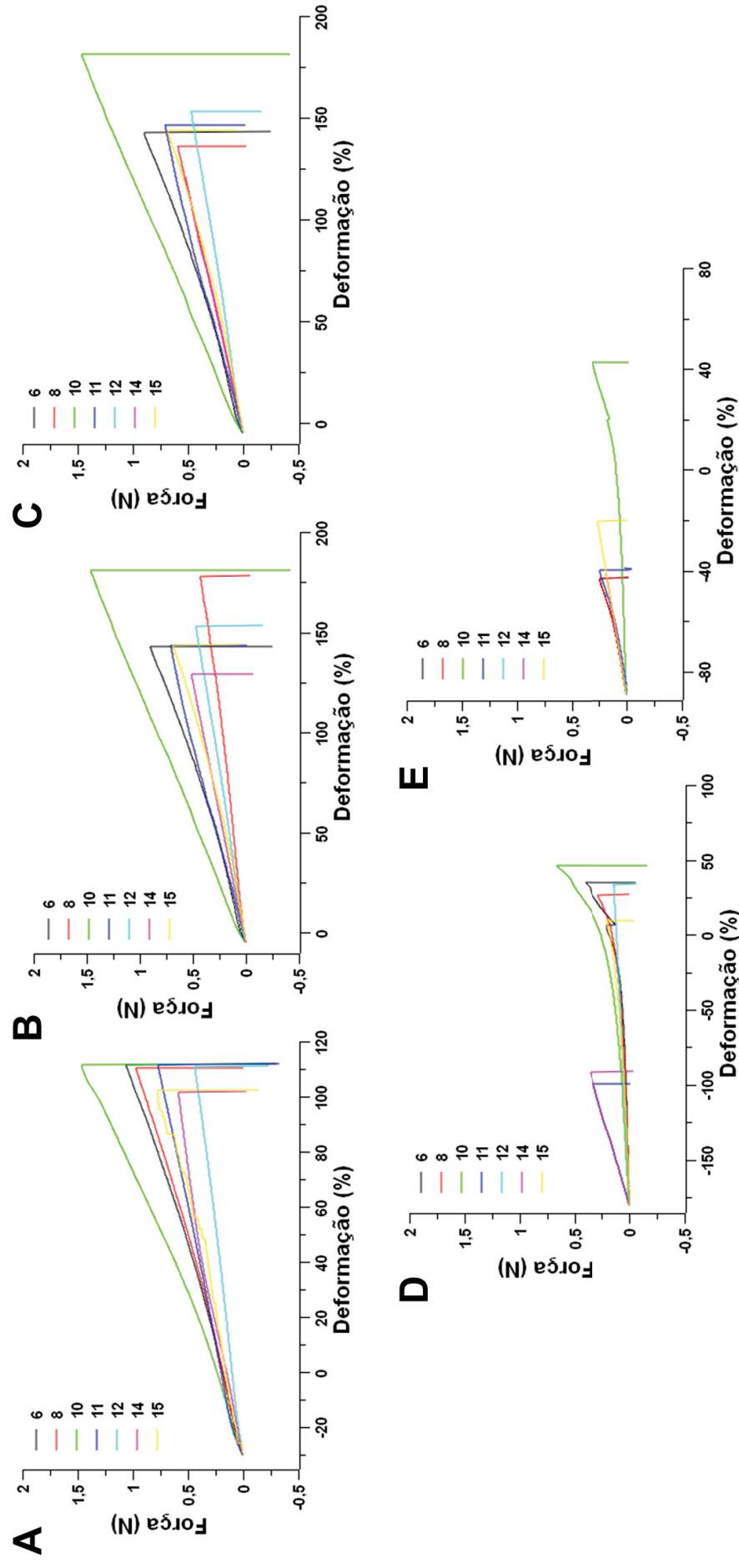


Figura II-7. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogéis biopoliméricos produzidos com agulhas de diferentes calibres através da extrusão em bioimpressora 3D, até o rompimento provocado pela extensora eletromecânica. A) Filamentos produzidos com agulha 14Ga; B) Filamentos produzidos agulha 15Ga; C) Filamentos produzidos agulha 18Ga; D) Filamentos produzidos agulha 20Ga; E) Filamentos produzidos com agulha 21Ga. A deformação dos filamentos ocorre devido à aplicação de uma tensão vertical sobre cada amostra, resultando na força máxima suportada por cada um até seu rompimento, que resulta em uma queda abrupta nas curvas dos gráficos.

O agente reticulante cloreto de cálcio tem papel fundamental na formação dos filamentos de hidrogel compostos por alginato de sódio e gelatina. O cloreto de cálcio atua como um agente de reticulação, promovendo ligações químicas entre as moléculas de alginato de sódio (CHATERJI; KWON; PARK, 2007). Essas ligações resultam em uma estrutura 3D estável e coesa, conferindo propriedades físicas e mecânicas específicas aos filamentos as quais podem ser correlacionadas com a concentração desse agente de reticulação empregada. Essa interação leva à formação de uma rede reticulada, na qual as moléculas de alginato de sódio são ligadas entre si por meio de íons de cálcio. A adição de gelatina também contribui para a estruturação e estabilização dos filamentos de hidrogel, promovendo a formação de ligações físicas adicionais, como já foi previamente demonstrado em outro modelo (ABASALIZADEH et al., 2020).

Os filamentos de hidrogel produzidos com agulhas de maior calibre suportam maior tração devido a dois fatores principais: área da seção transversal e grau de compactação do material. Primeiramente, agulhas de maior calibre resultam em filamentos com maior área de seção transversal, proporcionando maior área de contato para a distribuição da carga aplicada durante a tração, sendo este efeito previamente demonstrado (SODIUM; POLY; BIALIK-W, 2021). Isso permite uma distribuição de força mais uniforme ao longo do filamento, reduzindo a concentração de tensões em pontos específicos e consequentemente aumentando a capacidade de suportar maior tração. Além disso, filamentos produzidos com agulhas de maior calibre tendem a ter compactação de biomaterial mais eficiente (CASANOVA; CARNEY; SARNTINORANONT, 2012). Durante o processo de extrusão, a pressão exercida pela agulha ajuda a compactar e alinhar as cadeias biopoliméricas, resultando em uma estrutura mais densa e coesa. Essa compactação aumenta a resistência interna do filamento, permitindo que ele suporte maiores forças de tração sem deformação ou falha (MIDHA; DAKURI, 2017). Portanto, agulhas de maior calibre fornecem uma combinação adequada de maior área de seção transversal e melhor compactação do material, resultando em filamentos de hidrogel capazes de suportar maior tração em comparação com aqueles produzidos com agulhas de menor diâmetro (MEHDIKHANI et al., 2019).

As vantagens de avaliar a extrusão manual de hidrogéis utilizando cloreto de cálcio como agente de reticulação e diferentes calibres de agulha fornecem controle direto sobre o processo, permitindo que rapidamente ajustes e modificações sejam

realizados conforme necessário. A flexibilidade e controle no diâmetro do filamento também é evidente, pois o uso de diferentes calibres de agulha permite a produção de filamentos de hidrogel com diâmetros variados, o que pode ser vantajoso em várias aplicações, como engenharia de tecidos ou liberação sustentada de drogas (ŁABOWSKA et al., 2021). Além disso, a extrusão manual utilizando agulhas é uma técnica relativamente acessível e econômica em comparação com outros métodos de fabricação de filamentos de hidrogel mais complexos (GRUHN et al., 2023). Por outro lado, as desvantagens são que a extrusão manual pode ser menos precisa em comparação com os métodos automatizados, resultando em variações no diâmetro e também na forma do filamento (KALIARAJ et al., 2023). De fato, a reprodutibilidade consistente dos resultados pode ser um desafio na extrusão manual devido a variações na aplicação de força e velocidade durante o processo (DEY; EAGLE; YODO, 2021). Em última análise, a extrusão manual é mais adequada para produção em pequena escala e sua capacidade de produção pode ser limitada em comparação com as técnicas industriais que requerem sistemas de extrusão automatizados (MÜLLER et al., 2020).

Existem várias características distintivas de hidrogéis extrudados manualmente em relação ao teste de resistência mecânica (ROUF et al., 2022). Em primeiro lugar, ao extrudar hidrogéis manualmente, é possível ter um controle mais personalizado sobre o processo de deposição e a estrutura do filamento, permitindo realizar adaptação às necessidades específicas de testes de resistência (FUENTES-CAPARRAS et al., 2021). A extrusão manual permite a criação de diferentes geometrias, como padrões entrelaçados, grades ou estruturas complexas, que podem afetar a resistência mecânica do hidrogel (LI; TAN; LI, 2018). Durante a extrusão manual, é possível ajustar de modo bastante simples a composição do hidrogel, como concentração de polímero ou adição de reforços, para aumentar sua resistência mecânica (RATNAMANI; ZHANG; WANG, 2022). Além disso, oferece flexibilidade quanto ao controle do tamanho e forma dos hidrogéis extrudados, possibilitando a confecção de amostras customizadas para ensaios mecânicos específicos (JEENCHAM et al., 2023). No geral, a extrusão manual de hidrogéis para produzir filamentos para aplicações *in situ* apresenta vários benefícios em relação a outras técnicas. Estes incluem a capacidade de produzir em pouco tempo filamentos com uma ampla gama de diâmetros, a capacidade de produzir filamentos com uma

diversidade de propriedades mecânicas e a capacidade de produzir filamentos com variadas composições químicas (LI et al., 2020b).

A utilização de uma bioimpressora para produção de filamentos oferece diversas vantagens, incluindo controle preciso sobre a composição e geometria do filamento, permitindo propriedades de material personalizadas para aplicações específicas (GU et al., 2020). As bioimpressoras possibilitam produzir filamentos complexos e personalizáveis com células incorporadas, fatores de crescimento ou agentes terapêuticos, facilitando a criação de estruturas e implantes teciduais. No entanto, também existem desvantagens notáveis, tais como a velocidade de produção relativamente lenta em comparação com os métodos tradicionais de fabricação de filamentos (LI; GUO; ZHANG, 2021). Os filamentos bioimpressos também podem exigir equipamentos e conhecimentos especializados, aumentando os custos de produção. Além disso, alcançar uma qualidade consistente e garantir a estabilidade a longo prazo dos filamentos bioimpressos pode ser um desafio devido à sensibilidade dos componentes biológicos e ao risco de contaminação (BARREIRO CARPIO et al., 2021).

O uso de bioimpressora ou extrusão manual para produção de filamentos apresentam algumas diferenças. Uma bioimpressora oferece precisão automatizada na deposição de filamentos, permitindo designs complexos e personalizáveis com controle preciso sobre a composição do material e distribuição celular. Já a extrusão manual, por outro lado, envolve uma abordagem mais rápida e prática, mas normalmente é menos precisa, tornando-a mais adequada para fabricação de filamentos simples e estruturas menos complexas. Embora uma bioimpressora possa garantir a reprodutibilidade, a extrusão manual pode ter uma curva de aprendizado mais acentuada e consistência potencialmente menor. A escolha entre os dois métodos depende frequentemente da complexidade dos filamentos desejados e das necessidades específicas de pesquisa ou fabricação na área de engenharia de tecidos e bioimpressão.

3.2 AVALIAÇÃO DE FILAMENTOS DE HIDROGÉIS BIOPOLIMÉRICOS ARMAZENADOS POR ATÉ QUATRO SEMANAS

Ao avaliar o pico de força dos filamentos de hidrogel da Fig. II-8A, observou-se que o comportamento é semelhante para todas as amostras, com pouca variação

ao longo das semanas de armazenamento dos hidrogéis. No entanto, os hidrogéis DMEM-8, DMEM-10 e DMEM-14 se destacam por não alterarem suas propriedades físicas relacionadas à força máxima resistida durante as 4 semanas de avaliação quando sob a tensão eletromecânica aplicada. Essas observações também são similares para os valores de tensão de pico na Fig. II-8B. Em relação à proporção de deformação dos materiais, como mostrado na Fig. II-8C, apenas os hidrogéis DMEM-10 e DMEM-11 se destacaram com valores semelhantes ao longo de todo o período avaliado. Na Fig. II-8D, os biomateriais destacados anteriormente nas medições de pico de força são mais uma vez aqueles que mantiveram similaridade em termos de valores de módulo ao longo das 4 semanas de avaliação, somados a eles o hidrogel DMEM-15. Curiosamente, os filamentos que mantiveram suas propriedades de resistência ao longo das semanas, como DMEM-8 e DMEM-10, são justamente aqueles que apresentam maiores concentrações de alginato de sódio e/ou gelatina. Por outro lado, o DMEM-14 possui a maior concentração do agente de reticulação. Essas variações podem modular as características dos hidrogéis, principalmente em relação à viscosidade e elasticidade, contribuindo assim para os atributos mecânicos dos filamentos. Ademais, essas observações são corroboradas com as curvas de deformação mostradas na Figura II-9.

Lee (2019) e colaboradores em estudo anterior, demonstraram que filamentos produzidos a partir de hidrogéis compostos por alginato e gelatina podem manter suas características mecânicas, como resistência à tração e elasticidade, mesmo após armazenamento prolongado. Os filamentos de hidrogéis produzidos com esta combinação de biopolímeros também podem manter suas propriedades de liberação de fármacos ao longo do tempo, mesmo após armazenamento prolongado (GIUSEPPE et al., 2018). Além disso, os filamentos produzidos com estes biopolímeros têm sido utilizados com sucesso em processos de impressão 3D, mantendo sua printabilidade e propriedades mecânicas mesmo após longos períodos de armazenamento (JACOB et al., 2021).

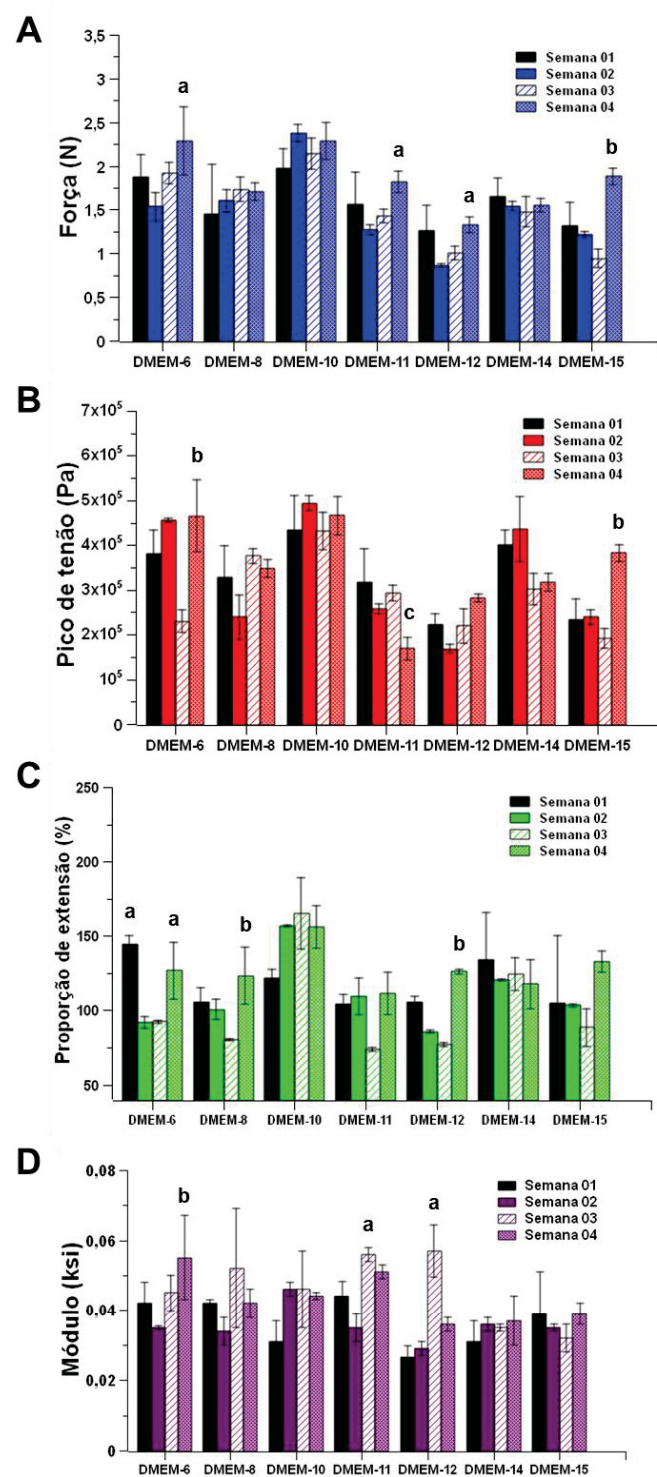


Figura II-8. Avaliação de filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogéis armazenados por até quatro semanas. (A) Força máxima; (B) Pico de tensão; (C) Tensão na ruptura; (D) Módulo. Análise estatística ($p < 0,05$): a = estatisticamente diferente da segunda e terceira semana; b = estatisticamente diferente da primeira, segunda e terceira semana; c = Todos estatisticamente diferentes em relação à quarta semana.

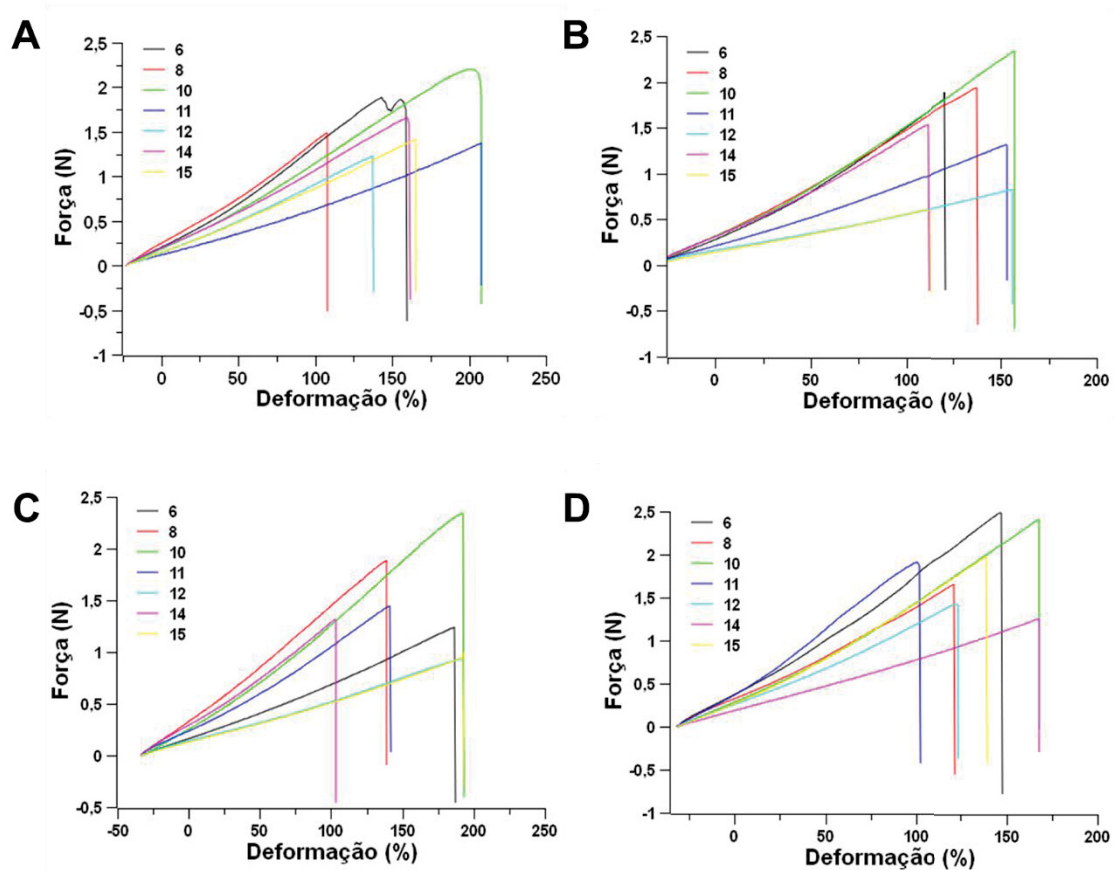


Figura II-9. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogéis biopoliméricos armazenados e avaliados semanalmente durante quatro semanas, sendo avaliados até o rompimento provocado pela extensora eletromecânica. A) Semana 01; B) Semana 02; C) Semana 03; D) Semana 04. A deformação dos filamentos ocorre devido à aplicação de uma tensão vertical sobre cada amostra, resultando na força máxima suportada por cada filamento até seu rompimento, resultando na queda abrupta nas curvas dos gráficos.

A importância de manter a viabilidade e preservação das características de um hidrogel ou biotinta (hidrogel acrescido de células) ao longo de vários dias, semanas ou mesmo meses de armazenamento está relacionada a vários fatores. Se contiverem células, é crucial que permaneçam viáveis durante o período de armazenamento. Isso é particularmente importante em aplicações de engenharia de tecidos ou medicina regenerativa, onde as células são elementos essenciais para a implantação ou enxerto bem-sucedidos (OKWUOSA et al., 2021). Além da viabilidade celular, é crucial que os componentes bioativos presentes no hidrogel mantenham suas propriedades e funcionalidade ao longo do tempo. Isso inclui a preservação de fatores de crescimento, proteínas bioativas ou outros componentes que desempenham um papel crítico na resposta biológica (DZOBO et al., 2018). A estrutura 3D e as propriedades físicas de um hidrogel, como elasticidade, porosidade

e desintegração controlada, devem ser preservadas para garantir sua integridade estrutural e capacidade de suportar a regeneração de tecidos ou outras aplicações específicas (ZHU; MARCHANT, 2011). O armazenamento adequado também é importante para evitar a contaminação microbiológica do hidrogel ou biotinta, garantindo a segurança do material durante o uso clínico ou laboratorial. Portanto, garantir a viabilidade e manutenção das características de um hidrogel ou biotinta ao longo do armazenamento (vida de prateleira) é uma etapa essencial a ser considerada durante o desenvolvimento para sua aplicabilidade e eficácia.

3.3 COMPORTAMENTOS DOS HIDROGÉIS NO ENSAIO DE INTUMESCIMENTO E DESINTEGRAÇÃO

Seguindo o ensaio de intumescimento e desintegração com os hidrogéis, a curva cinética de ganho ou perda de massa ao longo de um período de até 7 dias é mostrada na Figura II-10. As flutuações nas variações de massa dos discos avaliados indicando comportamento de intumescimento nos primeiros dois dias e início do processo de desintegração são apresentadas no gráfico. É provável que em todos os hidrogéis produzidos e posteriormente reticulados existam poros que garantam a absorção da solução de PBS, como já foi observado por outros autores em outros tipos de hidrogéis (BOCIAGA et al., 2019). Este fato levou a variações de volume de até aproximadamente 30%. Porém, ao mesmo tempo, a presença de poros também contribui para a desintegração do biomaterial ao longo do tempo. Não foi observado nenhum dos biomateriais que apresentasse curva cinética sugestiva de ser significativamente diferente, pois eles tendem a apresentar comportamento bastante similar.

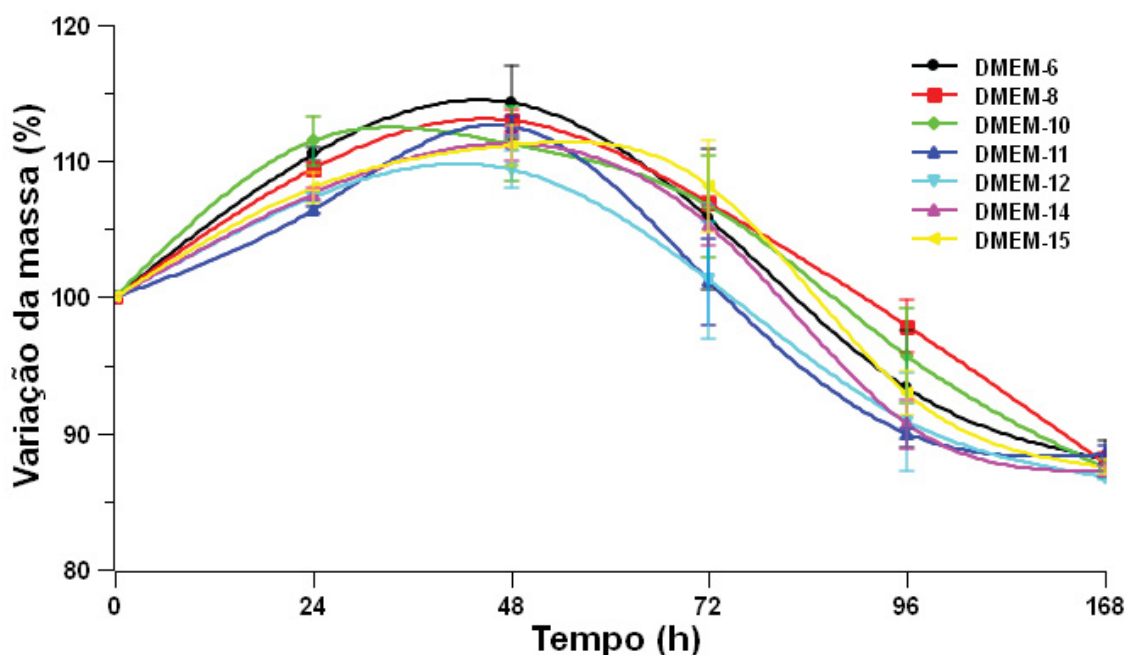


Figura II-10. Curva cinética indicativa da taxa de ganho e perda de massa dos hidrogéis pelos ensaios de intumescimento e desintegração, conduzidos por um período de sete dias e armazenados em incubadora a 37°C em PBS. Foi notada variação de cerca de 30% no ganho e perda de massa para os hidrogéis ao longo de todo o período.

Ensaio de intumescimento e desintegração de hidrogéis são métodos importantes para avaliar as propriedades desses biomateriais. Esses ensaios visam determinar a capacidade do hidrogel de absorver líquidos, inchar e reter sua integridade estrutural ao longo do tempo, bem como investigar sua eventual desintegração em meio aquoso, como água, solução tampão ou meio de cultura celular (LOUREIRO et al., 2023). A perda de massa e as mudanças nas propriedades físicas e químicas do hidrogel são avaliadas, fornecendo informações sobre a velocidade e o mecanismo de desintegração do biomaterial (VESKOVIĆ; NAKARADA; POPOVIĆ BIJELIĆ, 2021). As principais características que um hidrogel deve apresentar para esses ensaios são a capacidade de absorção de líquidos, estabilidade estrutural/química, tempo de desintegração controlado e biocompatibilidade (ALONSO et al., 2021). O hidrogel deve absorver e reter uma quantidade adequada de líquido durante o ensaio de intumescimento, bem como manter sua integridade estrutural sem deformações ou colapsos excessivos. Dependendo da aplicação, um hidrogel pode ser projetado para degradar a uma taxa específica, e esse tempo de desintegração controlado pode ser avaliado por meio do

ensaio de desintegração (CHAI; JIAO; YU, 2017). Se o hidrogel for utilizado em aplicações biomédicas, é importante que seja biocompatível, ou seja, que não cause toxicidade ou reações adversas quando em contato com células, tecidos ou órgãos (KAROYO; WILSON, 2021).

4 CONCLUSÃO

Este estudo investigou o comportamento, a resistência mecânica e a desintegração de filamentos de hidrogéis biopoliméricos ao longo do tempo. A técnica de fiação úmida foi empregada para produzir os filamentos de hidrogéis com diâmetros variados utilizando diferentes concentrações de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio como agente de reticulação. Os resultados mostraram que os filamentos produzidos com agulhas de maior calibre, tanto manualmente quanto utilizando uma bioimpressora 3D, exibiram maior tração eletromecânica e alongamento reduzido, enquanto aqueles produzidos com agulhas de menor calibre apresentaram menor resistência à tração, mas maior elasticidade. O tempo de armazenamento não impactou expressivamente no comportamento mecânico da maioria dos filamentos, indicando sua durabilidade ao longo do tempo. Entretanto, a formulação DMEM-10 foi a que não teve variação significativa dos aspectos avaliados. Os testes de intumescimento e desintegração demonstraram que os hidrogéis produzidos com concentrações mais altas de alginato de sódio absorveram o líquido (PBS) mais rapidamente e se dissolveram mais lentamente, enquanto aqueles com concentrações mais baixas de gelatina absorveram o líquido mais lentamente, mas se degradaram em uma taxa mais rápida. Os filamentos de hidrogéis desenvolvidos exibiram resistências eletromecânicas variáveis dependendo de seus diâmetros. Eles mantiveram suas propriedades ao longo do tempo, tornando-os adequados para aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa. As características de absorção e desintegração foram influenciadas pela composição do biomaterial de hidrogel, destacando a importância de adequar a formulação para aplicações específicas. Essas descobertas contribuem para a compreensão do comportamento de um determinado hidrogel e fornecem informações valiosas para o *design* e otimização de estruturas baseadas em hidrogel em bioengenharia e imitação de tecidos. No geral, a caracterização de filamentos de hidrogéis por meio da

investigação de seu comportamento, resistência mecânica e desintegração ao longo do tempo contribui para o avanço das técnicas de fabricação aditiva no campo da bioengenharia tecidual. As descobertas deste estudo fornecem uma base para mais pesquisas e desenvolvimento de biomateriais à base de hidrogel, como filamentos com propriedades personalizadas para uma ampla gama de aplicações biomédicas.

CAPÍTULO III

ESTUDO DA APLICAÇÃO DE HIDROGÉIS COMO BIOMATERIAL BASE PARA BIOTINTAS, CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA E MICROSCÓPICA, E USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL EM ANÁLISES HISTOLÓGICAS

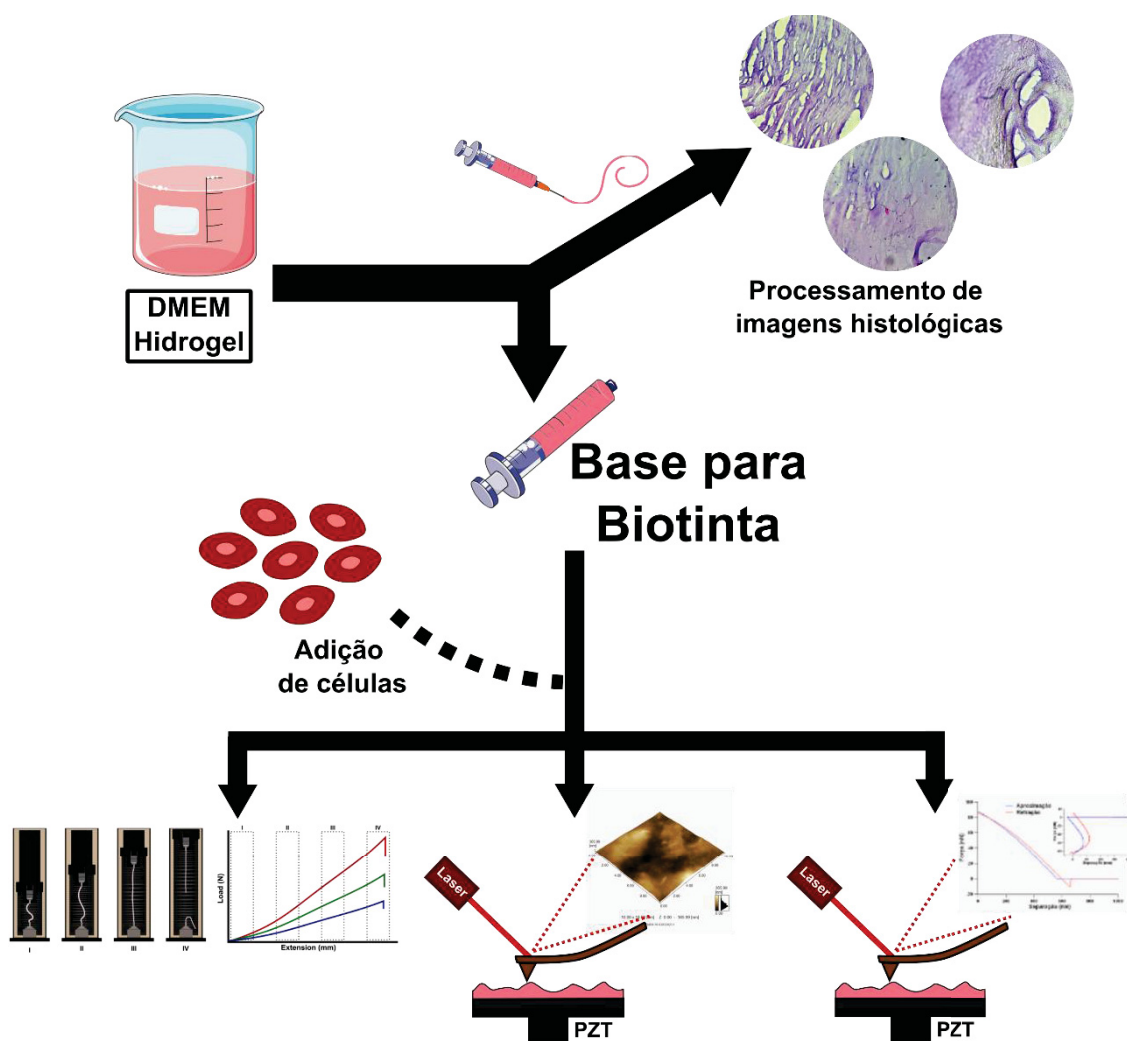


Figura III-1. Resumo gráfico apresentando as etapas desde o processamento histológico dos filamentos de hidrogéis até a caracterização e avaliação das propriedades micro- e nanomecânicas após a adição de células ao hidrogel.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar estratégias para o desenvolvimento de hidrogéis estéreis, bem realizar uma simulação de transporte, avaliar as propriedades micro- e nanomecânicas de filamentos de hidrogéis após a incorporação de células (utilizando a formulação DMEM-10), e por fim avaliar as características morfológicas e ultraestruturais dos filamentos e verificar se o uso da inteligência artificial possibilita classificar e distinguir imagens de secções histológicas de filamentos biopoliméricos antes e após o processo de estiramento mecânico. Os resultados do ensaio de esterilidade dos hidrogéis evidenciaram a eficácia do processo de preparo, garantindo a esterilidade dos produtos desenvolvidos. A caracterização morfológica por microscopia de luz revelou homogeneidade das secções histológicas, permitindo a visualização de diferentes áreas longitudinais e transversais, sendo inclusive possível distinguir visualmente os filamentos estirados e não-estirados. A adição de células no hidrogel formulado DMEM-10 mostrou modulações nas propriedades mecânicas, incluindo a diminuição da resistência à tração eletromecânica. O módulo de Young e a energia dissipada foram influenciados pela interação entre células e hidrogel. A investigação topográfica e de rugosidade por microscopia de força atômica indicou similaridade nas propriedades superficiais após a celularização, devido às dimensões microscópicas das células em relação à escala macroscópica de tamanho do hidrogel. As curvas de força-distância revelaram que a celularização influenciou as interações ponteira-amostra, afetando adesão e propriedades elásticas. As características das curvas de força foram moduladas pelas propriedades das células e suas interações com o hidrogel. Além disso, análises realizadas por microscopia eletrônica de varredura dos filamentos foram bem-sucedidas em revelar a ultraestrutura dos microambientes. A utilização de aprendizado de máquina para análise de imagens mostrou resultados promissores, embora com limitações nas predições de classes específicas. Em conclusão, este estudo demonstrou a eficácia da esterilização, influência da celularização nas propriedades mecânicas e estruturais e a promissora aplicação da inteligência artificial na análise de imagens de filamentos de hidrogel.

Palavras-chave: Cortes histológicos; células; inteligência artificial; esterilidade; biotinta.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate strategies for the development of sterile hydrogels, perform a transport simulation, assess the micro- and nanomechanical properties of hydrogel filaments after cell incorporation (using the DMEM-10 formulation), and finally, evaluate the morphological and ultrastructural characteristics of the filaments. The study also aimed to investigate whether the use of artificial intelligence allows for the classification and distinction of images of histological sections of biopolymeric filaments before and after the mechanical stretching process. The results of the hydrogel sterility test demonstrated the effectiveness of the preparation process, ensuring the sterility of the developed products. Morphological characterization using light microscopy revealed the homogeneity of histological sections, allowing the visualization of different longitudinal and transverse areas. It was even possible to visually distinguish between stretched and unstretched filaments. The addition of cells to the DMEM-10 hydrogel formulation showed modulations in mechanical properties, including a decrease in electromechanical tensile strength. The Young's modulus and dissipated energy were influenced by the interaction between cells and the hydrogel. Topographical and roughness investigation using atomic force microscopy indicated similarity in surface properties after cell incorporation due to the microscopic dimensions of the cells in comparison to the macroscopic size scale of the hydrogel. Force-distance curves revealed that cell incorporation influenced the tip-sample interactions, affecting adhesion and elastic properties. The features of force curves were modulated by cell properties and their interactions with the hydrogel. Moreover, scanning electron microscopy analyses of the filaments successfully revealed the ultrastructure of the microenvironments. The use of machine learning for image analysis showed promising results, albeit with limitations in predicting specific classes. In conclusion, this study demonstrated the effectiveness of sterilization, the influence of cell incorporation on mechanical and structural properties, and the promising application of artificial intelligence in the analysis of hydrogel filament images.

Key words: Histological sections; cells; artificial intelligence; sterility; bioink.

1. INTRODUÇÃO

Hidrogéis são redes 3D de polímeros hidrofílicos que têm a capacidade de reter uma grande quantidade de água, mantendo sua integridade estrutural (AHMED, 2015). Esses materiais são frequentemente utilizados como base para adicionar células em diversas aplicações, como engenharia de tecidos e medicina regenerativa (BOCIAGA et al., 2019). De maneira geral, as propriedades únicas dos hidrogéis, incluindo sua biocompatibilidade e propriedades mecânicas ajustáveis, os tornam adequados para a criação de ambientes favoráveis ao crescimento e proliferação celular (CHAI; JIAO; YU, 2017). Ao encapsular células em hidrogéis, os pesquisadores podem imitar a matriz extracelular encontrada em tecidos naturais, fornecendo não apenas um suporte, mas também um substrato nutritivo para as células aderirem, migrarem e se diferenciarem (SONG; GERECHT, 2023). Isso permite o desenvolvimento de tecidos e órgãos artificiais, bem como sistemas para entrega de fármacos, com potenciais implicações terapêuticas para uma ampla gama de condições médicas (MANSOUR et al., 2023).

Manter a esterilidade é uma etapa crucial durante o desenvolvimento de hidrogéis para a incorporação de células, a fim de garantir o sucesso e aplicações em campos como a engenharia de tecidos (HAN et al., 2017). A esterilidade de hidrogéis é essencial para evitar a contaminação que pode comprometer a viabilidade celular, a proliferação e os resultados pretendidos (S. A. BENTO et al., 2023). Pesquisadores e profissionais empregam técnicas assépticas rigorosas durante a preparação de hidrogéis, encapsulamento celular e manuseio subsequente. Isso inclui realizar todas as etapas em um ambiente limpo, utilizando materiais, reagentes e equipamentos estéreis para minimizar o risco da introdução de microrganismos nocivos (GALANTE et al., 2016, 2018). Além disso, alguns biomateriais à base de hidrogéis têm propriedades antimicrobianas inerentes, auxiliando na manutenção de um ambiente controlado e estéril propício ao crescimento e funcionalidade das células encapsuladas (KAPUSTA et al., 2023).

Outro aspecto muito importante a ser considerado é o transporte de hidrogéis para incorporação de células o qual apresenta vários desafios devido à sua natureza sensível. Hidrogéis são frequentemente frágeis e podem ser facilmente deformados ou danificados durante o transporte, afetando sua integridade estrutural e adequação para aprisionamento celular (FUCHS; SHARIATI; MA, 2020). Manter uma temperatura

constante é crucial para evitar alterações nas propriedades do hidrogel, como estado de reticulação ou características mecânicas, que podem afetar o comportamento celular (NIE et al., 2022). Além disso, prevenir a contaminação durante o transporte é vital para garantir a esterilidade necessária para uma cultura celular bem-sucedida (JAYAKUMAR; JOSE; LEE, 2020). De modo geral, hidrogéis também podem ser sensíveis a mudanças no pH, osmolaridade e exposição ao ar, complicando ainda mais seu transporte (RIZWAN et al., 2017). Para enfrentar esses desafios, embalagens especializadas, ambientes com temperatura controlada e procedimentos de manuseio adequados são necessários para preservar as propriedades de um hidrogel e consequentemente a viabilidade das células até a chegada ao seu destino (SYKES, 2018).

Não obstante, analisar a matriz de um hidrogel contendo células por meio de secções de imagens histológicas por microscopia de luz ou quanto a aspectos ultraestruturais por microscopia eletrônica são etapas cruciais, pois fornecem informações sobre a distribuição celular, morfologia, interação com a matriz e desenvolvimento do tecido (ALTAY et al., 2020). Essas abordagens ajudam a avaliar a eficácia de um hidrogel como ambiente citocompatível, revelando fatores que influenciam o comportamento celular, proliferação e desafios potenciais, como distribuição desigual ou limitações relacionadas à difusão de nutrientes (MARRELLA et al., 2019). As análises microscópicas seja de secções ou mesmo de fragmentos de hidrogéis revelam informações úteis quanto à otimização do *design* de um hidrogel para melhorar a integração celular e oferecer resultados funcionais, tornando-as ferramentas vitais no avanço da engenharia de tecidos e aplicações em medicina regenerativa (SHORT et al., 2017).

Paralelamente, a utilização de inteligência artificial (IA) para analisar imagens e classificá-las é uma promessa de impacto em vários domínios (ARABI et al., 2021). A análise de imagens com tecnologia de IA emprega algoritmos sofisticados para extrair padrões e recursos intrincados de imagens, permitindo classificar e diferenciar objetos, estruturas ou características nas imagens com precisão notável (DURKEE et al., 2021). Essa tecnologia encontra aplicações em áreas como diagnóstico médico, controle de qualidade e sistemas autônomos (ZHAO et al., 2021b). Um exemplo de ferramenta que permite aos usuários treinar uma IA a reconhecer padrões em imagens é o "*Teachable Machine*", ferramenta desenvolvida pelo *Creative Lab* do Google e disponível gratuitamente. Esta ferramenta capacita os indivíduos a treinar

seus próprios modelos de IA sem amplo conhecimento de codificação, permitindo que a IA baseada em aprendizado de máquina diferencie objetos com base em exemplos fornecidos pelo usuário, um processo que contribui para democratizar e popularizar os recursos de IA para uma gama mais ampla de usuários (CARNEY et al., 2020; YOGENDRA PRASAD et al., 2022).

O objetivo do estudo foi avaliar a esterilidade dos hidrogéis desenvolvidos em seguida à sua produção, bem como após uma simulação de transporte, avaliar as propriedades micro- e nanomecânicas depois da incorporação de células, caracterizar os filamentos de hidrogéis morfologicamente por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura, e avaliar se o uso da inteligência artificial é capaz de diferenciar as imagens de secções histológicas dos filamentos antes e após o processo de estiramento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TESTE DE EFICÁCIA DE CONSERVAÇÃO

As combinações dos biopolímeros selecionadas e mostradas na Tabela II-1 da seção 2.1, Capítulo II, foram testadas quanto à potencial alcance de esterilidade logo após a produção de hidrogéis com os biopolímeros tendo sido previamente esterilizados, quanto após uma simulação de transporte urbano. O alginato de sódio e a gelatina foram expostos por 10 minutos em luz ultravioleta em câmara esterilizadora SunBox (Due Laser, Brasil) e em seguida transferidos em placas Petri de vidro para uma cabine de fluxo laminar horizontal Pa 200 (Pachane, Brasil). Posteriormente, a solubilização ocorreu como mostrado na seção 2.2 do Capítulo II, com a adição de penicilina (100 Unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco, EUA) na proporção de 1% volume/volume. Os hidrogéis foram armazenados em microtubos estéreis e identificados para serem armazenados tanto à temperatura ambiente quanto à 4°C.

Após 24 horas, iniciou-se a elaboração dos meios de cultivos utilizados para os seguintes processos: 1) o meio de cultivo sólido Muller-Hinton Ágar (Merck, Alemanha) foi utilizado para simular favoravelmente o crescimento de bactérias; e 2) o meio de cultivo sólido Sabouraud Ágar, composto por dextrose (Kasvi, Itália),

peptona (Oxoid, Inglaterra) e Ágar (Vetec, Brasil) foi utilizado para simular favoravelmente o crescimento de fungos/leveduras. Após a pesagem dos componentes em balança semi-analítica (Quimis, Brasil), os meios de cultivo microbiológico foram diluídos em água ultrapura, dentro de Erlenmeyers, tampados com algodão amarrado com uma gaze e barbante, e posteriormente acondicionados em uma autoclave (Stermax, Brasil) para esterilização. Também, foram preparados meios de cultivo líquidos baseados nos mesmos elementos citados anteriormente, mas na ausência de ágar.

Para o teste e validação da esterilidade do biomaterial, microplacas de 24 poços (Kasvi, Itália) foram utilizadas. Após o ciclo de autoclave, dentro de uma cabine de fluxo laminar horizontal (Veco, Brasil), foi coletado 1 mL de cada meio contendo ágar e depositado em cada poço da microplaca. A Figura III-2 ilustra as etapas deste ensaio. Em seguida à solidificação, utilizando uma ferramenta perfuradora, orifícios foram feitos para a deposição do hidrogel. Com o auxílio de uma haste metálica, porções dos hidrogéis que foram mantidos a 4°C, como à temperatura ambiente, foram depositados no centro de cada orifício (Fig. III-2A), nas respectivas colocações. A microplaca contendo os hidrogéis adicionados em meio Muller-Hinton sólido, foi acondicionada em uma incubadora bacteriológica (Lucadema, Brasil) a 37°C por 48 horas. Já a microplaca contendo os hidrogéis em meio Sabouraud sólido, foi acondicionada em uma incubadora (Quimis, Brasil) à temperatura ambiente (~25°C) por 7 dias.

Concomitantemente, os meios de cultivo Muller-Hinton e Sabouraud líquidos foram colocados separadamente em microtubos de 1,5 mL. Com o auxílio de uma haste metálica, porções dos hidrogéis foram colocadas dentro de cada microtubo, distinguindo daqueles mantidos à temperatura ambiente, quanto a 4°C. Os microtubos contendo hidrogéis em meio Muller-Hinton foram mantidos em incubadora *shaker* (Lucadema, Brasil) à 37°C por 24 horas. Já aqueles contendo hidrogéis em meio Sabouraud foram mantidos em incubadora *shaker* a 28°C. Após 24 horas, novos meios contendo ágar foram preparados e colocados nos poços de novas microplacas de 24 poços. Ao observar visualmente a completa desintegração das amostras, utilizando uma micropipeta coletaram-se 5 µL do meio líquido e estes foram colocados no centro de cada poço das novas placas (Fig. III-2B). A microplaca contendo os hidrogéis em meio Muller Hinton sólido, foi colocada em uma incubadora bacteriológica (Lucadema, Brasil) a 37°C por 48 horas. Já a microplaca contendo os

hidrogéis em meio Sabouraud sólido, foi acondicionada em incubadora (Quimis, Brasil) à temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) por 7 dias. Todas as amostras foram avaliadas por inspeção visual e fotografadas, conforme as identificações mostradas na Fig. III-2C.

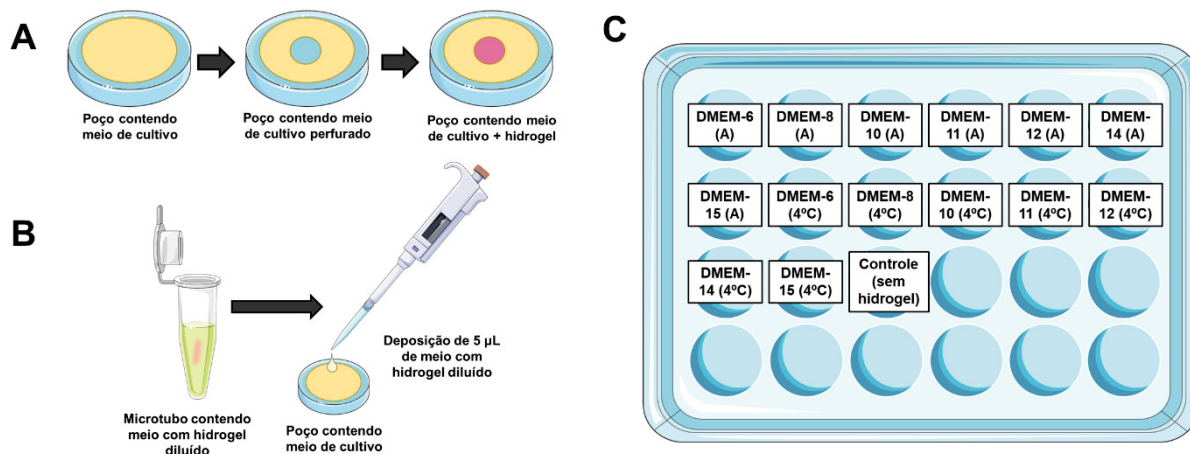


Figura III-2. Ilustração do teste de esterilidade dos hidrogéis em meios de cultivo microbiológicos Muller-Hinton e Sabouraud. (A) Demonstração da perfuração do meio solidificado e posterior preenchimento com hidrogel. (B) Demonstração da deposição do meio em que o hidrogel foi diluído e coletado em um poço. (C) Identificação da disposição em que as amostras foram colocadas em cada poço da microplaca de 24 poços.

2.2 TESTE DE TRANSPORTE E EFICÁCIA DE CONSERVAÇÃO

Os hidrogéis preparados na seção anterior foram mantidos tanto à temperatura ambiente, quanto a 4°C por uma semana, vedados com filme plástico (Parafilm, EUA). Os microtubos foram colocados dentro de sacos plásticos, fechados e embalados em papel pardo. Em seguida foi realizado um teste para verificar se durante um possível transporte do material, a condição de esterilidade seria preservada. Dessa forma, os hidrogéis foram acondicionados dentro de um recipiente de transporte e transladados durante dez dias. Durante este intervalo de tempo, os materiais foram mantidos nas condições iniciais. Após esse período, os microtubos contendo os hidrogéis foram abertos em cabine de fluxo laminar (Veco, Brasil) e realizado o teste de esterilidade conforme o item 2.1, deste capítulo.

2.3 MICROSCOPIA DE LUZ E HISTOLOGIA DOS FILAMENTOS DE HIDROGÉIS

Os filamentos produzidos utilizando hidrogéis à base das combinações dos biopolímeros selecionados e mostrados na Tabela II-1 da seção 2.1, Capítulo II, foram processados para avaliação em microscopia de luz. Para tal, utilizou-se filamentos extrusados antes e após serem esticados até suas rupturas, pela extensora eletromecânica (seção 2.4 do Capítulo I). Sendo assim, os biomateriais analisados se dividiam em dois grupos: Filamentos não esticados (F) e Filamentos Esticados (FE). Em tubos tipo Falcon de 15 mL, foram colocados fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento de cada filamento separadamente e identificados. Para iniciar o processamento, os biomateriais foram colocados em solução fixadora denominada por Metil-Carnoy, a qual é composta por 60% de metanol (J.T. Backer, EUA), 30% de clorofórmio (CRQ, Brasil) e 10% de ácido acético (Merck, Alemanha), por 2 horas à temperatura ambiente. Após retirar o fixador, as amostras foram submetidas a etapas sucessivas de concentrações decrescentes de etanol 100%, 90%, 80% em um intervalo de 40 minutos entre cada banho, e mantidos em etanol 70% *overnight* à 4°C. Após este período, as amostras foram submetidas a etapas de desidratação utilizando concentrações crescentes de etanol 80%, 90% e 100% (2×), em um intervalo de 40 minutos entre cada banho. Posteriormente, ocorreu o processo de diafanização, na qual as amostras foram mantidas em soluções de etanol/xileno na proporção de 1:1, em seguida em xileno 1 e posteriormente em xileno 2, sendo que também se manteve o período de 40 min em cada banho. Para o emblocamento dos filamentos, foi realizada a infiltração com Paraplast (*Sigma Life Science*, Suíça) por meio de dois banhos de 1 hora cada (Paraplast 1 e Paraplast 2). Após a infiltração, o material foi incluído em blocos de Paraplast, aguardada a solidificação e armazenados à temperatura ambiente.

Utilizando o equipamento Vibratome 3000 *plus* (*The Vibratome Company*, EUA), os blocos foram seccionados em espessuras de aproximadamente 5 µm, e as secções foram depositadas em lâminas de vidro, separando os cortes longitudinais e transversais, colocadas em uma chapa aquecida a aproximadamente 40°C para iniciar o processo de secamento do material e levadas posteriormente para uma estufa à 40°C *overnight*. As lâminas foram submetidas a um processo de coloração com hematoxilina e eosina (H&E). As análises das secções micrométricas dos filamentos foram realizadas em microscópio de luz (Nikon, Japão) acoplado com câmera digital (Digilab, Brasil) e documentadas digitalmente utilizando o *software* ImageView versão 3.7.

2.4 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO MECÂNICA DOS FILAMENTOS DO HIDROGEL OBTIDO PELA COMBINAÇÃO DMEM-10 ASSOCIADO À CÉLULAS OSCC-3

Para a investigação da influência de células adicionadas à hidrogéis biopoliméricos sobre o comportamento micro- e nanomecânico, filamentos celularizados com OSCC-3 (linhagem de câncer escamoso oral humano) foram produzidos. Estas células foram doadas gentilmente pela professora e pesquisadora da Universidade de Brasília, Dra. Andréa Barretto Motoyama, mantidas em garrafa de cultura com meio DMEM. A combinação escolhida para este experimento foi DMEM-10. O hidrogel foi produzido seguindo os mesmos procedimentos descritos na seção 2.2 do Capítulo I. Devido à problemas técnicos da incubadora de CO₂, as células não se mantiveram viáveis por longos períodos, porém seguimos com processo. Após a finalização da produção do hidrogel, cerca de $3,0 \times 10^4$ células foram adicionadas e incorporadas por agitação magnética para homogeneização completa. Posteriormente, os filamentos foram feitos seguindo os procedimentos da seção 2.3 do Capítulo II e estirados seguindo a seção 2.4 do Capítulo I. Para a avaliação micro- e nanomecânica foram realizados os experimentos seguindo as seções 2.5 e 2.6 do Capítulo I.

2.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS FILAMENTOS

Os filamentos com e sem a incorporação de células que foram produzidos na seção 2.4 deste Capítulo III foram caracterizados morfolologicamente por MEV. Destes biomateriais foram realizados dois cortes, longitudinal (1 cm) e transversal (2 mm), com o auxílio de um bisturi, em fragmentos para uma melhor visualização interna dos biomateriais. Posteriormente, os fragmentos foram separados em tubos tipo Falcon de 15 mL, fixados com a solução de Karnovsky em cada tubo e armazenados a 4°C overnight. Em seguida, o fixador foi retirado e lavados duas vezes com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Ao retirar o tampão, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio (OsO₄) durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas 2 vezes com água destilada. A partir disso, foram realizadas etapas sucessivas de desidratação em concentrações crescentes de acetona [50, 70, 90 e 100% (2×)] por 10 minutos em cada etapa. Subsequentemente, os fragmentos passaram por processo de secagem ao ponto crítico utilizando uma câmara com gás

carbônico (CO₂). Após a secagem, foram montados sobre fita de carbono em porta-amostras (stubs), e posteriormente foram metalizados com uma fina camada de ouro. Em seguida, os fragmentos foram analisados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL Ltd, Japão) operado à 15 kV. As imagens foram adquiridas com uma câmera digital integrada ao microscópio com magnificações de 500, 1000, 2500 e 5000 mil vezes. Cada amostra analisada foi observada em quatro posições diferentes conforme representações esquemáticas mostradas na Figura III-3.

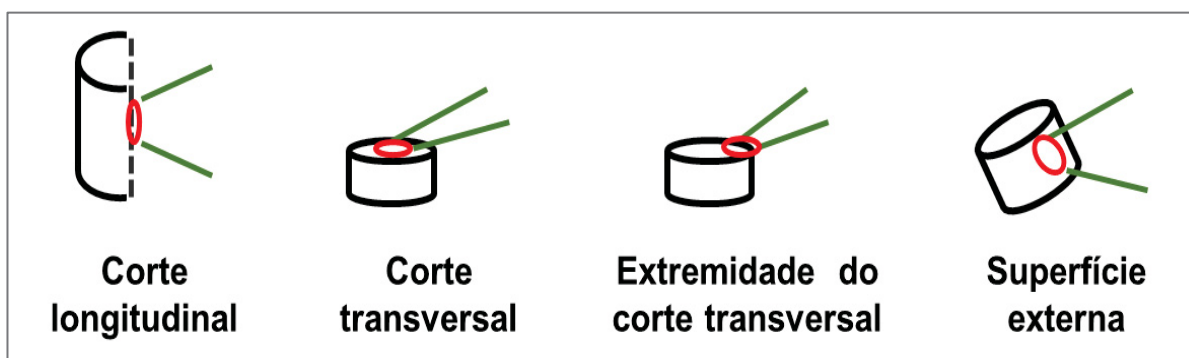


Figura III-3. Representações esquemáticas das posições de cada parte dos filamentos com e sem células analisadas por MEV. Os cortes longitudinal e transversal representam as estruturas internas, já a extremidade e superfície representam porções mais externas dos filamentos. O círculo vermelho e as linhas verdes indicam a posição e localização das amostras onde ocorreu a captura das imagens.

2.6 UTILIZAÇÃO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL COMO ESTRATÉGIA PARA CLASSIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DE IMAGENS DE BIOMATERIAIS

As imagens por microscopia de luz das secções obtidas no ensaio anterior foram submetidas a teste de aprendizado de máquina seguido de predição utilizando a ferramenta de IA *Teachable Machine*. A Figura III-4 detalha as partes das quais se compõem a ferramenta utilizada. Essencialmente, a linguagem de aprendizado de máquina se baseia na utilização de classes, em que o fornecimento de imagens (“entradas”) e suas respectivas identificações são necessárias para o reconhecimento. Posteriormente, pelo próprio algoritmo, ocorre o treinamento onde são aprendidos os parâmetros que relacionaram as imagens às classes. Em seguida, o modelo preditivo está pronto para ser utilizado em validação de novas imagens que não foram submetidas a treinamento prévio, mas que podem ou não ser associadas a alguma das classes treinadas. A partir disso, as imagens testadas serão identificadas e

classificadas em porcentagem de confiança (certeza), perante as classificações (classes) nas quais a IA foi treinada (Fig. III-4A).

Para o treinamento mostrado na Fig. III-4B, as classes foram identificadas como “F” (filamentos não estirados) e “FE” (filamentos estirados). A alimentação de cada classe ocorreu com a adição de 250 imagens distintas (capturadas com as objetivas de 4x e 10x do microscópio) para cada classe. Posteriormente ao treinamento, 47 imagens, que não foram utilizadas na construção deste banco de imagens treinadas, foram testadas para a predição. A hipótese avaliada foi a de que a IA poderia identificar e classificar as imagens em dois grupos, baseando-se nas morfologias dos filamentos estirados e não-estirados.

Para o treinamento mostrado na Fig. III-4C, as classes foram identificadas como DMEM-6, DMEM-8, DMEM-10, DMEM-11, DMEM-12, DMEM-14 e DMEM-15. A fim de dificultar e identificar a potencial “sensibilidade” da predição, as sete classes foram alimentadas com aproximadamente 70 imagens (filamentos estirados e não-estirados) para cada uma. Posteriormente ao treinamento, 49 imagens, que não foram utilizadas na construção deste banco de imagens treinadas, foram testadas para a predição. A hipótese avaliada foi a de que a IA poderia identificar e classificar as imagens baseando nos sete grupos distintos, e identificando à qual deles se assemelha mais, embasada nas morfologias.

Durante a predição da IA, foi marcado que o limiar padrão de identificação das imagens seria acima de 50%, valendo-se o seu reconhecimento. Após a realização de todas as previsões, os valores dados foram construídos em uma matriz de confusão, mostrada na Figura III-5, a qual é calculada pela função de pesquisa classificação e nela é exibida a distribuição dos registros em termos de suas classes atuais e de suas classes previstas. Para tal, indica a qualidade do modelo desenvolvido. Essa matriz foi desenvolvida utilizando a plataforma ChatGPT e a programação realizada em Python.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Análise de Variância (ANOVA) com o teste de Tukey para comparar as médias e determinar a significância estatística entre as características dos hidrogéis e filamentos produzidos em triplicata.

Diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$. O software PAST 3 foi utilizado para a análise (HAMMER, O. et al., 2001).

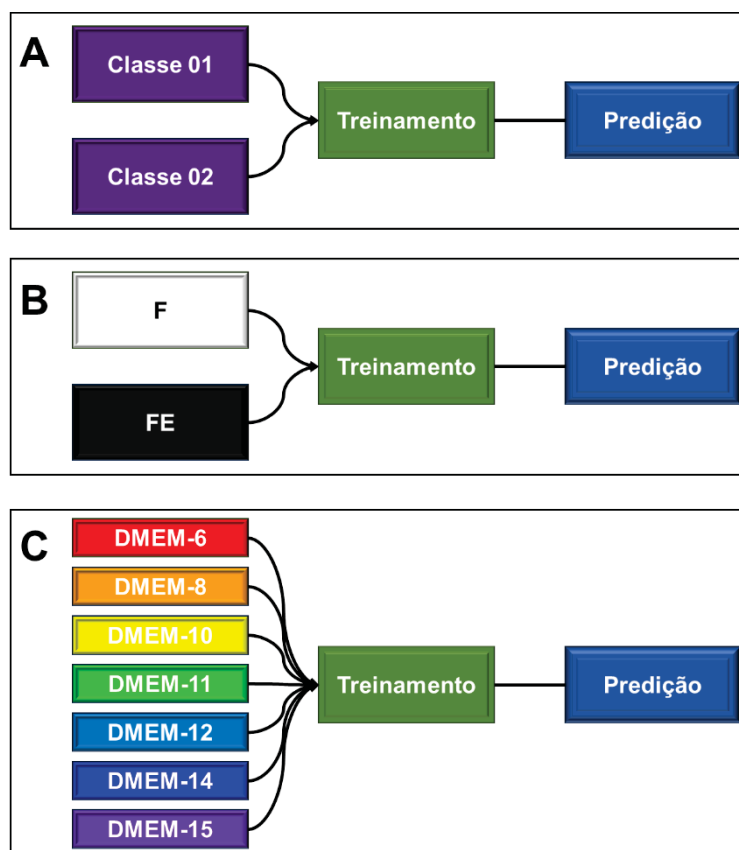


Figura III-4. Representação esquemática da ferramenta Teachable Machine utilizada como inteligência artificial baseada em aprendizado de máquina para a predição das classificações de imagens de filamentos. A) Estrutura inicial do modelo mostrando as posições cada estrutura e sua determinada função. B) Codificação utilizada para o teste de aprendizado e predição das imagens de secções dos filamentos estirados e não-estirados. C) Codificação utilizada para o teste de aprendizado e predição das imagens de secções para os sete grupos diferentes de filamentos de hidrogéis produzidos.

		Valor Predito	
		Sim	Não
Real	Sim	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso Negativo (FN)
	Não	Falso Positivo (FP)	Verdadeiro Negativo (VN)

Figura III-5. Ilustração da matriz de confusão, na qual as predições foram inseridas e gerada a confiabilidade do aprendizado da IA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DE EFICÁCIA DE CONSERVAÇÃO

Os ensaios de eficácia de conservação dos hidrogéis mostraram que, durante o período de dois e sete dias de incubação após a fabricação dos hidrogéis (Figura III-6), bem como depois do teste de transporte (Figura III-7), não houve o crescimento microrganismos. Isto indicou que todo o preparo dos hidrogéis, seguindo o máximo de cuidado, resultou na esterilidade de todos os biomateriais desenvolvidos. Esta é uma das principais preocupações na biofabricação, justamente pelo fato de que os biopolímeros utilizados como componentes para a composição dos hidrogéis naturalmente não serem estéreis. Isso causa uma questionamentos atuais sobre qual o melhor procedimento a se realizar para garantir que estes biomateriais estejam aptos à produção de biotintas.

Bento et al. (2023), comentam que a esterilidade de hidrogéis é essencial para evitar a contaminação. Além disso, a ocorrência eventual de contaminação pode comprometer a viabilidade, a proliferação celular e os resultados pretendidos. Hidrogéis que foram esterilizados como estes apresentados neste estudo oferecem uma vantagem valiosa para experimentos de laboratório devido à sua biocompatibilidade e natureza estéril, atributos já indicados como desejáveis por outros autores (GEORGE et al., 2022). Ademais, as redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos possuem um elevado teor de água semelhante aos tecidos biológicos, o que tende ao favorecimento do crescimento de microrganismos (VIRYCH et al., 2021), requerendo sempre medidas que previnam essa ocorrência.

A esterilização garante a remoção de potenciais contaminantes, minimizando o risco de interações não intencionais e mantendo condições assépticas cruciais para resultados experimentais confiáveis (STOPPEL et al., 2021; TAO et al., 2021). Assim, os hidrogéis desenvolvidos e estéreis assumem como possibilidades para incorporação de células e se tornarem insumos de biotintas. Como exposto, além das características apresentadas, por ter como base o meio de cultivo DMEM, a condição para comportar células se possibilita para futuros ensaios.

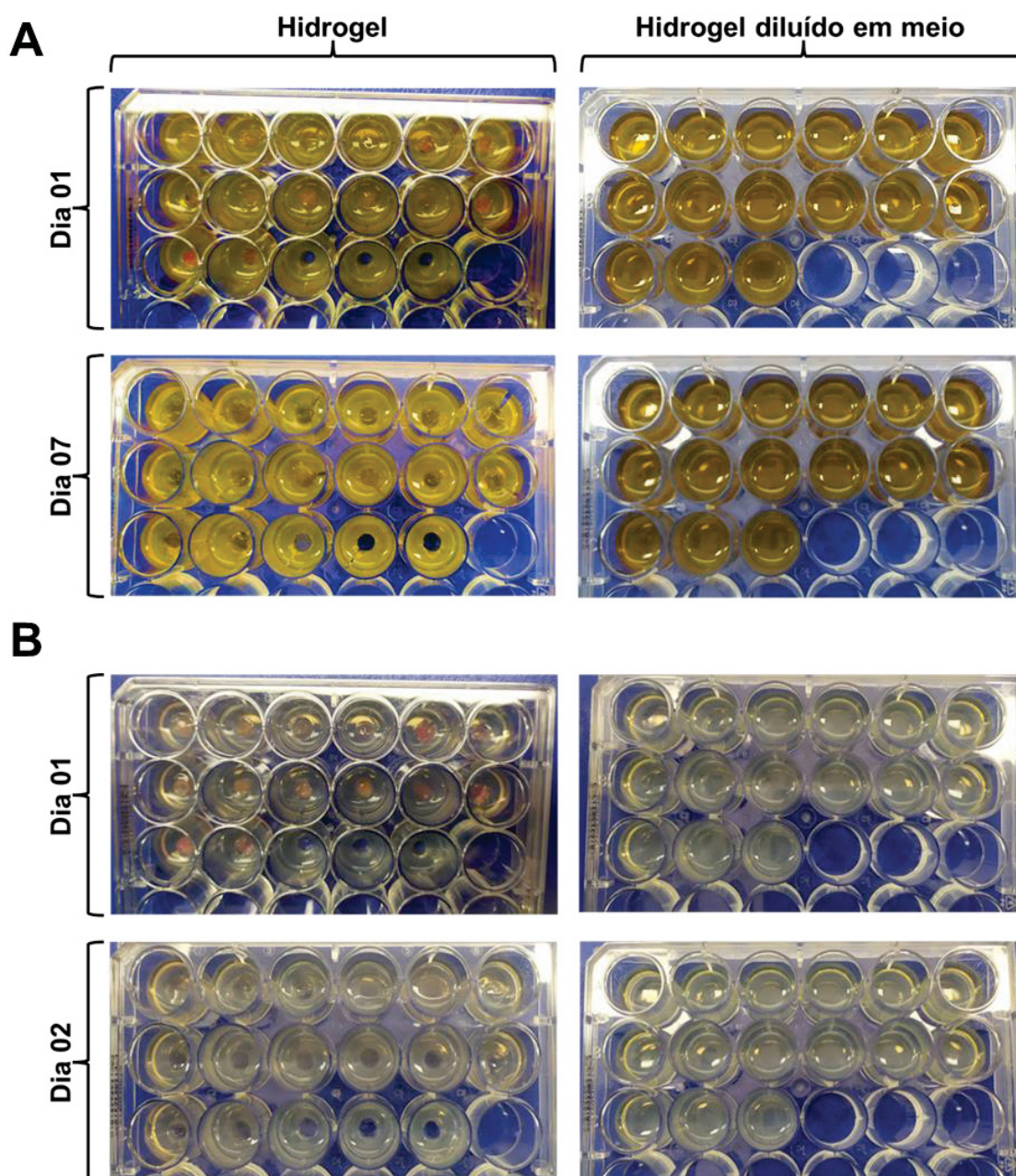


Figura III-6. Ensaio de eficácia de conservação o preparo dos hidrogéis. A) Hidrogéis colocados em meio de cultivo Sabouraud e avaliados durante o período de 7 dias para averiguar o crescimento preferencial de fungos e leveduras. B) Hidrogéis colocados em meio Mueller-Hinton e avaliados durante o período de 2 dias para averiguar o crescimento preferencial de bactérias. Não houve formação de indicadores de crescimento (ex: colônias) característicos de microrganismos.

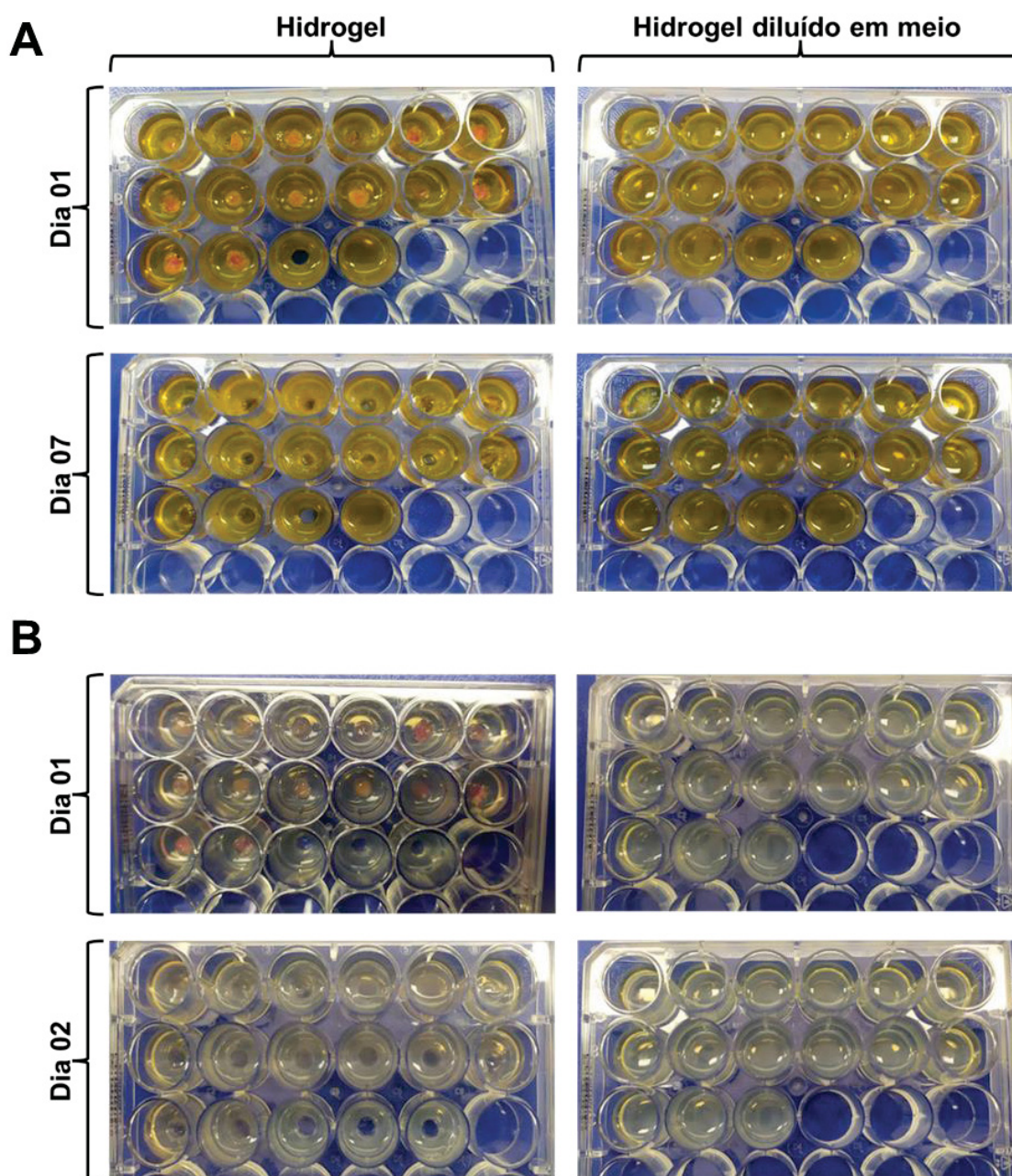


Figura III-7. Ensaio de eficácia de conservação após a simulação de transporte. A) Hidrogéis colocados em meio de cultivo Sabouraud e avaliados durante o período de 7 dias para averiguar o crescimento preferencial de fungos e leveduras. B) Hidrogéis colocados em meio Mueller-Hinton e avaliados durante o período de 2 dias para averiguar o crescimento preferencial de bactérias. Não houve formação de indicadores de crescimento (ex: colônias) característicos de microrganismos.

3.2 ANÁLISE DAS SECÇÕES OBTIDAS DE CADA FILAMENTO POR MICROSCOPIA DE LUZ

Durante o processamento para a obtenção das secções histológicas, percebeu-se alguns desafios com o equipamento Vibratome nos materiais

emblocados. Entretanto, os cortes se mantiveram homogêneos e mostrando diversas áreas de partes longitudinais e transversais. As imagens representativas mostradas a seguir (Figuras III-8 a III-14) são referentes aos resultados das colorações com hematoxilina e eosina das amostras dos filamentos estirados e não-estirados. Inicialmente, foi notável perceber que a variação na proporção dos biopolímeros que compõem diferentes hidrogéis influenciaram na coloração de cada material. Os corantes utilizados possuem cargas distintas, sendo que a hematoxilina é carregada positivamente, corando alginato (BARCELÓ et al., 2022; JIN HO LEE et al., 1997) e a eosina é carregada negativamente, corando principalmente proteínas como a gelatina (WANG et al., 2018). Infere-se que isso seja o fator responsável pela variação de coloração das imagens conforme obtidas.

Comparando as imagens é possível observar a presença de algumas estruturas que se repetem em todas as amostras. Por exemplo, há a presença de vários poros com diferentes tamanhos, visualizados principalmente na objetiva de 10×. Além destes, pode-se observar a malha biopolimérica que fica diferente quando comparamos os filamentos estirados com os não-estirados. Para esses tipos de biomateriais, principalmente à base de alginato, a presença de poros é bastante comum como foi observado por Carvalho, B. S. (2019), mas também associados a outros polímeros como gelatina (SERAFIN et al., 2023; VINCENT, 2022), PEG ((MARY; SWAMIAPPAN, 2016) e quitosana (LI et al., 2021). A estrutura de malha observada fornece um ambiente possivelmente biocompatível principalmente para crescimento e proliferação celular. Ademais, a combinação com gelatina pode modular as propriedades do hidrogel como resistência mecânica e taxas de degradação (WANG et al., 2021). Outro fator que pode estar contribuindo diretamente no comportamento dessas malhas é a concentração do agente reticulante utilizado em cada combinação. Portanto, valores mais altos de íons cálcio podem produzir efeitos distintos na rede de hidrogel resultante como previamente mostrado por outros autores (GIZ et al., 2020). Essas concentrações elevadas de íons cálcio podem acelerar a reticulação, afetando o tempo de manipulação e potencialmente alterando as propriedades mecânicas de maneira intrínseca (EBIHARA; ACHARYA; TONG, 2022). No entanto, esta rede mais densa também pode levar a uma capacidade de expansão reduzida e características de difusão alteradas como já ocorreu em outros estudos (NORAHAN et al., 2023).

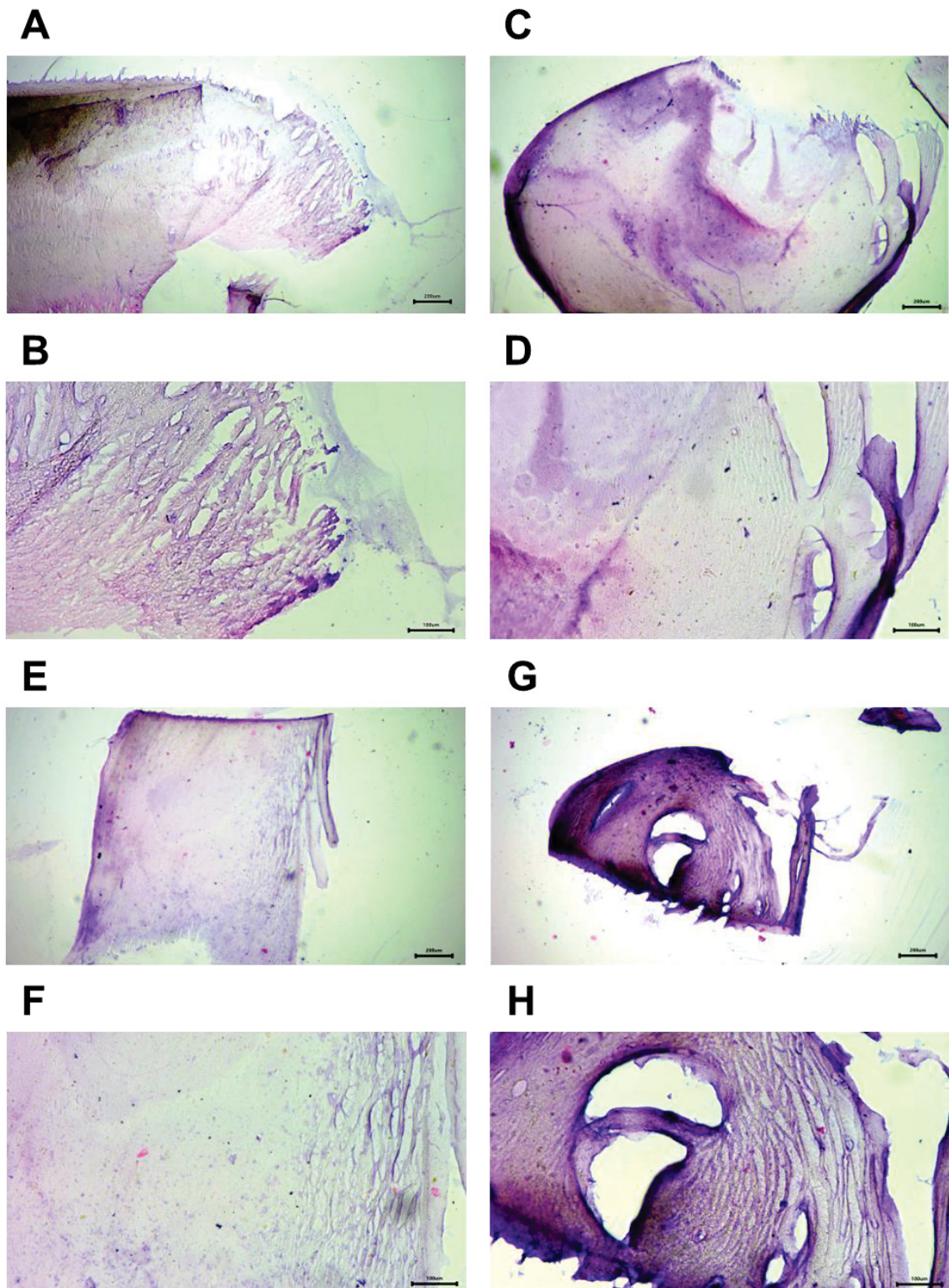


Figura III-8. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-6. A e B) Cortes longitudinais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×); C e D) Cortes transversais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×). E e F) Cortes longitudinais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×); G e H) Cortes transversais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×). Traço no canto inferior direito para A/C/E/F = 200 µm. Traço no canto inferior direito para B/D/F/G = 100 µm.

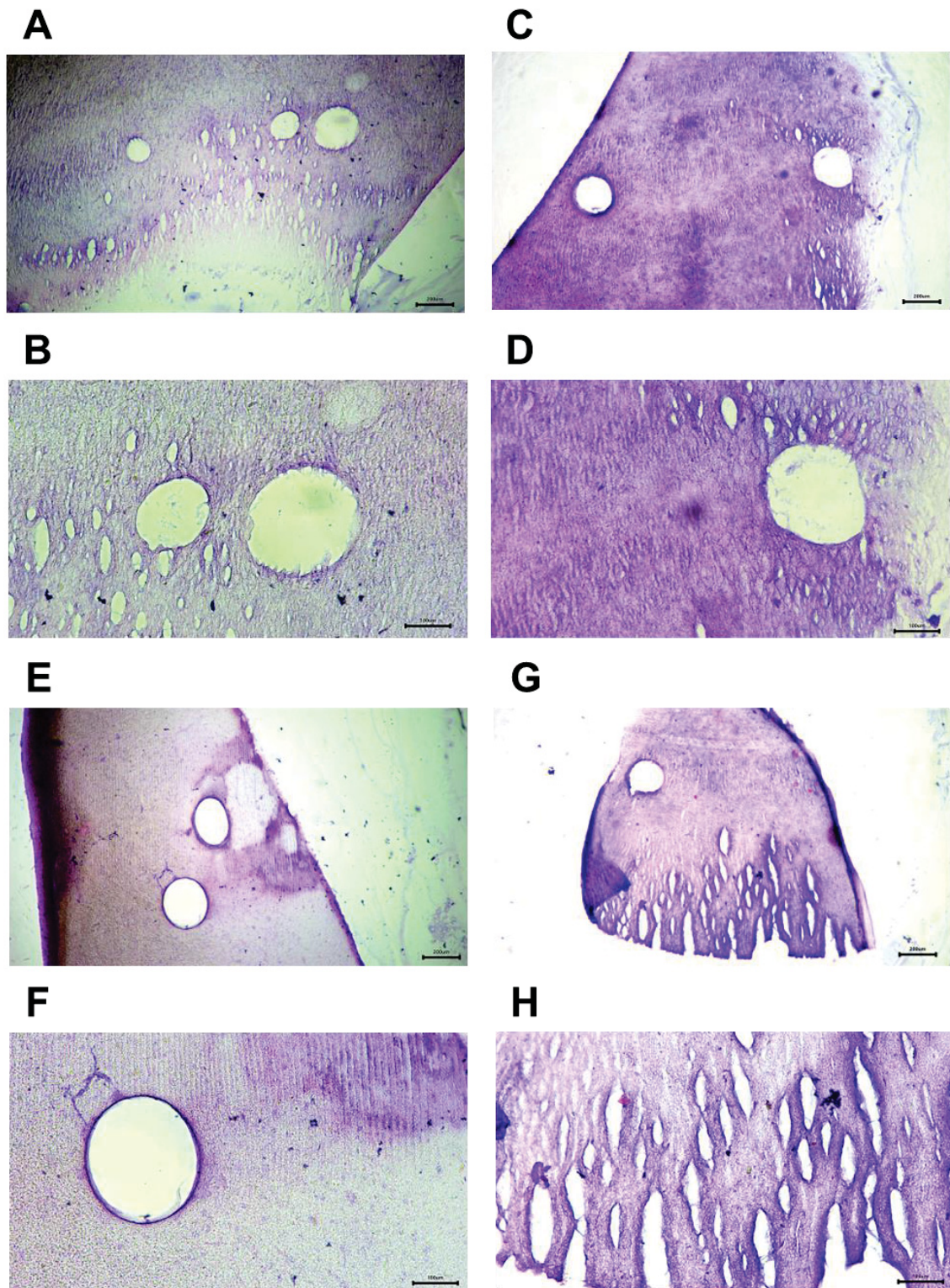


Figura III-9. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-8. A e B) Cortes longitudinais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×); C e D) Cortes transversais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×). E e F) Cortes longitudinais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×); G e H) Cortes transversais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×). Traço no canto inferior direito para A/C/E/F = 200 μm. Traço no canto inferior direito para B/D/F/G = 100 μm.

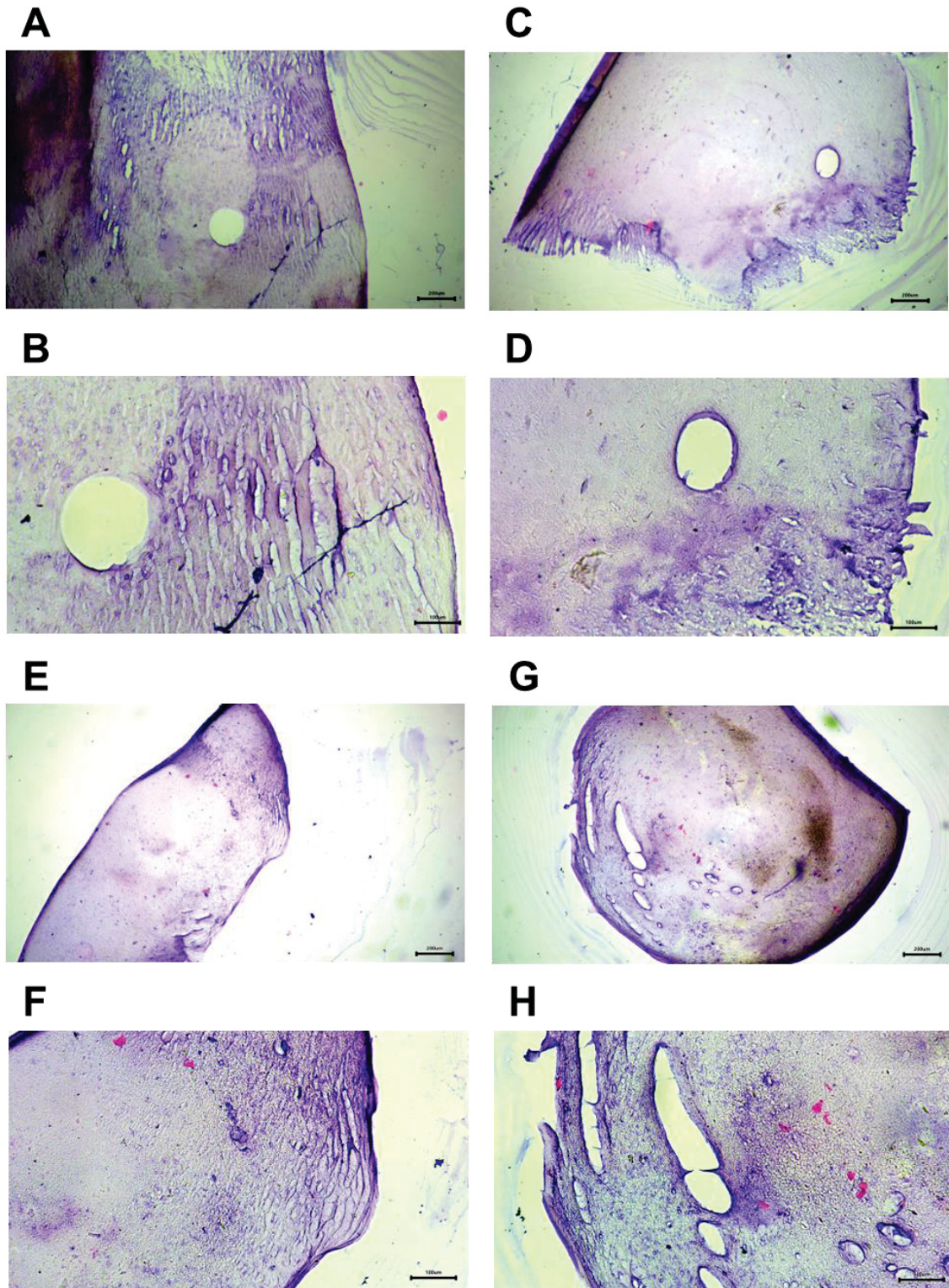


Figura III-10. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-10. A e B) Cortes longitudinais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×); C e D) Cortes transversais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×). E e F) Cortes longitudinais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×); G e H) Cortes transversais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×). Traço no canto inferior direito para A/C/E/F = 200 µm. Traço no canto inferior direito para B/D/F/G = 100 µm.

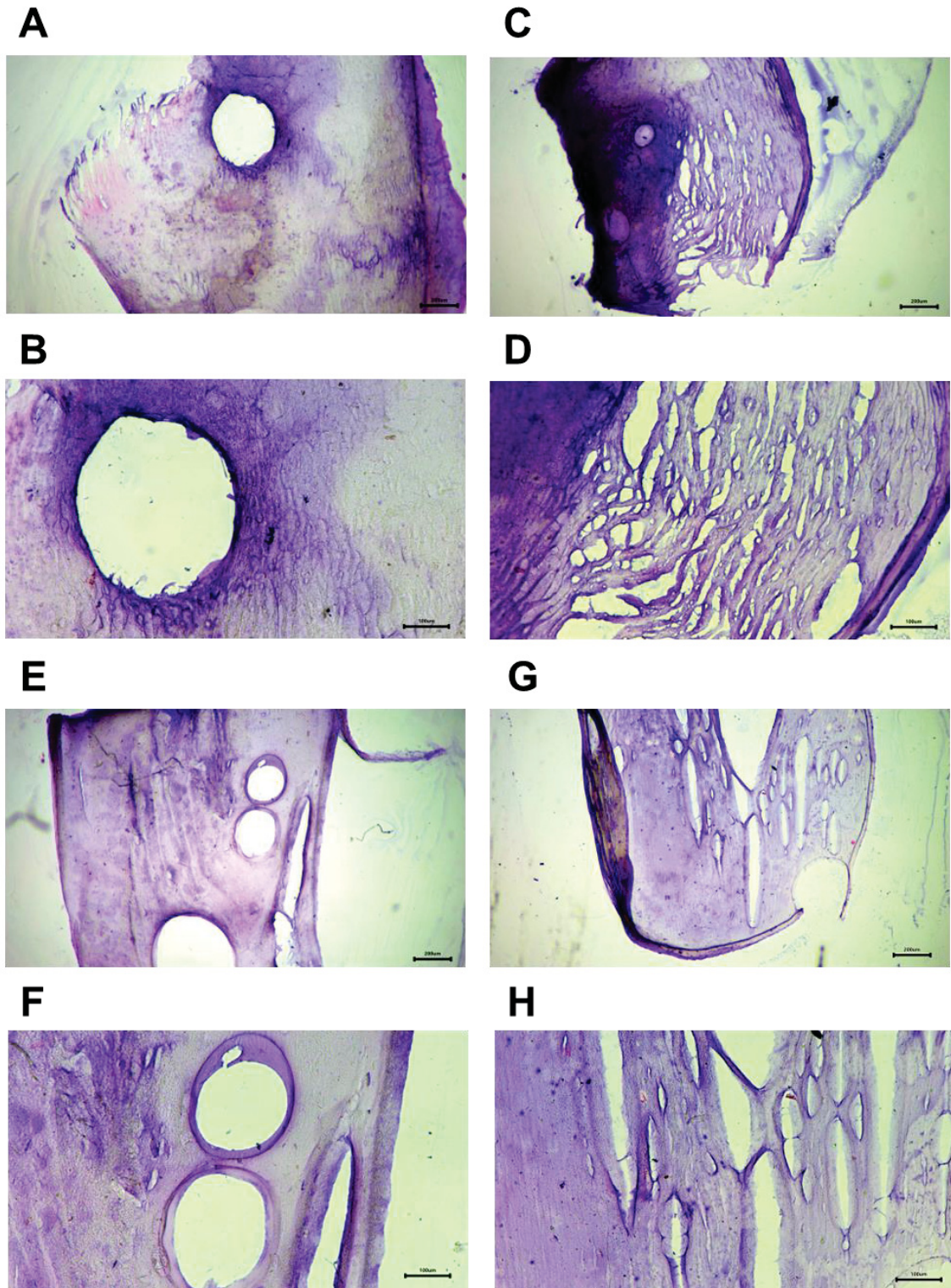


Figura III-11. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-11. A e B) Cortes longitudinais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×); C e D) Cortes transversais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×). E e F) Cortes longitudinais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×); G e H) Cortes transversais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×). Traço no canto inferior direito para A/C/E/F = 200 μm. Traço no canto inferior direito para B/D/F/G = 100 μm.

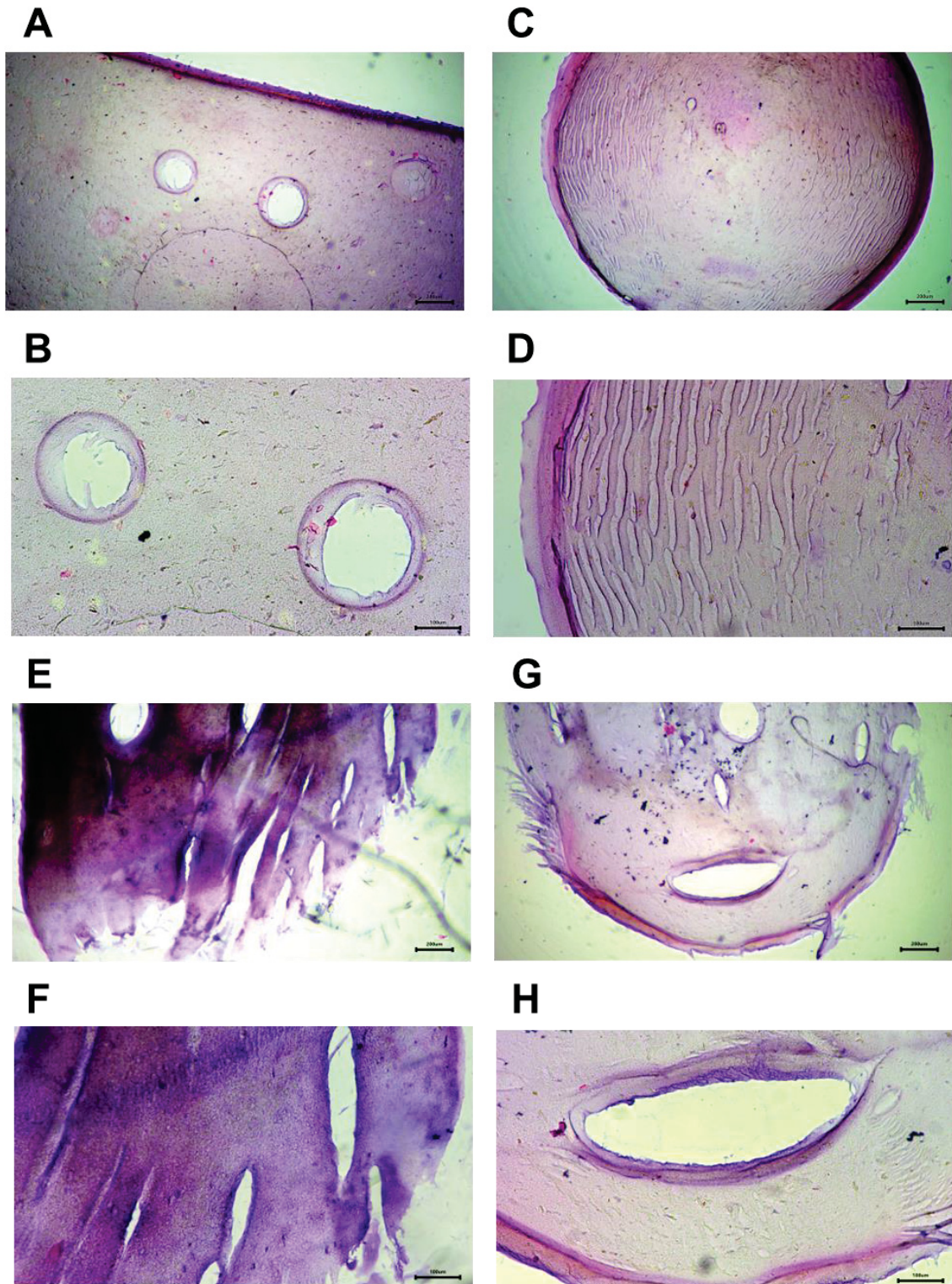


Figura III-12: Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-12. A e B) Cortes longitudinais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×); C e D) Cortes transversais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×). E e F) Cortes longitudinais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×); G e H) Cortes transversais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×). Traço no canto inferior direito para A/C/E/F = 200 μm. Traço no canto inferior direito para B/D/F/G = 100 μm.

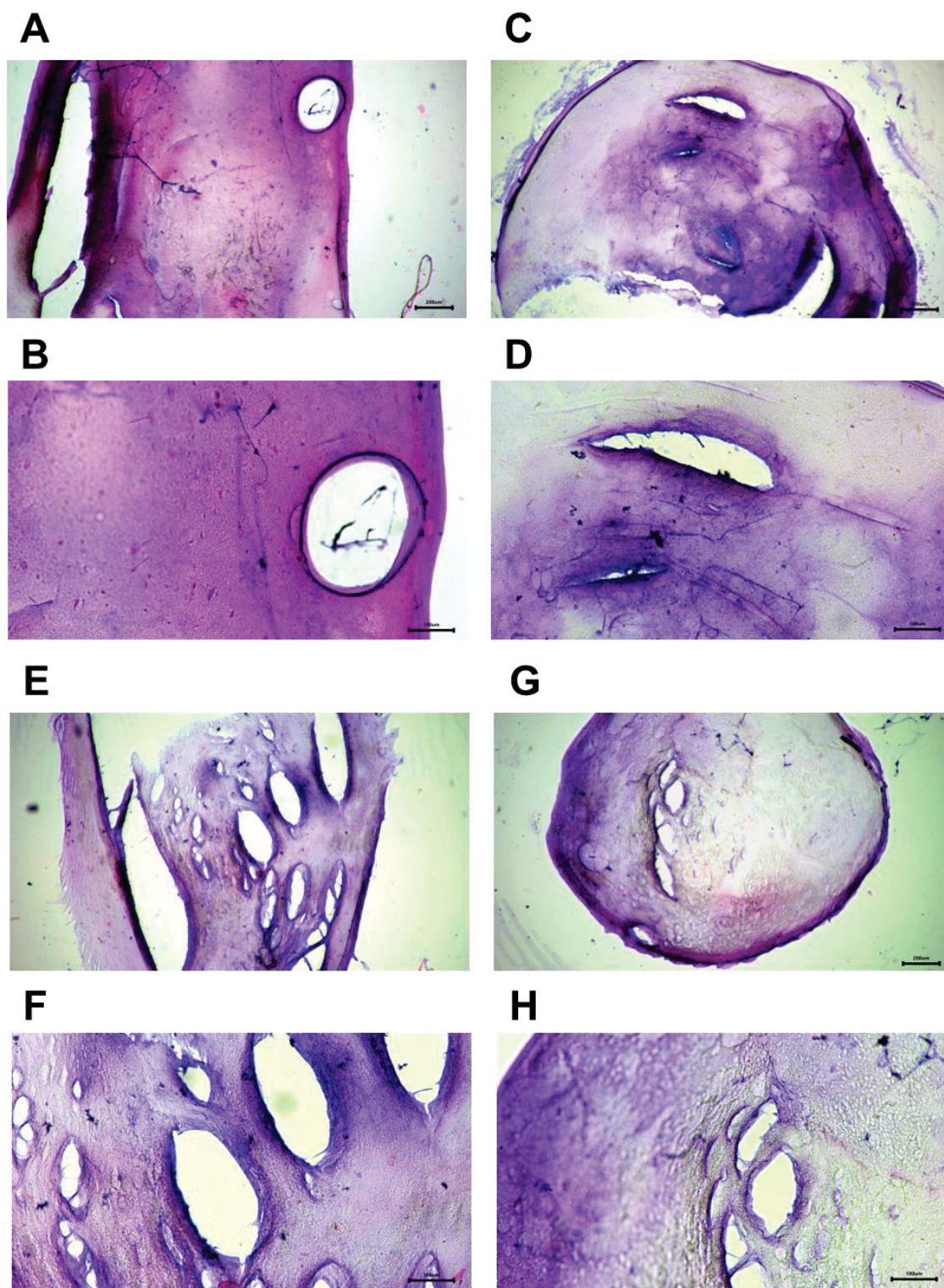


Figura III-13: Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-14. A e B) Cortes longitudinais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×); C e D) Cortes transversais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×). E e F) Cortes longitudinais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×); G e H) Cortes transversais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×). Traço no canto inferior direito para A/C/E/F = 200 µm. Traço no canto inferior direito para B/D/F/G = 100 µm.

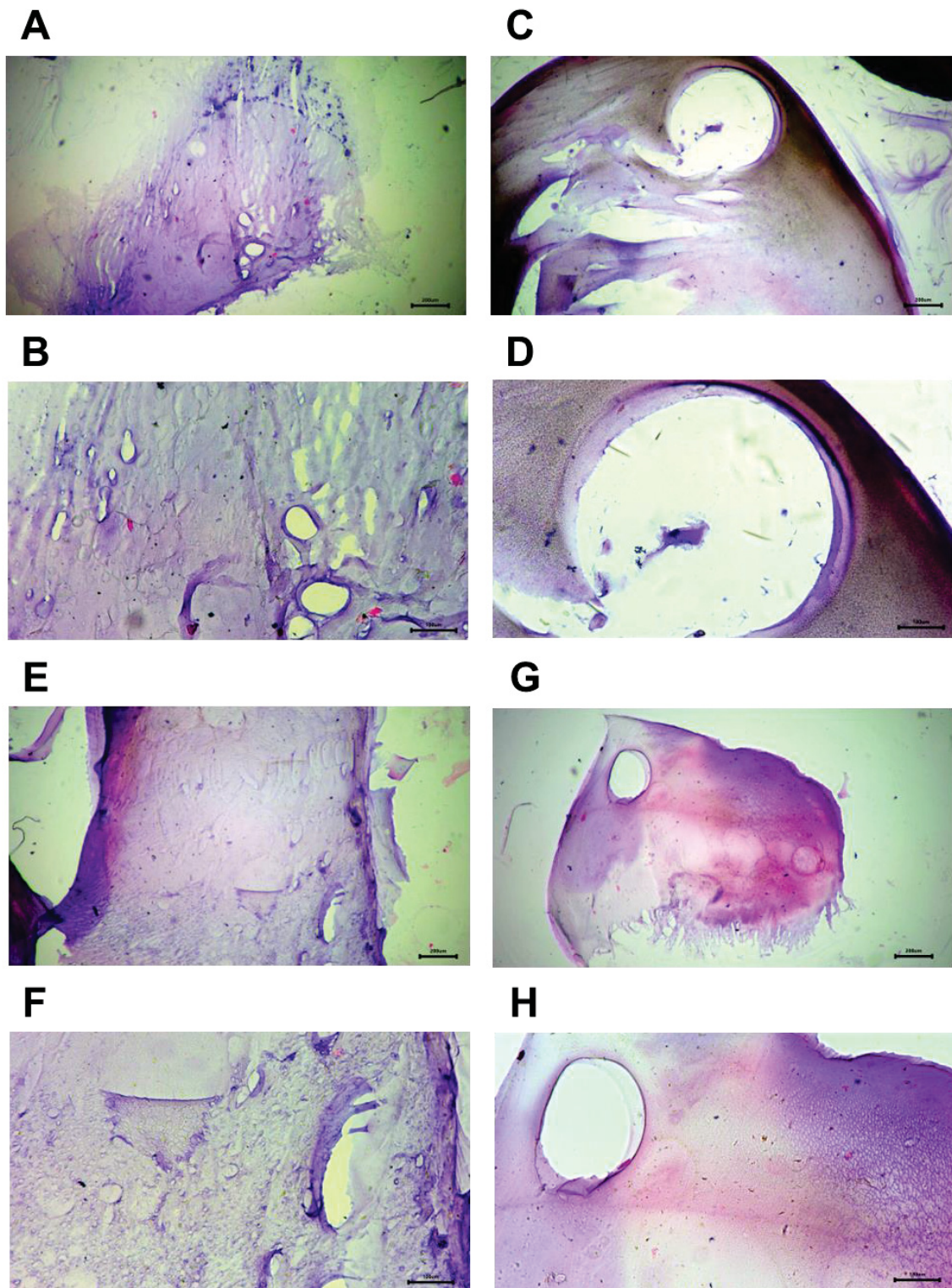


Figura III-14: Imagens obtidas por microscopia de luz de secções histológicas dos filamentos produzidos com a combinação DMEM-15. A e B) Cortes longitudinais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×); C e D) Cortes transversais dos filamentos não-estirados (objetivas de 4× e 10×). E e F) Cortes longitudinais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×); G e H) Cortes transversais dos filamentos estirados (objetivas de 4× e 10×). Traço no canto inferior direito para A/C/E/F = 200 μ m. Traço no canto inferior direito para B/D/F/G = 100 μ m.

Apesar da variação nos tamanhos dos poros e das malhas biopoliméricas existirem de maneiras distintas nas combinações, isso evidencia que estes quando aplicados como biotintas podem atuar distintamente na difusão de nutrientes e gases para as células, quando forem incorporadas.

3.3 ANÁLISE DA RESISTÊNCIA À TRAÇÃO SUPORTADA POR FILAMENTOS PRODUZIDOS COM CÉLULAS OSCC-3 UTILIZANDO AGULHAS COM DIFERENTES CALIBRES

Durante os ensaios para avaliar a tração mecânica suportada por filamentos de hidrogel incorporados com células, especulou-se a possibilidade de fragilização da matriz polimérica pela celularização. A Figura III-15 apresenta os valores coletados após a tensão eletromecânica aplicada a cada filamento durante o teste. Na Figura III-15A são apresentados os valores de força em carga (N), enquanto a Figura III-15B mostra os valores do pico de tensão (Pa) correspondentes à tensão máxima suportada antes da ruptura. A Figura III-15C representa os valores de tensão na ruptura (%), indicando o alongamento do material quando esticado. Além disso, a Figura III-15D exibe os valores de módulo (ksi), representando a tensão ou pressão resultante de uma força de quilolibra por polegada quadrada.

Os filamentos produzidos com agulhas de calibres 14 e 15Ga foram capazes de suportar maior tração, comparado às outras agulhas. Isso era esperado visto que à medida que a resistência mecânica é inversamente proporcional ao diâmetro da agulha, conforme discutido anteriormente. Comparativamente aos dados mecânicos apresentados no capítulo anterior, a incorporação de células diminuiu a carga suportada em todos os filamentos. Segundo a literatura, quando células são incorporadas em hidrogéis, as interações entre elas e a matriz polimérica podem enfraquecer as ligações entre os componentes do hidrogel, resultando em uma estrutura menos coesa (LI et al., 2018). Isso pode reduzir a resistência mecânica do material, tornando os filamentos mais propensos a deformações e rupturas (MARTIN; YOUSSEF, 2018).

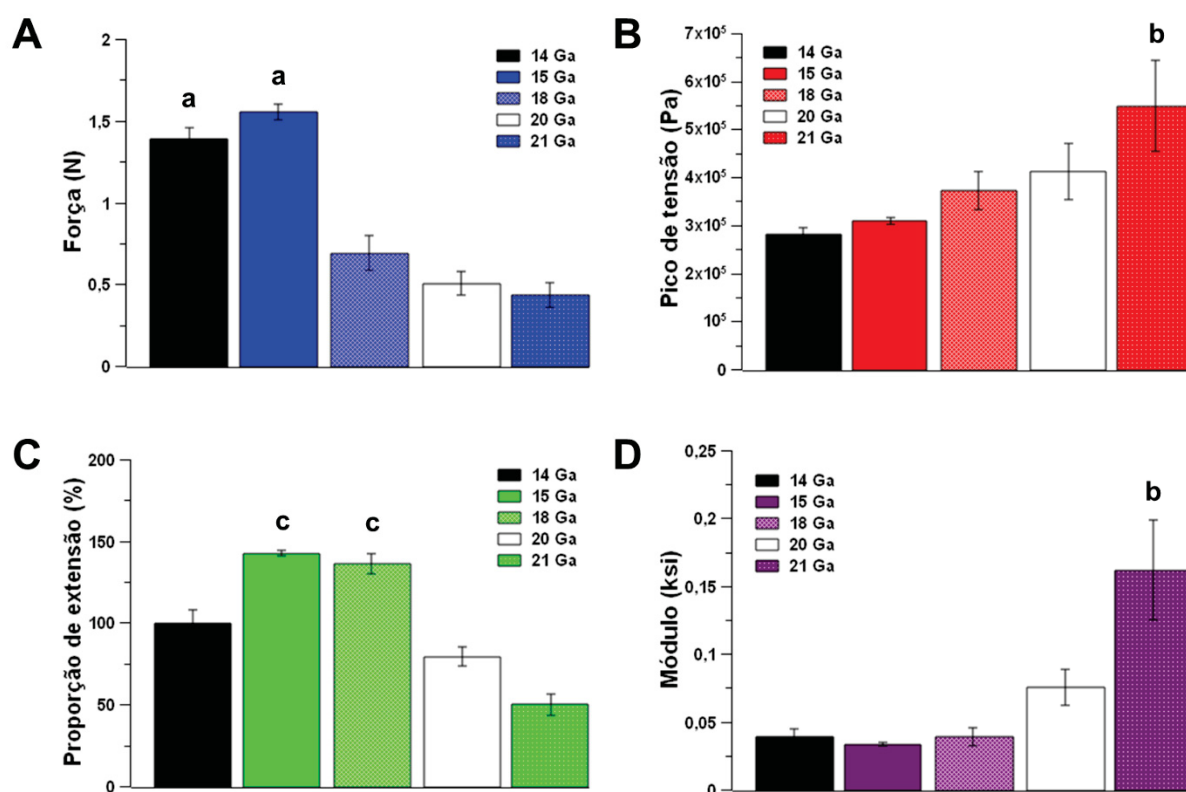


Figura III-15. Avaliação dos filamentos biopoliméricos produzidos com hidrogel DMEM-10 celularizado com OSCC-3. (A) Força máxima; (B) Pico de tensão; (C) Tensão na ruptura; (D) Módulo. Análise estatística ($p < 0,05$): a = diferença estatística para 18Ga, 20Ga e 21Ga; b = diferença estatística para todas as agulhas; c = diferença estatística para 14Ga, 20Ga e 21Ga.

Na Figura III-15B, os valores para o pico de tensão se encontraram de maneira crescente, ou seja, diretamente proporcional ao calibre das agulhas. Comparado ao capítulo anterior, essa propriedade se mantém, porém, com valores mais baixos. Isso pode estar relacionado às mudanças na estrutura interna do hidrogel e à forma como as células estão distribuídas em seu interior. Quando agulhas de maior calibre são utilizadas, isso pode resultar em uma menor compressão e compactação das células no interior do hidrogel, levando a uma menor densidade celular em um espaço maior, e o contrário também é válido, ou seja, agulhas de menores calibres podem gerar uma maior compressão e compactação celular em um espaço menor, influenciando resistência mecânica local do hidrogel (VOLPI et al., 2022).

Com relação à proporção de extensão dos filamentos, houve uma similaridade dos resultados aqui obtidos comparados àqueles do capítulo anterior. Ademais, os filamentos confeccionados utilizando as duas agulhas de menor calibre, não se expandiram tanto quanto os outros no mesmo experimento. Já na Figura III-15D, os dados do módulo de elasticidade mostraram tendências similares quando comparados

ao pico de tensão, indicando novamente que os filamentos produzidos com uma agulha de calibre 21Ga exibem menor rigidez em comparação aos outros, e isso influencia seu alongamento durante o teste. O módulo, expressa a relação entre a tensão aplicada e a deformação resultante dentro da região elástica do material. Para tal, quanto maior o valor de módulo em ksi, mais rígido e resistente à deformação elástica é o biomaterial, o que indica a sua capacidade de retornar à forma original após a aplicação de forças (CHEN et al., 2021).

A Figura III-16 apresenta as curvas de deformação obtidas após o processo de estiramento dos filamentos celularizados até o momento de suas rupturas. Nelas é possível observar que filamentos produzidos utilizando as agulhas de maior calibre (14 e 15Ga) suportaram uma maior tração (resultados de força), corroborando com os dados da Figura III-15. Aqueles filamentos produzidos com agulhas de menor diâmetro apresentaram deformações consideráveis, comparados aos de melhores desempenhos mecânicos.

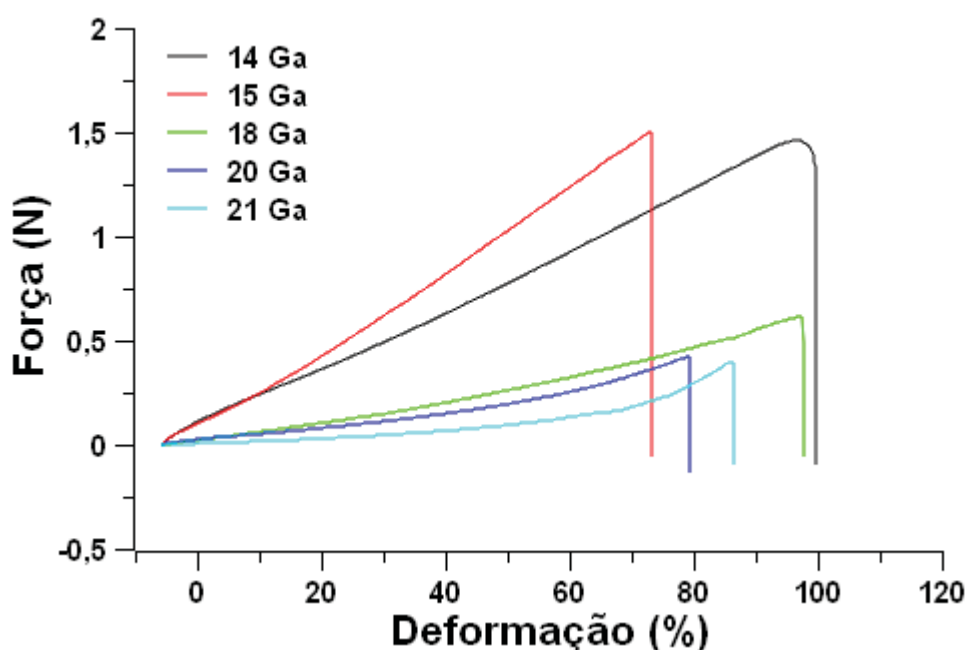


Figura III-16. Curvas de deformação dos filamentos de hidrogel DMEM-10 celularizados com OSCC-3, até o rompimento provocado em extensora eletromecânica. A deformação dos filamentos ocorre devido à aplicação de uma tensão vertical sobre cada amostra, resultando na força máxima suportada por cada uma até seu rompimento, resultando na queda abrupta nas curvas do gráfico.

Assim, observou-se que a celularização dos hidrogéis interfere apenas parcialmente nas propriedades de resistência à tração eletromecânica de cada filamento estirado, tornando-se um biomaterial promissor como biotinta aplicável à engenharia de tecidos e a bioeletrônica. Essas estruturas podem ser incorporadas em dispositivos biomédicos e biossensores, onde a capacidade de resistir a forças mecânicas é crucial para a funcionalidade a longo prazo. Além disso, essas biotintas também têm potencial em áreas como a medicina regenerativa, permitindo a criação de implantes personalizados que possam se integrar de forma eficaz com os tecidos do corpo, resistindo ao estresse mecânico.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA TOPOGRAFIA E PROPRIEDADES DE RUGOSIDADE DOS HIDROGÉIS CELULARIZADOS POR MFA

O hidrogel DMEM-10 celularizado foi caracterizado topograficamente e avaliado quanto às suas propriedades de rugosidade por microscopia de força atômica. A Figura III-17 apresenta as imagens em 2D (III-17A) e 3D (III-17B) obtidas, ilustrando as variações na topografia da amostra. O hidrogel exibiu altura máxima acima de 400 nm, apresentando semelhança com o hidrogel sem celularização e caracterizado no Capítulo I. Na Fig. III-17C apresenta-se a caracterização quantitativa dos parâmetros de rugosidade de superfície do hidrogel. Ra e Rq indicam que existe uma regularidade da altura na amostra em nanoescala (lisa), justamente por apresentar valores mais baixos do que 50 nm. Rz revelou que a altura máxima em média é de 500 nm. Por outro lado, os parâmetros Rzjis e Rp apresentaram comportamento semelhante, exibindo os valores em média próximos a 300 nm. Por último, o parâmetro Rv demonstrou que o hidrogel possui profundidade média equivalente a 200 nm. Em suma, comparando os dados obtidos com a seção 3.2 do Capítulo I, a celularização do hidrogel não variou expressivamente as propriedades topográficas e de nanorrugosidade de superfície.

Essencialmente, as células frequentemente não alteram significativamente as propriedades da superfície de hidrogéis devido à sua dimensão microscópica em comparação com a escala macroscópica do hidrogel. As propriedades da superfície, como rugosidade e textura, são determinadas principalmente pela estrutura molecular e pela organização do material do hidrogel em si, enquanto as células ocupam apenas uma pequena fração da superfície total (JOSHI; HOMBURG; EHRMANN, 2022). Além

disso, a estrutura intrínseca das células não costuma afetar diretamente as propriedades superficiais do hidrogel (WHITEHEAD; KIRKLAND; ENGLER, 2021). A rugosidade, por sua vez, geralmente se forma em escalas muito menores do que as células individuais, portanto, as características microscópicas das células tendem a não interferir nas propriedades de rugosidade. No entanto, é importante considerar a interação entre as células e o hidrogel, uma vez que as propriedades mecânicas e biológicas do hidrogel podem afetar a adesão e o comportamento das células sobre a superfície (LE et al., 2016).

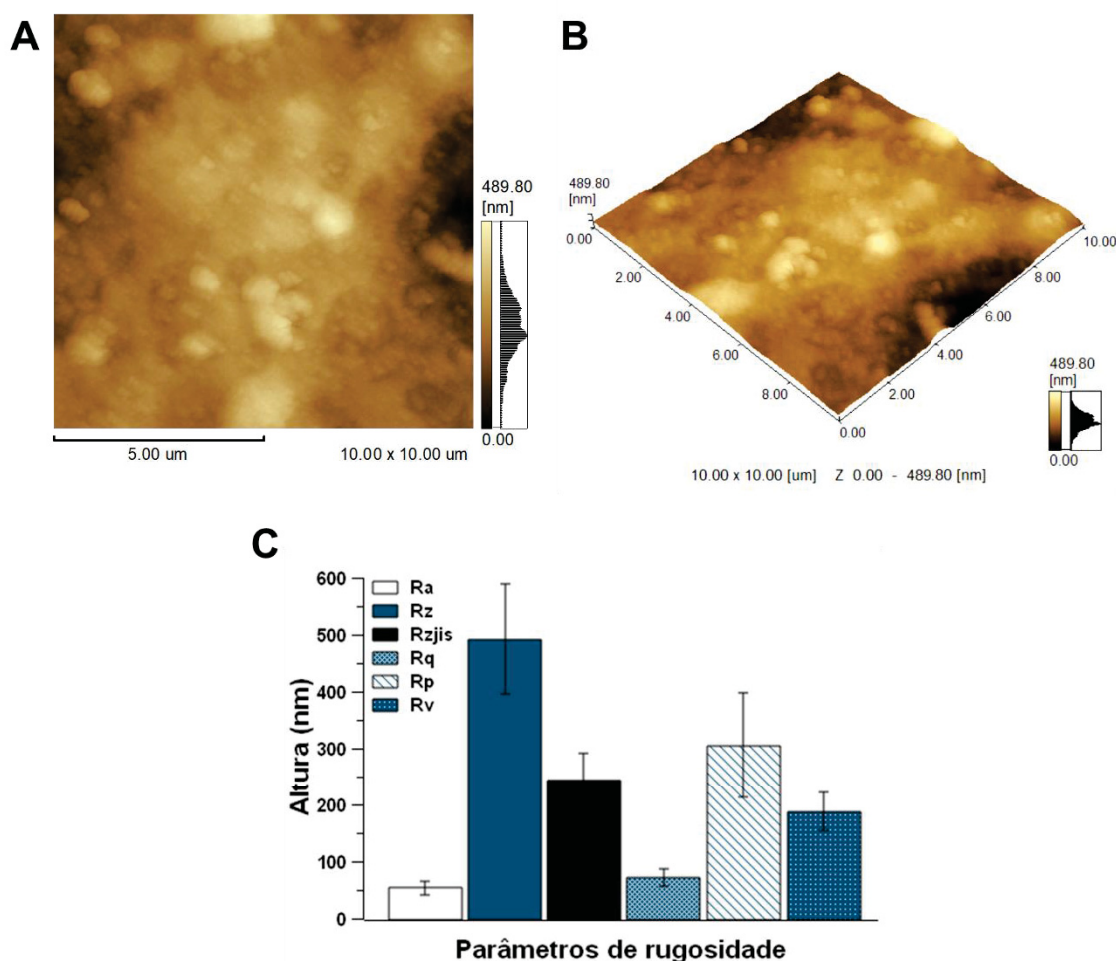


Figura III-17. Análise topográfica obtida por MFA e parâmetros de nanorugosidade de superfície do hidrogel DMEM-10 contendo células OSCC-3. A-B) Topografia de superfícies 2D e 3D. C) Parâmetros de nanorugosidade do hidrogel obtidos utilizando MFA em modo dinâmico. Os parâmetros incluem a rugosidade média aritmética (Ra), altura máxima (Rz), altura de dez pontos do perfil de rugosidade (Rzjis), rugosidade quadrática média (Rq), altura máxima do pico do perfil (Rp) e profundidade máxima do vale do perfil (Rv).

A celularização não afetou intrinsecamente os valores dos parâmetros obtidos sobre a topografia da superfície do hidrogel, assim como para os valores de rugosidade, comparados aos observados anteriormente. Isso demonstra que há uma estabilidade estrutural e a possibilidade de criar ambientes biomiméticos propícios para interações celulares controladas.

3.5 ANÁLISE DAS CURVAS DE FORÇA-DISTÂNCIA E PROPRIEDADES MICRO- E NANOMECÂNICAS DE HIDROGEL CELULARIZADO

Ao investigar as propriedades micro- e nanomecânicas do hidrogel DMEM-10 celularizado foram obtidos os dados apresentados na Figura III-18 a partir da análise das curvas de força-distância. A Figura III-18A mostra a força máxima de tração, indicando o valor com média de aproximadamente 95,23 nN. A Figura III-18B apresenta o toque de encaixe, com valor em média de 0,60 nN. A Figura III-18C mostra a força de separação da ponteira com a amostra, com valor em média de 9,47 nN. A Figura III-18D representa a separação do desprendimento mostrando valor médio em 26,43 10 nN. A Figura III-18E apresenta o módulo de Young, indicando valor médio de $1,24 \times 10^9$ Pa. Por fim, a Figura III-18F mostra a energia dissipada, em que exibiu o valor médio de $3,10 \times 10^{-15}$ J.

Aqui, a investigação mostrou que de forma comparativa ao exposto na seção 3.3 do Capítulo I, que a celularização do hidrogel modulou algumas propriedades mecânicas. Os valores de encaixe e separação da ponteira com a amostra, o módulo de Young e a energia dissipada foram as mais diferenciadas, sendo todos os valores maiores quando comparados aos do hidrogel descelularizado. A adição de células em hidrogéis tende a modular algumas propriedades mecânicas, e os valores de indentação de aproximação e separação podem ter sido afetados devido à interação mecânica entre as células e o hidrogel, alterando a resistência e a elasticidade do sistema, refletindo-se nos padrões de deformação observados durante o teste. A modulação do módulo de Young ocorreu devido à influência das propriedades mecânicas das células e suas interações com o hidrogel, como demonstrado por Bachmann et al., (2020). Adicionalmente, as diferenças no valores da energia dissipada também podem ser respondidas pela interação das células e o hidrogel, resultando em diferentes padrões de absorção e dissipação de energia durante as medições de indentação (CHEN et al., 2023).

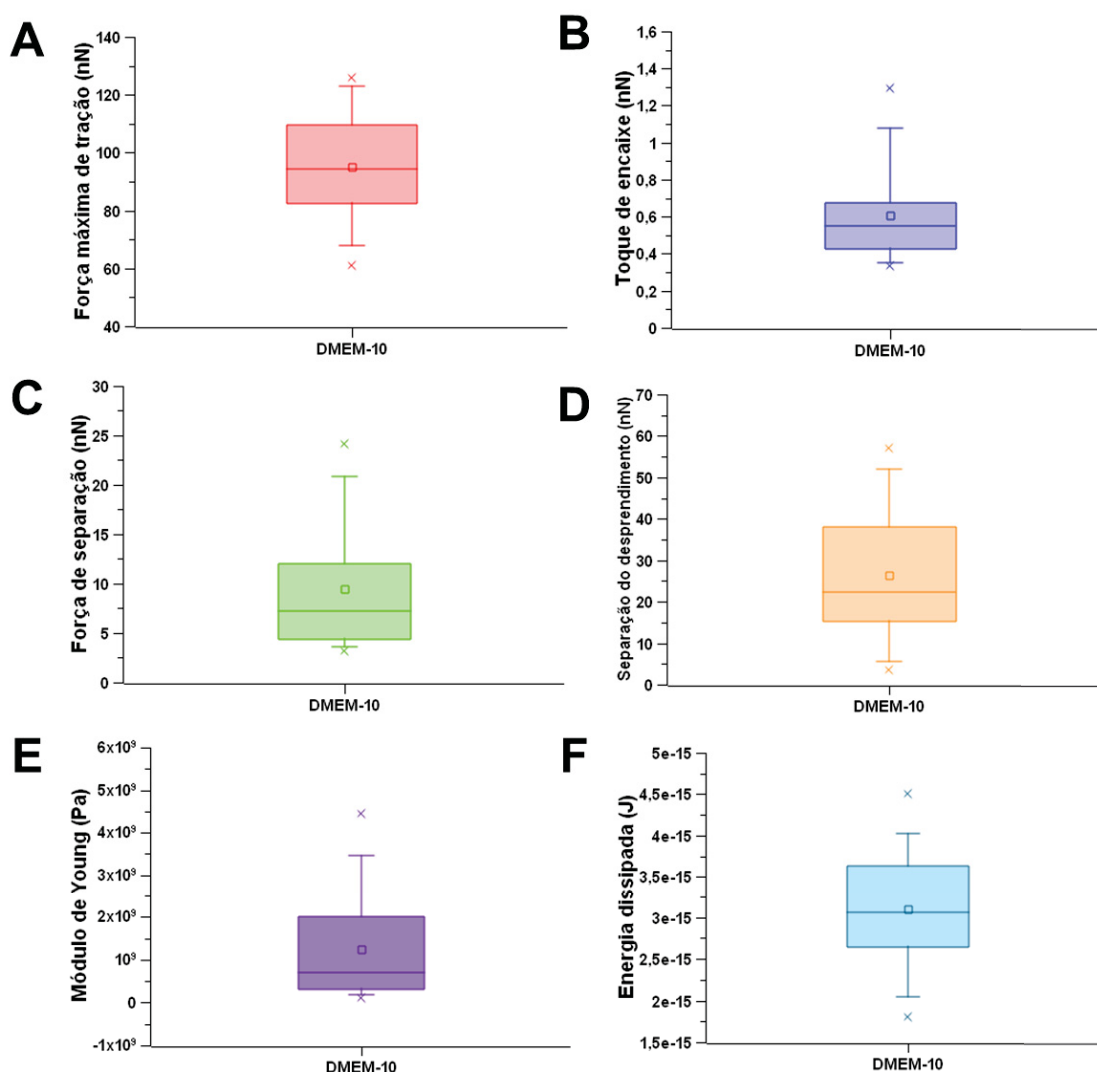


Figura III-18. Análise de medições de força refletindo propriedades mecânicas do hidrogel DMEM-10 celularizado usando nanoindentação. (A) Força de tração máxima, (B) Força de encaixe, (C) Força de desprendimento, (D) Separação de desprendimento, (E) Módulo de Young e (F) Energia dissipada.

Assim como explicado no Capítulo I, há um número limitado de testes de curvas de força-distância e resistência de hidrogéis na literatura para fins de comparação com o trabalho desenvolvido. No entanto, a presente investigação revelou que a superfície do hidrogel celularizado apresentou propriedades estruturais semelhantes ao hidrogel sem células, incluindo rigidez variável, adesão, elasticidade e dissipação de energia. Essas características foram determinadas por meio de medidas de curvas de força-distância ajustadas com a equação de Hertz, principalmente para avaliar o módulo de elasticidade de cada material, estratégia já utilizada anteriormente por outros autores e em outros tipos de materiais (BARBOSA; SILVA, 2013). O presente estudo se focou em medir o comportamento da rigidez

superficial das amostras, calculando a força de carga máxima aplicada durante a etapa de indentação em uma avaliação da curva de força-distância.

A análise da curva de força-distância, mostrada na Figura III-19, forneceu informações sobre as propriedades mecânicas do hidrogel analisado. Ao comparar com o discutido no Capítulo I, a celularização proporcionou um aumento das forças atrativas e repulsivas entre a ponteira e a superfície, modulando os valores sobre a adesão e as propriedades elásticas da amostra. Tanto a curva de aproximação, quanto a de separação se encontraram mais distantes, isso mostra influência das células para com o hidrogel.

Como indicado, a incorporação de células em hidrogéis de alginato e gelatina pode ter impactos nas curvas de força-distância adquiridas por MFA devido às complexas interações entre as células, o hidrogel e a ponteira (sonda). As células podem influenciar as propriedades mecânicas locais do hidrogel, alterando as respostas de deformação, adesão e elasticidade durante a aproximação da ponteira, resultando em padrões distintos nas curvas de força de aproximação quando comparada a hidrogel sem células (NORMAN et al., 2021). Durante a retração da ponteira, as células podem desempenhar um papel na energia dissipada, influenciando a separação e possivelmente revelando propriedades de aderência celular (ZEMŁA et al., 2020). Assim, a natureza das células, sua adesão à matriz de hidrogel e suas características mecânicas relacionam-se de maneira complexa para moldar as curvas de força-distância obtidas, fornecendo informações valiosas sobre as interações célula-biomaterial e as propriedades mecânicas globais.

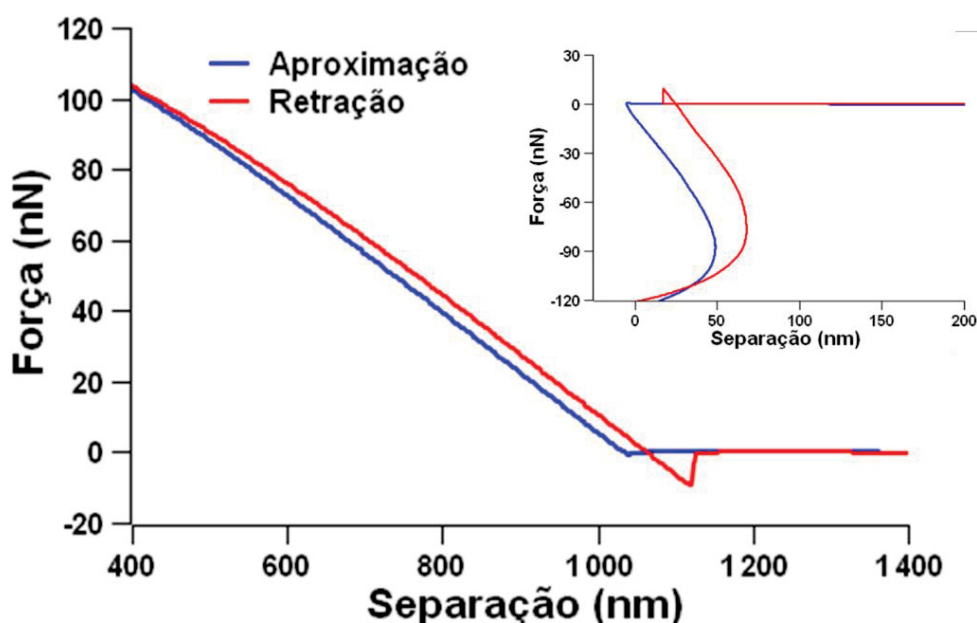


Figura III-19. Curvas de força-distância (aproximação e retração) e saltos de força (inserção) para o hidrogel DMEM-10 celularizado com OSCC-3.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DE MICROESTRUTURAS DOS FILAMENTOS COM E SEM CÉLULAS OSCC-3 POR MEV

Após todos os experimentos realizados para avaliar as propriedades micro- e nanomecânicas, os filamentos produzidos com hidrogel DMEM-10 contendo ou não células OSCC-3 foram caracterizados por MEV. A variação da altura na superfície é refletida no contraste das imagens, em que os pontos mais altos são mais claros pontos mais escuros são mais baixos. Na Figura III-20 são mostradas imagens dos filamentos não-estirados. Nela é observada uma suavidade da superfície, principalmente no corte longitudinal e na superfície externa. Ao mesmo tempo é possível ver que esse biomaterial produzido possui diversos poros internos e externos. Assim como na microscopia de luz, nas bordas próximas à extremidade pode ser observada uma delimitação que separa a parte externa da parte interna do filamento.

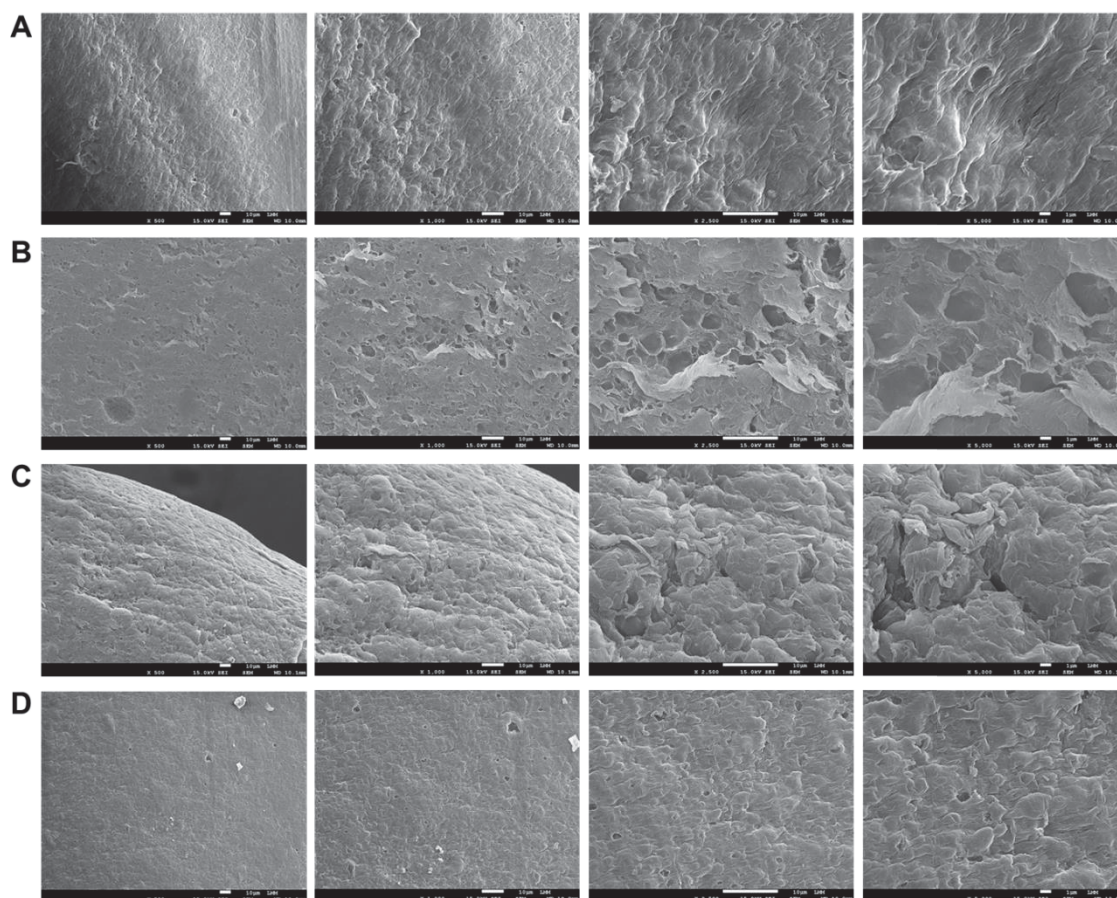


Figura III-20. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filamentos não estirados produzidos a partir do hidrogel DMEM-10. A) Corte longitudinal; B) Corte transversal; C) Extremidade do corte transversal; D) Superfície externa. As magnificações (da esquerda para direita) são de 500×, 1000×, 2500× e 5000×.

A Figura III-21 mostra as imagens dos filamentos estirados. Pode-se distinguir nitidamente que há uma diferença tanto morfológica quanto estrutural do biomaterial analisado comparado ao da Figura III-20. Neste biomaterial estirado é observado que as tramas biopoliméricas internas e externas estão esticadas, como mostrado nos cortes longitudinais, transversais e da superfície externa. Os poros também são observados, porém bem menores e quase colapsados. Como característica adicional, observa-se que as tramas estão com aspecto “arrebentado”, o que remete ao estiramento suportado durante a tração eletromecânica.

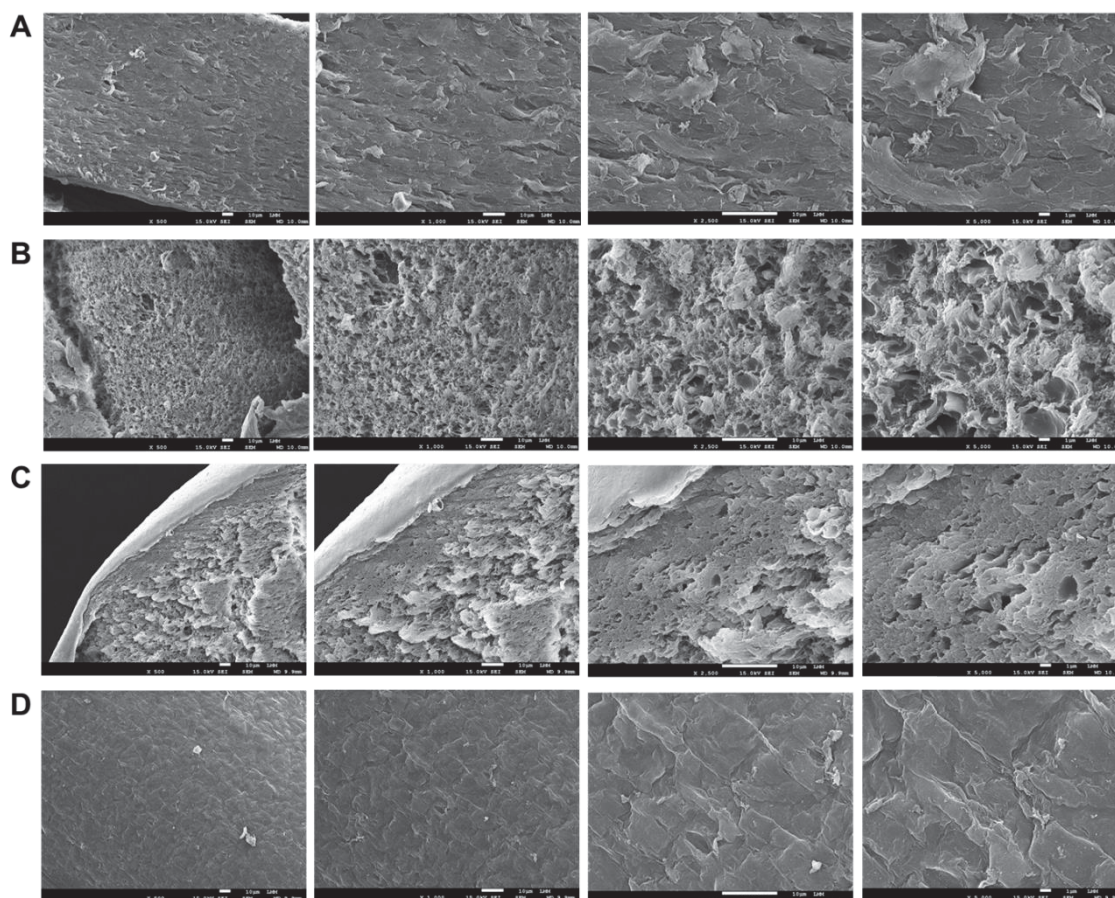


Figura III-21. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filamentos estirados produzidos a partir do hidrogel DMEM-10. A) Corte longitudinal; B) Corte transversal; C) Extremidade do corte transversal; D) Superfície externa. As magnificações (da esquerda para direita) são de 500×, 1000×, 2500× e 5000×.

Na Figura III-22 filamentos não estirados celularizados com OSCC-3 são mostrados. De maneira comparativa ao filamento não estirado e não celularizado apresentados anteriormente. Este biomaterial compartilha das mesmas características dos descritos anteriormente. Entretanto, a presença de células no interior do biomaterial (identificadas pelas setas vermelhas) altera visualmente sua uniformidade, destacando-se também que há um envolvimento e adesão delas sobre o biomaterial.

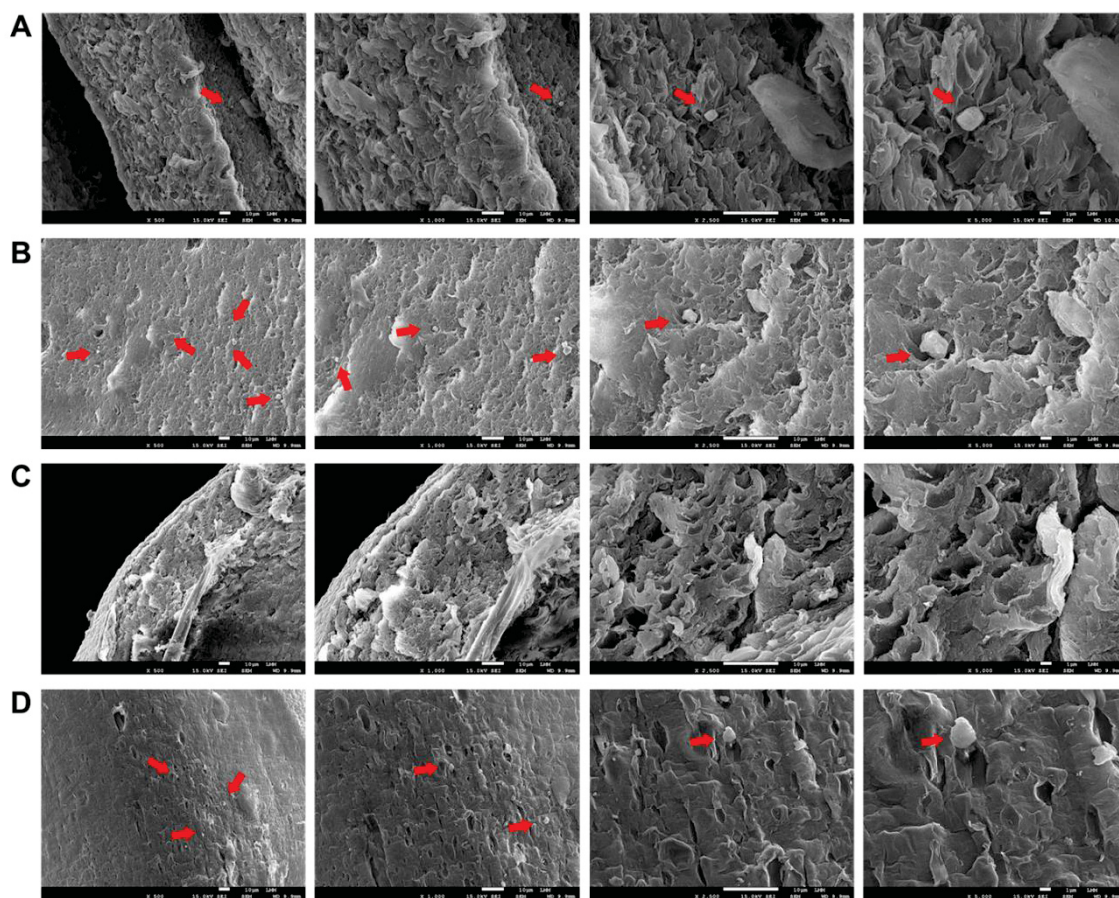


Figura III-22. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filamentos não estirados celularizados produzidos a partir do hidrogel DMEM-10. A) Corte longitudinal; B) Corte transversal; C) Extremidade do corte transversal; D) Superfície externa. As magnificações (da esquerda para direita) são de 500×, 1000×, 2500× e 5000×. Setas vermelhas indicam a localização de células.

Por último, a Figura III-23 mostra as imagens dos filamentos estirados celularizados. Comparativamente ao filamento estirado sem células, as características observadas e relatadas anteriormente de modo geral se mantiveram. Entretanto, foi observado que o filamento ao ser estirado, faz com que a malha biopolimérica comprima as células que são confinadas em um menor espaço, devido ao estiramento ocorrido pela tração eletromecânica.

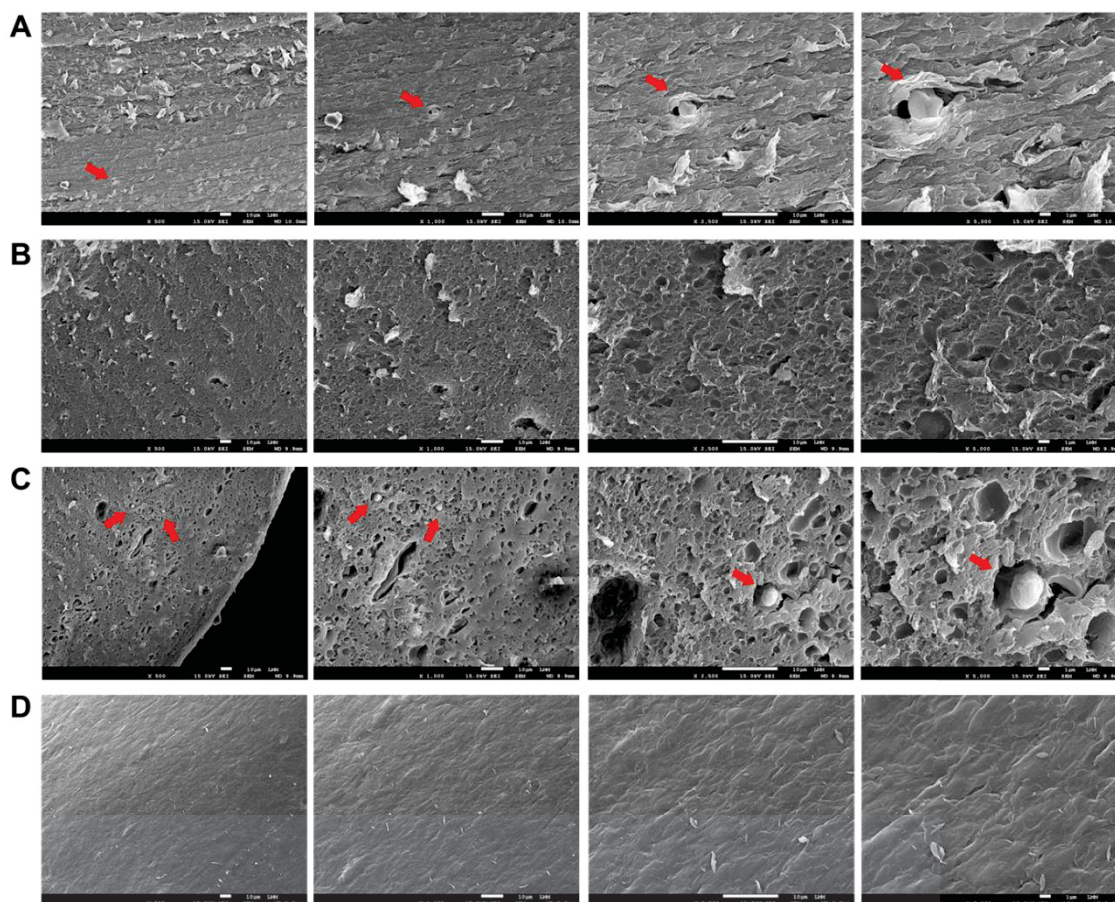


Figura III-23. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filamentos estirados celularizados produzidos a partir do hidrogel DMEM-10. A) Corte longitudinal; B) Corte transversal; C) Extremidade do corte transversal; D) Superfície externa. As magnificações (da esquerda para direita) são de 500×, 1000×, 2500× e 5000×. Setas vermelhas indicam a localização de células.

Como foi demonstrado na seção anterior, as propriedades micro- e nanomecânicas dos hidrogéis foram moduladas após a celularização do material. Visualmente, após as imagens obtidas por MEV, constou-se que a distribuição celular pelo material pode ter influenciado na variação de todas as propriedades analisadas previamente. As imagens obtidas por MEV corroboraram em alta resolução diversas características que haviam sido citadas na microscopia de luz. As estruturas internas e externas dos filamentos não estirados são bem semelhantes àquelas observadas por Carvalho (2019) e Qiuhong et al. (2020). Ademais, os poros que estão presentes e distribuídos em todo o material são característicos de hidrogéis que têm alginato e gelatina em suas composições, reticulados com cloreto de cálcio (ZHANG; CHENG; AO, 2021).

As imagens mostram que a extremidade do corte transversal apresenta uma delimitação específica que separa as partes interna e externa do filamento. Isso pode estar associado durante o processo de reticulação, o qual ocorre pela difusão do agente reticulante sobre o filamento (WANG et al., 2019). Assim, íons Ca^{2+} tendem a se acumular nas proximidades da extremidade (superfície) resultando na “compactação”, e posteriormente permeando ao longo do filamento, gerando os poros internos (ŁABOWSKA et al., 2023). Ao observar que as células incorporadas no hidrogel ficam geralmente próximas de poros, indica-se que este biomaterial é um candidato à biotinta aplicável em engenharia de tecidos, justamente por permitir que haja nutrição e oxigenação, interação, viabilidade, proliferação, migração e diferenciação celular (KIM et al., 2022; XU et al., 2022).

3.7 PREDIÇÃO POR IA APÓS APRENDIZADO COM AS IMAGENS DE SECÇÕES DE FILAMENTOS OBTIDAS POR MICROSCOPIA DE LUZ

Durante o processo de classificação e predição de imagens utilizando a ferramenta *Teachable Machine*, os resultados para o teste de identificação dos filamentos estirados e não estirados foram coletados e adicionados na matriz de confusão programada em Python, mostrada abaixo:

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# Replace these with your actual predicted and true labels
true_labels = ["FE", "FE", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "F",
"FE", "FE", "FE", "FE", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "FE", "FE", "FE", "FE", "F", "F",
"F", "F", "F", "FE", "FE", "FE", "F", "F", "F", "F", "FE", "F", "F", "FE", "FE",
"FE", "F", "F", "FE", "FE", "FE"]
predicted_labels = ["FE", "FE", "F", "F", "F", "FE", "F", "F", "F", "F", "F", "F",
"F", "FE", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "FE", "FE", "FE", "FE", "F", "F", "F",
"F", "F", "FE", "FE", "FE", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "F", "FE", "FE", "FE",
"F", "F", "FE", "FE", "F"]

# Create the confusion matrix
unique_labels = np.unique(true_labels)
num_classes = len(unique_labels)
confusion_matrix = np.zeros((num_classes, num_classes), dtype=int)

for true_label, pred_label in zip(true_labels, predicted_labels):
    row = np.where(unique_labels == true_label)[0][0]
    col = np.where(unique_labels == pred_label)[0][0]
```

```

        confusion_matrix[row, col] += 1

# Calculate percentages
cm_percent = confusion_matrix / confusion_matrix.sum() * 100

# Create a figure and axis
plt.figure(figsize=(10, 6))
plt.imshow(confusion_matrix, interpolation='nearest', cmap=plt.cm.Blues)
plt.title("Matriz de Confusão")
plt.colorbar()

# Add labels to the matrix
tick_marks = np.arange(len(unique_labels))
plt.xticks(tick_marks, unique_labels, rotation=0)
plt.yticks(tick_marks, unique_labels)

# Add numerical values to the matrix
for i in range(num_classes):
    for j in range(num_classes):
        text = f"{confusion_matrix[i, j]} \n ({cm_percent[i, j]:.2f}%)"
        plt.text(j, i, text,
                  horizontalalignment="center",
                  color="white" if i == j else "black")

plt.ylabel('Classes Verdadeiras')
plt.xlabel('Classes Previstas')
plt.tight_layout()
plt.show()

```

Na seção onde está escrito “true_labels”, significa o valor real de cada imagem que foi apresentada para a IA após o seu treinamento. De modo oposto, onde está escrito “predicted_labels”, significa o valor dado à cada imagem pela IA, posteriormente à predição. Ao confrontar os resultados obtidos, comparados com os valores reais de cada seção, foi construída a matriz de confusão apresentada na Figura III-24. Ela mostra que 26 imagens pertencentes à classe F (55,32%) foram consideradas desta mesma, e que 15 imagens da classe FE (31,91%) foram consideradas pertencentes à mesma. Cinco imagens pertencentes à classe FE (10,64%) foram consideradas como F, e apenas uma imagem da classe F (2,13%) foi considerada como FE. Isso demonstrou que, mesmo essas imagens apresentando algumas semelhanças colorimétricas e diferenças morfológicas discutidas e evidenciadas na seção anterior, a IA apresentou “sensibilidade” para possibilitar diferenciar as classes conforme o aprendizado.

A *Teachable Machine* apresenta ser uma IA confiável, particularmente por ter sido desenvolvida pela Google, que é uma empresa conhecida e respeitável no campo da tecnologia e de aprendizado de máquina (WONG; FADZLY, 2022). Além disso, tem sido utilizada por muitos desenvolvedores e acadêmicos para treinar e implantar com sucesso modelos de classificação de imagens, como evidenciado pelos inúmeros tutoriais e guias disponíveis online (JEONG, 2020). No entanto, como qualquer ferramenta, a precisão e confiabilidade das previsões feitas por um modelo treinado utilizando a *Teachable Machine* dependerão da qualidade dos dados de treinamento e da adequação do modelo para a tarefa em questão (CARNEY et al., 2020).

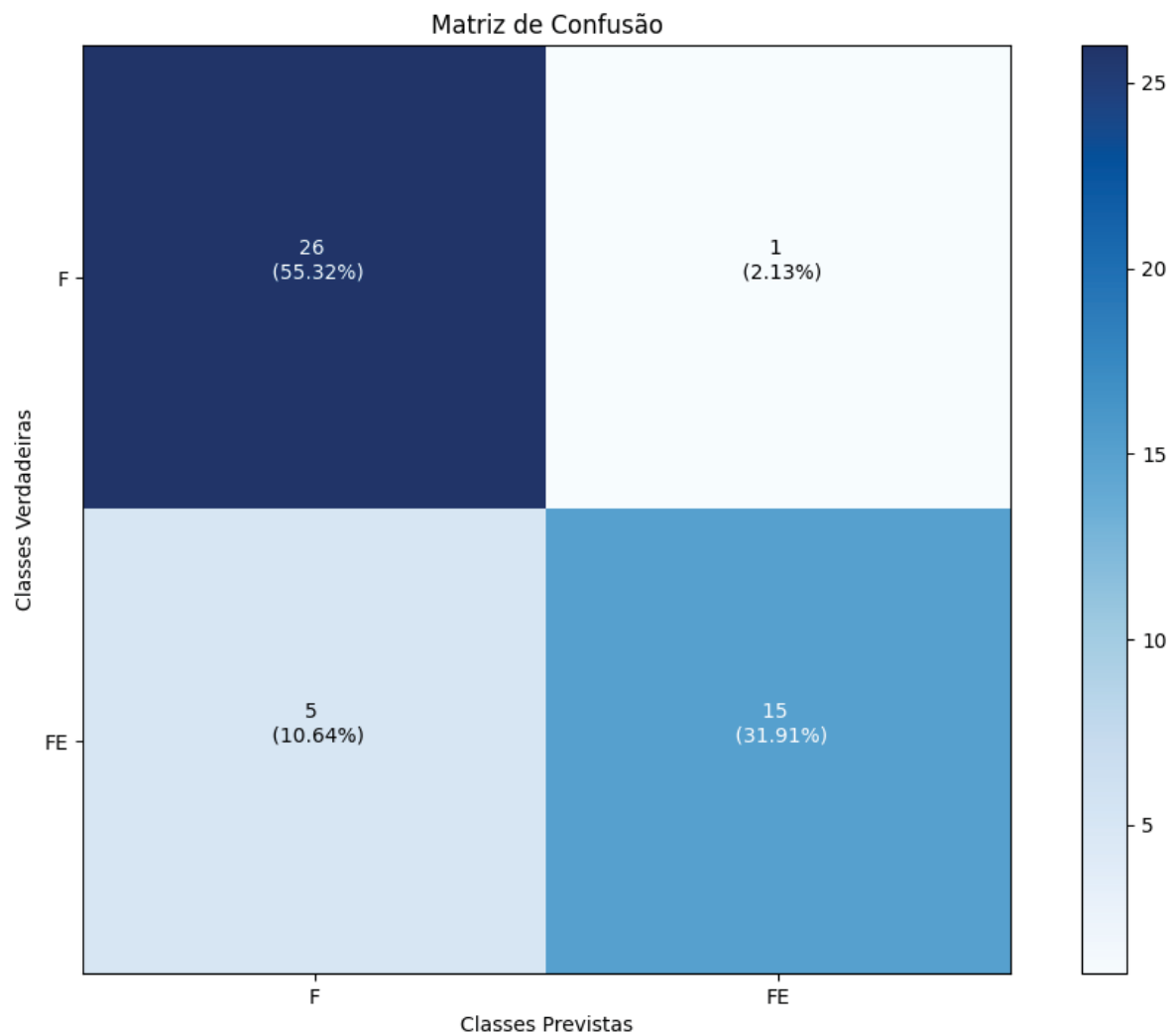


Figura III-24. Matriz de confusão da predição sobre os filamentos estirados e não estirados. Nesta matriz apresentam-se as proporções equivalentes às identificações das 47 imagens, baseadas nas alimentações das classes F e FE.

Para os resultados do teste de identificação das diferentes classes para identificar a qual hidrogel específico as imagens dos filamentos estirados e não estirados pertenciam, foram coletados e adicionados na matriz de confusão programada em Python, mostrada abaixo:

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

# Replace these with your actual predicted and true labels
true_labels = ["6", "6", "6", "6", "6", "6", "6", "8", "8", "8", "8",
"8", "8", "8", "8", "10", "10", "10", "10", "10", "10", "10", "10", "10", "10", "10", "10", "11", "11",
"11", "11", "11", "11", "11", "11", "11", "12", "12", "12", "12", "12", "12", "14",
"14", "14", "14", "14", "15", "15", "15", "15", "15"]
predicted_labels = ["6", "6", "6", "6", "11", "12", "6", "8", "8", "8", "8",
"8", "14", "8", "8", "11", "15", "15", "8", "10", "14", "10", "6", "10", "11", "11",
"11", "11", "11", "11", "11", "11", "6", "12", "10", "12", "12", "11", "12",
"10", "14", "8", "14", "12", "15", "15", "15", "15"]

# Create the confusion matrix
unique_labels = np.unique(true_labels)
num_classes = len(unique_labels)
confusion_matrix = np.zeros((num_classes, num_classes), dtype=int)

for true_label, pred_label in zip(true_labels, predicted_labels):
    row = np.where(unique_labels == true_label)[0][0]
    col = np.where(unique_labels == pred_label)[0][0]
    confusion_matrix[row, col] += 1

# Calculate percentages
cm_percent = confusion_matrix / confusion_matrix.sum() * 100

# Create a figure and axis
plt.figure(figsize=(10, 6))
plt.imshow(confusion_matrix, interpolation='nearest', cmap=plt.cm.Greens)
plt.title("Matriz de Confusão")
plt.colorbar()

# Add labels to the matrix
tick_marks = np.arange(len(unique_labels))
plt.xticks(tick_marks, unique_labels, rotation=0)
plt.yticks(tick_marks, unique_labels)

# Add numerical values to the matrix
for i in range(num_classes):
    for j in range(num_classes):
        text = f"{confusion_matrix[i, j]} \n ({cm_percent[i, j]:.2f}%)"
```

```

plt.text(j, i, text,
        horizontalalignment="center",
        color="white" if i == j else "black")

plt.ylabel('Classes Verdadeiras')
plt.xlabel('Classes Previstas')
plt.tight_layout()
plt.show()

```

Ao confrontarmos os resultados obtidos, comparados com os valores reais das imagens de cada secção, foi construída a matriz de confusão apresentada na Figura III-25. Ela mostra que houve grande diferença entre as classificações das predições dadas pela IA. De todos os grupos apresentados e treinados, apenas para os filamentos estirados e não estirados de DMEM-8 (14,89%) e DMEM-11 (14,89%) ocorreram acertos consideráveis. Para as demais classes, verificou-se uma “confusão” durante as predições, nas quais os diferentes tipos de filamentos foram confundidos em relação a qual hidrogel pertenciam. Dentro da área de estatística de aprendizado de máquina (*Machine learning*), existe uma denominação conhecida por “sobre-ajuste”, a qual é denominada quando um modelo estatístico se ajusta exatamente aos seus dados de treinamento, incluindo ruído e flutuações aleatórias nos dados. Isso resulta em um modelo que tem um bom desempenho nos dados de treinamento, mas um desempenho ruim em dados novos e não vistos, anulando seu propósito (YING, 2019). Isso pode ser uma das causas que justifica a não relação das imagens preditas pela IA com os seus valores reais.

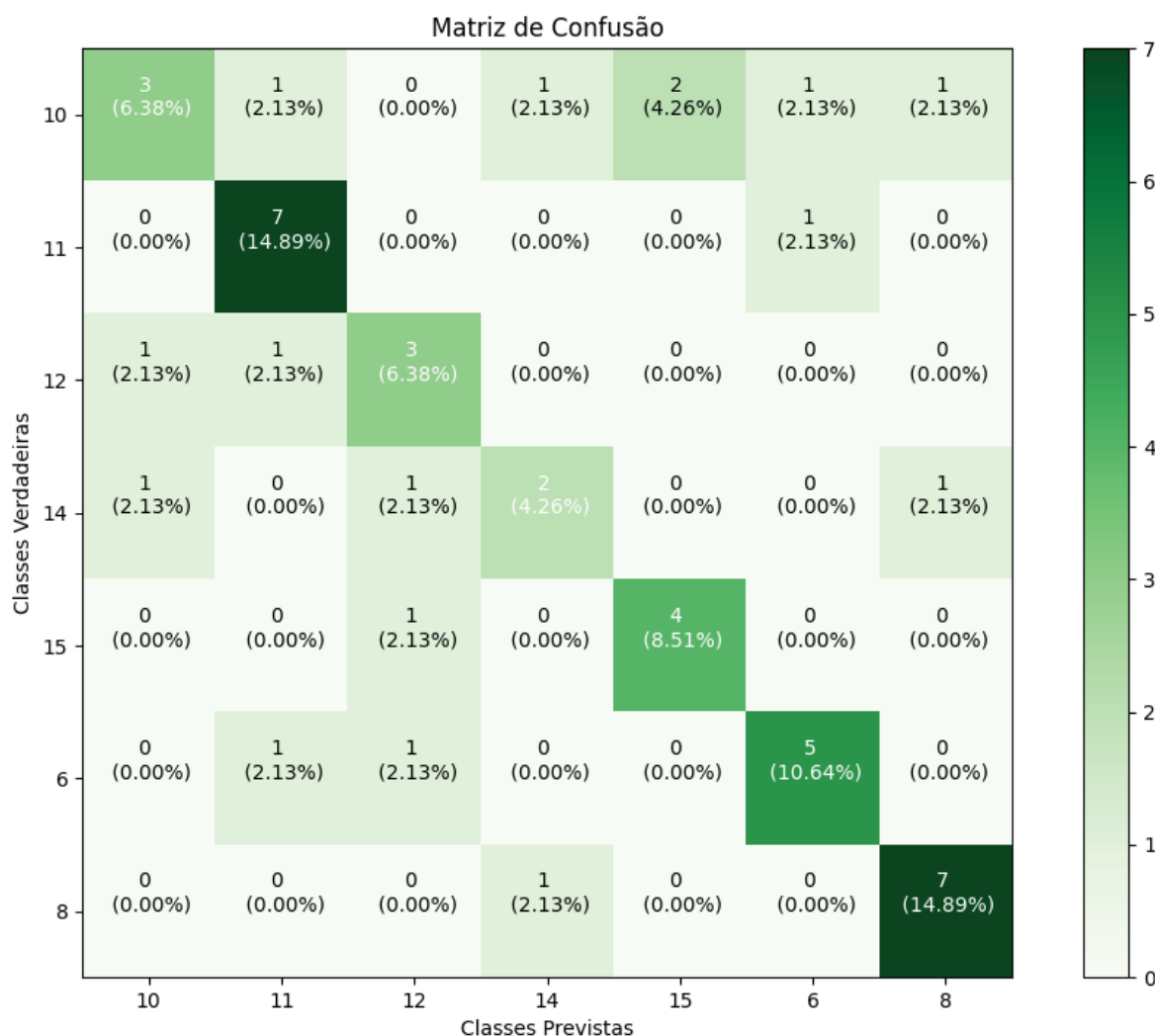


Figura III-25. Matriz de confusão da predição sobre os sete diferentes tipos de hidrogéis. Nesta matriz apresentam-se as proporções equivalentes às identificações das 47 imagens, baseadas nas entradas das classes DMEM-6, DMEM-8, DMEM-10, DMEM-11, DMEM-12, DMEM-14 e DMEM-15.

A inteligência artificial *Teachable Machine* vêm sendo utilizada em diversos tipos de estudos e pesquisas que envolvem imageamento para diferença de membranas de tímpano (JEONG, 2020), tomografias de melanomas (FORCHHAMMER et al., 2022) e doenças causadas por pragas de plantas (GAJENDIRAN; RHEE; KIM, 2017), assim como estudos voltados para educação e desenvolvimento de crianças (YOGENDRA et al., 2022). Utilizando a IA como ferramenta para o trabalho, os resultados obtidos surpreenderam positivamente devido à sua eficácia. Ademais, ela impressionou ao demonstrar uma precisão concisa, revelando-se altamente capaz de discernir proporcionalmente entre as categorias de imagens F e FE após o seu treinamento, resultando em uma taxa de

acertos consistentemente alta. Por outro lado, constatou-se que a performance da IA não foi satisfatória ao se tratar da predição precisa das diversas classes de filamentos com base no tipo de hidrogel, abrangendo tanto aquelas estiradas quanto as não-estiradas, mas isso de certo modo em função das semelhanças de composição entre eles e consequentemente similaridades entre as imagens geradas por mais que outros atributos como as propriedades micro- e nanomecânicas sejam distintos.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do ensaio de esterilidade dos hidrogéis evidenciaram a eficácia do processo de preparo, garantindo a esterilidade dos biomateriais desenvolvidos, o que é crucial em biofabricação devido à natureza não estéril dos biopolímeros utilizados. A esterilização dos hidrogéis foi fundamental para evitar contaminação, garantir a preservação da viabilidade celular e assegurar resultados confiáveis. A caracterização de secções dos filamentos por microscopia de luz revelou homogeneidade, permitindo a visualização de diferentes áreas longitudinais e transversais. As colorações indicaram a influência das proporções dos biopolímeros na coloração dos biomateriais e foi possível encontrar diferenças e semelhanças entre os filamentos estirados e não-estirados. A adição de células no hidrogel formulado com a formulação DMEM-10, mostrou modulações nas propriedades mecânicas, incluindo resistência à tração eletromecânica. O módulo de Young e a energia dissipada foram influenciados diretamente pela interação entre células e hidrogel. A investigação topográfica e de rugosidade por microscopia de força atômica indicou inalteração nas propriedades superficiais após a celularização, devido ao tamanho microscópico das células em relação à escala macroscópica do hidrogel. As curvas de força-distância revelaram que a celularização influenciou as interações ponteira-amostra, afetando adesão e propriedades elásticas. As características das curvas de força-distância foram moduladas pelas propriedades das células e suas interações com o hidrogel. Este fato foi corroborado pelas avaliações realizadas por microscopia eletrônica de varredura que evidenciaram a estrutura interna em alta resolução de fibras estiradas e sem estirar as quais apresentam células distribuídas no hidrogel celularizado. A utilização de aprendizado de máquina para análise de imagens obtidas por microscopia de luz das secções de filamentos mostrou resultados promissores,

embora com limitações nas predições de classes específicas. A inteligência artificial demonstrou alta precisão na diferenciação entre as categorias F e FE, mas teve dificuldades em prever com precisão as diferentes classes de fibras conforme o tipo de hidrogel. Em conjunto, esses resultados ressaltam a importância da esterilização, caracterização e impacto mecânico-estrutural da celularização nos hidrogéis de alginato de sódio e gelatina, abrindo caminho para aplicações em engenharia de tecidos e bioeletrônica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Nesta Tese de Doutorado obteve-se sucesso no desenvolvimento de filamentos à base de hidrogéis com diferentes proporções de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio, que podem adequar-se como base ou arcabouço para células, com a finalidade de realizar testes de resistência mecânica e utilização em diversos planos da bioengenharia.

No Capítulo I observou-se que concentrações mais altas de biopolímeros e agente de reticulação aumentaram a resistência dos filamentos. Ao todo, sete combinação de biopolímeros para formulação de hidrogéis com meio de cultivo de células de mamíferos mostraram resistência mecânica promissora para incorporação de células vivas. As análises topográficas revelaram variações de altura e nanorrugosidade ajustáveis ao modular concentrações de alginato de sódio, gelatina e cloreto de cálcio. A correlação entre composição, atributos mecânicos e topografia da superfície possibilita a criação de biomateriais personalizados para diversas aplicações, incluindo engenharia de tecidos. O estudo destacou a importância da composição na resistência e topografia, promovendo avanços nos biomateriais e suas aplicações.

No Capítulo II examinou-se o comportamento, a resistência mecânica e a desintegração ao longo do tempo de filamentos de hidrogéis. A técnica utilizada foi a fiação úmida, criando filamentos de diferentes diâmetros com variações nas concentrações de alginato de sódio e gelatina. Observou-se que filamentos produzidos com agulhas de calibres maiores tiveram maior tração eletromecânica e menor alongamento, enquanto filamentos menores confeccionados com agulhas de calibres menores mostraram menor resistência à tração e maior elasticidade. A estabilidade das propriedades ao longo do tempo foi notável. Ademais, a formulação DMEM-10 foi a que se manteve mais estável em todos os parâmetros analisados. Testes de intumescimento e desintegração evidenciaram que concentrações diferentes dos componentes acarretaram comportamentos distintos.

No Capítulo III abordou-se os resultados da pesquisa e a eficácia da esterilização, etapa fundamental para evitar contaminação e preservar viabilidade celular. A caracterização de secções por microscopia de luz mostrou materiais homogêneos com destaque para a influência das proporções de biopolímeros nas colorações. A incorporação de células no hidrogel formulado pela combinação DMEM-

10, impactou as propriedades mecânicas, como resistência à tração eletromecânica. A análise topográfica indicou estabilidade na superfície após a celularização. As curvas de força-distância revelaram modulação alcançada pelas propriedades celulares e o uso de IA mostrou alta precisão em classificar filamentos estirados e não estirados.

Foi possível identificar que os filamentos de hidrogéis desenvolvidos a partir de uma composição (DMEM-10) se mostrou mais uniforme com relação às características de tração eletromecânica, variação do calibre da agulha para a extrusão e tempo de armazenamento. Este foi selecionado para a realização de experimentos com a incorporação de células de mamífero (OSCC-3).

Obter um hidrogel que mantém parcialmente suas características e propriedades mecânicas após celularização oferece diversas vantagens em várias áreas, como engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Isso assegura que a estrutura 3D do hidrogel, juntamente com suas propriedades físicas, permanecendo intacto ou pouco alterado imediatamente após a celularização, garantindo um ambiente propício para o crescimento, diferenciação e atividades celulares. Essa estabilidade mecânica contínua ajuda a sustentar a viabilidade celular, a migração e a interação celular, contribuindo para o sucesso da formação de tecidos funcionais.

Ademais, a preservação das propriedades mecânicas ao longo do tempo oferece a capacidade de criar implantes duradouros e dispositivos biomédicos que mantenham sua eficácia ao longo do tempo. Isso impulsiona o desenvolvimento de terapias mais eficientes e duradouras, reforçando a importância de hidrogéis com características consistentes para aplicações clínicas e científicas.

A utilização de filamentos biopoliméricos avaliados tanto em termos mecânicos quanto morfológicos oferece uma perspectiva altamente promissora no campo da engenharia de tecidos. Ao incorporar células-tronco nesses filamentos e submetê-las a uma tração eletromecânica cuidadosamente controlada, é possível desencadear diferenciações celulares controladas e direcionadas. Essa abordagem inovadora não apenas permite a criação de estruturas tridimensionais que mimetizam mais fielmente os tecidos humanos, mas também oferece um potencial significativo para o desenvolvimento de terapias regenerativas mais eficazes e personalizadas, abrindo caminho para avanços emocionantes no campo da medicina regenerativa.

REFERÊNCIAS

ABASALIZADEH, Farhad; MOGHADDAM, Sevil Vaghefi; ALIZADEH, Effat; AKBARI, Elahe; KASHANI, Elmira; FAZLJOU, Seyyed Mohammad Bagher; TORBATI, Mohammadali; AKBARZADEH, Abolfazl. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting (Journal of Biological Engineering (2020) 14: 8 DOI: 10.1186/s13036-020-0227-7). **Journal of Biological Engineering**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–22, 2020. DOI: 10.1186/s13036-020-00239-0.

AGOSSA, K.; DELEPIERRE, A.; LIZAMBARD, M.; DELCOURT-DEBRUYNE, E.; SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F.; NEUT, C. In-situ forming implants for dual controlled release of chlorhexidine and ibuprofen for periodontitis treatment: Microbiological and mechanical key properties. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [S. l.], v. 60, p. 0–31, 2020. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101956.

AGUADO, Brian A.; GRIM, Joseph C.; ROSALES, Adrianne M.; WATSON-CAPPS, Jana J.; ANSETH, Kristi S. Engineering precision biomaterials for personalized medicine. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 10, n. 424, 2018. DOI: 10.1126/scitranslmed.aam8645.

AHMAD RAUS, Raha; WAN NAWAWI, Wan Mohd Fazli; NASARUDDIN, Ricca Rahman. Alginate and alginate composites for biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 280–306, 2021. DOI: 10.1016/j.ajps.2020.10.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.10.001>.

AHMAD, Zubair; SALMAN, Saad; KHAN, Shahid Ali; AMIN, Abdul; RAHMAN, Zia Ur; AL-GHAMDI, Youssef O.; AKHTAR, Kalsoom; BAKHSH, Esraa M.; KHAN, Sher Bahadar. Versatility of Hydrogels: From Synthetic Strategies, Classification, and Properties to Biomedical Applications. **Gels**, [S. l.], v. 8, n. 3, 2022. DOI: 10.3390/gels8030167.

AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015. a. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.

AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of advanced research**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 105–21, 2015. b. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750745>.

AHMED, Waleed; SIRAJ, Sidra; AL-MARZOUQI, Ali H. Embracing additive manufacturing technology through fused filament fabrication for antimicrobial with enhanced formulated materials. **Polymers**, [S. l.], v. 13, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/polym13091523.

AKBARZADEH SOLBU, Anita; KOERNIG, Andre; KJESBU, Joachim S.; ZAYTSEVA-ZOTOVA, Daria; SLETMOEN, Marit; STRAND, Berit L. High resolution

imaging of soft alginate hydrogels by atomic force microscopy. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 276, n. October 2021, p. 118804, 2022. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118804. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118804>.

AL-ANTARI, Mugahed A. Artificial Intelligence for Medical Diagnostics—Existing and Future AI Technology! **Diagnostics**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 1–3, 2023. DOI: 10.3390/diagnostics13040688.

AL-SHALAWI, Faisal Dakhelallah; MOHAMED ARIFF, Azmah Hanim; JUNG, Dong-Won; MOHD ARIFFIN, Mohd Khairol Anuar; SENG KIM, Collin Looi; BRABAZON, Dermot; AL-OSAIMI, Maha Obaid. Biomaterials as Implants in the Orthopedic Field for Regenerative Medicine: Metal versus Synthetic Polymers. **Polymers**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 2601, 2023. DOI: 10.3390/polym15122601.

ALJOHANI, Wael jumah; WENCHAO, Li; ULLAH, Muhammad Wajid; ZHANG, Xianglin; YANG, Guang. Application of Sodium Alginate Hydrogel. **IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry**, [S. l.], v. 03, n. 3, p. 19–31, 2017. DOI: 10.9790/264x-03031931.

ALONSO, Jose Maria; DEL OLMO, Jon Andrade; GONZALEZ, Raul Perez; SAEZ-MARTINEZ, Virginia. Injectable hydrogels: From laboratory to industrialization. **Polymers**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 1–24, 2021. DOI: 10.3390/polym13040650.

ALTAY, Gizem; TOSI, Sébastien; GARCÍA-DÍAZ, María; MARTÍNEZ, Elena. Imaging the Cell Morphological Response to 3D Topography and Curvature in Engineered Intestinal Tissues. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. April, p. 1–12, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00294.

ALTOMARE, Lina; BONETTI, Lorenzo; CAMPIGLIO, Chiara E.; DE NARDO, Luigi; DRAGHI, Lorenza; TANA, Francesca; FARÈ, Silvia. Biopolymer-based strategies in the design of smart medical devices and artificial organs. **International Journal of Artificial Organs**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. 337–359, 2018. DOI: 10.1177/0391398818765323.

ANDREAZZA, Robson; MORALES, Amaia; PIENIZ, Simone; LABIDI, Jalel. Gelatin-Based Hydrogels: Potential Biomaterials for Remediation. **Polymers**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 1–12, 2023. DOI: 10.3390/polym15041026.

ANWAR, Ayaz; MASRI, Abdulkader; RAO, Komal; RAJENDRAN, Kavitha; KHAN, Naveed Ahmed; SHAH, Muhammad Raza; SIDDIQUI, Ruqaiyyah. Antimicrobial activities of green synthesized gums-stabilized nanoparticles loaded with flavonoids. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-39528-0.

ARABI, Hossein; AKHAVANALLAF, Azadeh; SANAAT, Amirhossein; SHIRI, Isaac; ZAIDI, Habib. The promise of artificial intelligence and deep learning in PET and SPECT imaging. **Physica Medica**, [S. l.], v. 83, n. December 2020, p. 122–137, 2021. DOI: 10.1016/j.ejmp.2021.03.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmp.2021.03.008>.

ARNOLD, Katherine M.; SICARD, Delphine; TSCHUMPERLIN, Daniel J.; WESTENDORF, Jennifer J. Atomic Force Microscopy Micro-Indentation Methods for Determining the Elastic Modulus of Murine Articular Cartilage. **Sensors**, [S. l.], v. 23, n. 4, 2023. DOI: 10.3390/s23041835.

ASWATHY, S. H.; NARENDRAKUMAR, U.; MANJUBALA, I. Commercial hydrogels for biomedical applications. **Heliyon**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. e03719, 2020. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e03719. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03719>.

BACHMANN, Barbara; SPITZ, Sarah; SCHÄDL, Barbara; TEUSCHL, Andreas H.; REDL, Heinz; NÜRNBERGER, Sylvia; ERTL, Peter. Stiffness Matters: Fine-Tuned Hydrogel Elasticity Alters Chondrogenic Redifferentiation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. April, p. 1–12, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00373.

BALION, Zbigniew; SIPAILAITE, Emilija; STASYTE, Gabija; VAILIONYTE, Agne; MAZETYTE-GODIENE, Airina; SESKEVICIUTE, Ieva; BERNOTIENE, Rasa; PHOPASE, Jaywant; JEKABSONE, Aiste. Investigation of Cancer Cell Migration and Proliferation on Synthetic Extracellular Matrix Peptide Hydrogels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. September, p. 1–13, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00773.

BARANWAL, Jaya; BARSE, Brajesh; FAIS, Antonella; DELOGU, Giovanna Lucia; KUMAR, Amit. Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. **Polymers**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 1–22, 2022. DOI: 10.3390/polym14050983.

BARCELÓ, Xavier; EICHHOLZ, Kian F.; GARCIA, Orquidea; KELLY, Daniel J. Tuning the Degradation Rate of Alginate-Based Bioinks for Bioprinting Functional Cartilage Tissue. **Biomedicines**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1–14, 2022. DOI: 10.3390/biomedicines10071621.

BARREIRO CARPIO, Mabel; DABAGHI, Mohammadhossein; UNGUREANU, Julia; KOLB, Martin R.; HIROTA, Jeremy A.; MORAN-MIRABAL, Jose Manuel. 3D Bioprinting Strategies, Challenges, and Opportunities to Model the Lung Tissue Microenvironment and Its Function. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 9, n. November, p. 1–24, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.773511.

BASHIR, Shahid; HINA, Maryam; IQBAL, Javed; RAJPAR, A. H.; MUJTABA, M. A.; ALGHAMDI, N. A.; WAGEH, S.; RAMESH, K.; RAMESH, S. Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and their applications. **Polymers**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 1–60, 2020. DOI: 10.3390/polym12112702.

BAYER, Ilker S. Hyaluronic acid and controlled release: A review. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 11, 2020. DOI: 10.3390/molecules25112649.

BHAT, Sumrita; KUMAR, Ashok. Biomaterials and bioengineering tomorrows. [S. l.], n. September, p. 1–12, 2013.

BISWAL, Trinath; BADJENA, Sushant Kumar; PRADHAN, Debabrata. Sustainable biomaterials and their applications: A short review. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], v. 30, p. 274–282, 2020. DOI: 10.1016/j.matpr.2020.01.437. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.437>.

BOCIAGA, Dorota; BARTNIAK, Mateusz; GRABARCZYK, Jacek; PRZYBYSZEWSKA, Karolina. Sodium alginate/gelatin hydrogels for direct bioprinting-the effect of composition selection and applied solvents on the bioink properties. **Materials**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 1–19, 2019. DOI: 10.3390/ma12172669.

BONFERONI, Maria Cristina et al. Biomaterials for soft tissue repair and regeneration: A focus on Italian research in the field. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13091341.

BOSE, Susmita; KE, Dongxu; SAHASRABUDHE, Himanshu; BANDYOPADHYAY, Amit; BIOMEDICAL, W. M. Keck; STATES, United. Additive manufacturing of biomaterials. [S. l.], p. 45–111, 2019. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2017.08.003.Additive.

BRIOT, N.; CHAGNON, G.; CONNESSON, N.; PAYAN, Y. In vivo measurement of breast tissues stiffness using a light aspiration device. **Clinical Biomechanics**, [S. l.], v. 99, p. 1–11, 2022. DOI: 10.1016/j.clinbiomech.2022.105743.

BUSTAMANTE-TORRES, Moises; ARCENTALES-VERA, Belén; ESTRELLA-NÚÑEZ, Jocelyne; YÁNEZ-VEGA, Heidi; BUCIO, Emilio. Antimicrobial Activity of Composites-Based on Biopolymers. **Macromol**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 258–283, 2022. DOI: 10.3390/macromol2030018.

CARNEY, Michelle; WEBSTER, Barron; ALVARADO, Irene; PHILLIPS, Kyle; HOWELL, Noura; GRIFFITH, Jordan; JONGEJAN, Jonas; PITARU, Amit; CHEN, Alexander. Teachable machine: Approachable web-based tool for exploring machine learning classification. **Conference on Human Factors in Computing Systems - Proceedings**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1145/3334480.3382839.

CARVALHO, Beatriz Santos. Nanobiofabricação de estruturas 3D com nanopartículas de prata antimicrobianas utilizando técnicas manuais e robóticas. **Universidade de Brasília, Brasília**, [S. l.], p. 1–94, 2019. Disponível em: http://icts.unb.br/jspui/bitstream/10482/35487/1/2019_BeatrizSantosCarvalho.pdf.

CASANOVA, Fernando; CARNEY, Paul R.; SARNTINORANONT, Malisa. Influence of needle insertion speed on backflow for convection-enhanced delivery. **Journal of Biomechanical Engineering**, [S. l.], v. 134, n. 4, p. 1–8, 2012. DOI: 10.1115/1.4006404.

CATOIRA, Marta Calvo; FUSARO, Luca; DI FRANCESCO, Dalila; RAMELLA, Martina; BOCCAFOSCI, Francesca. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [S. l.], v. 30, n. 10, 2019. DOI: 10.1007/s10856-019-6318-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>.

CHAI, Qinyuan; JIAO, Yang; YU, Xinjun. Hydrogels for biomedical applications: Their characteristics and the mechanisms behind them. **Gels**, [S. l.], v. 3, n. 1, 2017. DOI: 10.3390/gels3010006.

CHARRIER, Elisabeth E.; POGODA, Katarzyna; LI, Robin; PARK, Chan Young; FREDBERG, Jeffrey J.; JANMEY, Paul A. A novel method to make viscoelastic polyacrylamide gels for cell culture and traction force microscopy. **APL Bioengineering**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1063/5.0002750.

CHATERJI, Somali; KWON, Il Keun; PARK, Kinam. **Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices** *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 2007. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.018.

CHEN, Fa-Ming; LIU, Xiaohua; POLYM, Prog; AUTHOR, Sci. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering HHS Public Access Author manuscript. **Prog Polym Sci**, [S. l.], v. 53, p. 86–168, 2016. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004. Advancing. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4808059/pdf/nihms680686.pdf>.

CHEN, Genxin; TANG, Sijie; YAN, Honghan; ZHU, Xiongbao; WANG, Huimin; MA, Liya; MAO, Kang; YANG, Changying; RAN, Jiabing. Binary Double Network-like Structure: An Effective Energy-Dissipation System for Strong Tough Hydrogel Design. **Polymers**, [S. l.], v. 15, n. 3, 2023. DOI: 10.3390/polym15030724.

CHEN, Yuru; SONG, Jian; WANG, Song; LIU, Weiqiang. PVA-Based Hydrogels: Promising Candidates for Articular Cartilage Repair. **Macromolecular Bioscience**, [S. l.], v. 21, n. 10, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1002/mabi.202100147.

CHIMENE, David; KAUNAS, Roland; GAHARWAR, Akhilesh K. Hydrogel Bioink Reinforcement for Additive Manufacturing: A Focused Review of Emerging Strategies. [S. l.], v. 1902026, p. 1–22, 2019. DOI: 10.1002/adma.201902026.

CORREA, Santiago; GROSSKOPF, Abigail K.; LOPEZ HERNANDEZ, Hector; CHAN, Doreen; YU, Anthony C.; STAPLETON, Lyndsay M.; APPEL, Eric A. Translational Applications of Hydrogels. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 121, n. 18, p. 11385–11457, 2021. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c01177.

COSTANTINI, Marco; COLOSI, Cristina; ŚWIĘSZKOWSKI, Wojciech; BARBETTA, Andrea. Co-axial wet-spinning in 3D bioprinting: State of the art and future perspective of microfluidic integration. **Biofabrication**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2019. DOI: 10.1088/1758-5090/aae605.

CUI, Linan; YAO, Yuan; YIM, Evelyn K. F. The effects of surface topography modification on hydrogel properties. **APL Bioengineering**, [S. l.], v. 5, n. 3, 2021. DOI: 10.1063/5.0046076.

CUOMO, Francesca; COFELICE, Martina; LOPEZ, Francesco. Rheological characterization of hydrogels from alginate-based nanodispersion. **Polymers**, [S. l.], v. 11, n. 2, 2019. DOI: 10.3390/polym11020259.

DAS, Abinash; RINGU, Togam; GHOSH, Sampad; PRAMANIK, Nabakumar. **A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers**. [s.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2023. v. 80 DOI: 10.1007/s00289-022-04443-4. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04443-4>.

DAVIS, Rahul; SINGH, Abhishek; JACKSON, Mark James; COELHO, Reginaldo Teixeira; PRAKASH, Divya; CHARALAMBOUS, Charalambos Panayiotou; AHMED, Waqar; DA SILVA, Leonardo Rosa Ribeiro; LAWRENCE, Abner Ankit. **A comprehensive review on metallic implant biomaterials and their subtractive manufacturing**. [s.l.] : Springer London, 2022. v. 120 DOI: 10.1007/s00170-022-08770-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00170-022-08770-8>.

DELL, Annika C.; WAGNER, Grayson; OWN, Jason; GEIBEL, John P. 3D Bioprinting Using Hydrogels: Cell Inks and Tissue Engineering Applications. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 14, n. 12, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122596.

DEY, Arup; EAGLE, Isnala Nanjin Roan; YODO, Nita. A review on filament materials for fused filament fabrication. **Journal of Manufacturing and Materials Processing**, [S. l.], v. 5, n. 3, 2021. DOI: 10.3390/jmmp5030069.

DONATE, Ricardo; MONZÓN, Mario; ALEMÁN-DOMÍNGUEZ, Mariá Elena. Additive manufacturing of PLA-based scaffolds intended for bone regeneration and strategies to improve their biological properties. **E-Polymers**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 571–599, 2020. DOI: 10.1515/epoly-2020-0046.

DURKEE, Madeleine S.; ABRAHAM, Rebecca; CLARK, Marcus R.; GIGER, Maryellen L. Artificial Intelligence and Cellular Segmentation in Tissue Microscopy Images. **American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 191, n. 10, p. 1693–1701, 2021. DOI: 10.1016/j.ajpath.2021.05.022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.05.022>.

DWIVEDI, Ruby; KUMAR, Sumit; PANDEY, Rahul; MAHAJAN, Aman; NANDANA, Deepti; KATTI, Dharendra S.; MEHROTRA, Divya. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 381–388, 2020. DOI: 10.1016/j.jobcr.2019.10.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.10.003>.

DZOBO, Kevin; THOMFORD, Nicholas Ekow; SENTHEBANE, Dimakatso Alice; SHIPANGA, Hendrina; ROWE, Arielle; DANDARA, Collet; PILLAY, Michael; MOTAUNG, Keolebogile Shirley Caroline M. Advances in regenerative medicine and tissue engineering: Innovation and transformation of medicine. **Stem Cells International**, [S. l.], v. 2018, 2018. DOI: 10.1155/2018/2495848.

EBIHARA, Lisa; ACHARYA, Pooja; TONG, Jun Jie. Mechanical Stress Modulates Calcium-Activated-Chloride Currents in Differentiating Lens Cells. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 13, n. January, p. 1–9, 2022. DOI: 10.3389/fphys.2022.814651.

EHRlich, Hermann. Biomaterials and Biological Materials, Common Definitions, History, and Classification. *[S. l.]*, p. 3–22, 2010. DOI: 10.1007/978-90-481-9130-7_1.

EL SAYED, Marwa M. Production of Polymer Hydrogel Composites and Their Applications. **Journal of Polymers and the Environment**, *[S. l.]*, v. 31, n. 7, p. 2855–2879, 2023. DOI: 10.1007/s10924-023-02796-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02796-z>.

ELKHOURY, Kamil; MORSINK, Margaretha; SANCHEZ-GONZALEZ, Laura; KAHN, Cyril; TAMAYOL, Ali; ARAB-TEHRANY, Elmira. Biofabrication of natural hydrogels for cardiac, neural, and bone Tissue engineering Applications. **Bioactive Materials**, *[S. l.]*, v. 6, n. 11, p. 3904–3923, 2021. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.03.040. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.040>.

ERIK SJØNTOLT, Carsten Edmund. In vivo determination of young's modulus for the human cornea. **Bulletin of Mathematical Biology**, *[S. l.]*, v. 49, n. 2, p. 217–232, 1987.

EVANS, Douglas W.; MORAN, Emma C.; BAPTISTA, Pedro M.; SOKER, Shay; SPARKS, Jessica L. Scale-dependent mechanical properties of native and decellularized liver tissue. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, *[S. l.]*, v. 12, n. 3, p. 569–580, 2013. DOI: 10.1007/s10237-012-0426-3.

FARSHIDFAR, Nima; IRAVANI, Siavash; VARMA, Rajender S. Alginate-Based Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Marine Drugs**, *[S. l.]*, v. 21, n. 3, 2023. DOI: 10.3390/md21030189.

FATIMI, Ahmed; OKORO, Oseweuba Valentine; PODSTAWCZYK, Daria; SIMINSKA-STANNY, Julia; SHAVANDI, Amin. Natural Hydrogel-Based Bio-Inks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering: A Review. **Gels**, *[S. l.]*, v. 8, n. 3, 2022. DOI: 10.3390/gels8030179.

FISHER, Omar Z.; KHADEMHOSEINI, Ali; LANGER, Robert; PEPPAS, Nicholas A. Bioinspired materials for controlling stem cell fate. **Accounts of Chemical Research**, *[S. l.]*, v. 43, n. 3, p. 419–428, 2010. DOI: 10.1021/ar900226q.

FORCHHAMMER, Stephan; ABU-GHAZALEH, Amar; METZLER, Gisela; GARBE, Claus; EIGENTLER, Thomas. Development of an Image Analysis-Based Prognosis Score Using Google's Teachable Machine in Melanoma. **Cancers**, *[S. l.]*, v. 14, n. 9, 2022. DOI: 10.3390/cancers14092243.

FU, Zhouquan; ANGELINE, Vincent; SUN, Wei. Evaluation of Printing Parameters on 3D Extrusion Printing of Pluronic Hydrogels and Machine Learning Guided Parameter Recommendation. **International Journal of Bioprinting**, *[S. l.]*, v. 7, n. 4, p. 179–189, 2021. DOI: 10.18063/IJB.V7I4.434.

FUCHS, Stephanie; SHARIATI, Kaavian; MA, Minglin. Specialty Tough Hydrogels and Their Biomedical Applications. **Advanced Healthcare Materials**, *[S. l.]*

I., v. 9, n. 2, p. 1–60, 2020. DOI: 10.1002/adhm.201901396.

FUENTES-CAPARRAS, Ana M.; CANALES-GALARZA, Zaloa; BARROW, Michael; DIETRICH, Bart; LAÜGER, Jörg; NEMETH, Markus; DRAPER, Emily R.; ADAMS, Dave J. Mechanical Characterization of Multilayered Hydrogels: A Rheological Study for 3D-Printed Systems. **Biomacromolecules**, [*S. I.*], v. 22, n. 4, p. 1625–1638, 2021. DOI: 10.1021/acs.biomac.1c00078.

GADZHIEV, Nariman; GORELOV, Dmitry; MALKHASYAN, Vigen; AKOPYAN, Gagik; HARCHELAVA, Revaz; MAZURENKO, Denis; KOSMALA, Christina; OKHUNOV, Zhamshid; PETROV, Sergei. Comparison of silicone versus polyurethane ureteral stents: A prospective controlled study. **BMC Urology**, [*S. I.*], v. 20, n. 1, p. 1–5, 2020. DOI: 10.1186/s12894-020-0577-y.

GAJENDIRAN, Mani; RHEE, Jae-Sung; KIM, Kyobum. Recent Developments in Thiolated Polymeric Hydrogels for Tissue Engineering Applications. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [*S. I.*], v. 24, n. 1, p. 66–74, 2017. DOI: 10.1089/ten.teb.2016.0442.

GALANTE, Raquel; PINTO, Terezinha J. A.; COLAÇO, Rogério; SERRO, Ana Paula. Sterilization of hydrogels for biomedical applications: A review. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [*S. I.*], v. 106, n. 6, p. 2472–2492, 2018. DOI: 10.1002/jbm.b.34048.

GALANTE, Raquel; REDIGUIERI, Carolina F.; KIKUCHI, Irene Satiko; VASQUEZ, Pablo A. S.; COLAÇO, Rogério; SERRO, Ana Paula; PINTO, Terezinha J. A. About the sterilization of chitosan hydrogel nanoparticles. **PLoS ONE**, [*S. I.*], v. 11, n. 12, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0168862.

GARDIKIOTIS, Ioannis; COJOCARU, Florina Daniela; MIHAI, Cosmin Teodor; BALAN, Vera; DODI, Gianina. Borrowing the Features of Biopolymers for Emerging Wound Healing Dressings: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. I.*], v. 23, n. 15, 2022. DOI: 10.3390/ijms23158778.

GEORGE, Benu; BHATIA, Nitish; KUMAR, Abhitinder; GNANAMANI, A.; THILAGAM, R.; SHANUJA, S. K.; VADAKKADATH MEETHAL, Kannan; SHIJI, T. M.; T. V, Suchithra. Bioinspired gelatin based sticky hydrogel for diverse surfaces in burn wound care. **Scientific Reports**, [*S. I.*], v. 12, n. 1, p. 1–19, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-17054-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17054-w>.

GHEORGHITA, Roxana; ANCHIDIN-NOROCEL, Liliana; FILIP, Roxana; DIMIAN, Mihai; COVASA, Mihai. Applications of biopolymers for drugs and probiotics delivery. **Polymers**, [*S. I.*], v. 13, n. 16, 2021. DOI: 10.3390/polym13162729.

GIUSEPPE, Michael Di; LAW, Nicholas; WEBB, Braeden; A. MACRAE, Ryley; LIEW, Lawrence J.; SERCOMBE, Timothy B.; DILLEY, Rodney J.; DOYLE, Barry J. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [*S. I.*], v. 79, n. December 2017, p. 150–157, 2018. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2017.12.018. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.12.018>.

GIZ, Ayse Su; BERBEROGLU, Melisa; BENER, Semira; AYDELIK-AYAZOGLU, Sena; BAYRAKTAR, Halil; ALACA, B. Erdem; CATALGIL-GIZ, Hucese. A detailed investigation of the effect of calcium crosslinking and glycerol plasticizing on the physical properties of alginate films. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 148, p. 49–55, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.103. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.103>.

GOKHIN, David S.; KIM, Nancy E.; LEWIS, Sarah A.; HOENECKE, Heinz R.; D'LIMA, Darryl D.; FOWLER, Velia M. Thin-filament length correlates with fiber type in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [S. l.], v. 302, n. 3, 2012. DOI: 10.1152/ajpcell.00299.2011.

GOUDOULAS, Thomas B.; DIDONAKI, Anna; PAN, Sharadwata; FATTAHI, Ehsan; BECKER, Thomas. Comparative Large Amplitude Oscillatory Shear (LAOS) Study of Ionically and Physically Crosslinked Hydrogels. [S. l.], 2023.

GREGORY GILLISPIE, PETER PRIM, JOSHUA COPUS, JOHN FISHER, ANTONIOS G. MIKOS, JAMES J. YOO, Anthony Atala and Sang Jin Lee. Assessment Methodologies for Extrusion-Based Bioink Printability. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017. DOI: 10.1088/1758-5090/ab6f0d.Assessment.

GRUHN, Thomas; MONSALVE, Camilo Ortiz; MÜLLER, Claudia; HEID, Susanne; BOCCACCINI, Aldo R.; SALEHI, Sahar. Fabrication of Hydrogel-Based Composite Fibers and Computer Simulation of the Filler Dynamics in the Composite Flow. **Bioengineering**, [S. l.], v. 10, n. 4, 2023. DOI: 10.3390/bioengineering10040448.

GU, Zeming; FU, Jianzhong; LIN, Hui; HE, Yong. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 529–557, 2020. DOI: 10.1016/j.ajps.2019.11.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.003>.

GUILLÉN-CARVAJAL, Karen; VALDEZ-SALAS, Benjamín; BELTRÁN-PARTIDA, Ernesto; SALOMÓN-CARLOS, Jorge; CHENG, Nelson. Chitosan, Gelatin, and Collagen Hydrogels for Bone Regeneration. **Polymers**, [S. l.], v. 15, n. 13, p. 2762, 2023. DOI: 10.3390/polym15132762.

GUNGOR-OZKERIM, P. SELCAN, ILYAS INCI, YU SHRIKE ZHANG, ALI KHADEMHOSEINIA, And Mehmet Remzi Dokmeci. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 176, n. 12, p. 139–148, 2017. DOI: 10.1039/c7bm00765e.Bioinks.

GUO, Li; CHAI, Yunlei; ZHOU, Fengchao; WANG, Peng. Preparation and Properties of Hyaluronic Acid Hydrogel Modified by L-cysteine Hydrochloride. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S. l.], v. 651, n. 4, 2021. DOI: 10.1088/1755-1315/651/4/042022.

HAITAO CUI, MARGARET NOWICKI, PROF. JOHN P. FISHER, And Prof. Lijie Grace Zhang. 3D Bioprinting for Organ Regeneration. **Adv Healthc Mater**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 139–148, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1801473.The.

HAMA, Rikako; ULZIBAYAR, Anudari; REINHARDT, James W.; WATANABE, Tatsuya; KELLY, John; SHINOKA, Toshiharu. Recent Developments in Biopolymer-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. **Biomolecules**, [S. l.], v. 13, n. 2, 2023. DOI: 10.3390/biom13020280.

HAMILTON, Kirsten E.; PYE, David C. Young's modulus in normal corneas and the effect on applanation tonometry. **Optometry and Vision Science**, [S. l.], v. 85, n. 6, p. 445–450, 2008. DOI: 10.1097/OPX.0b013e3181783a70.

HAN, Feng; MENG, Qingchen; XIE, En; LI, Kexin; HU, Jie; CHEN, Qianglong; LI, Jiaying; HAN, Fengxuan. Engineered biomimetic micro/nano-materials for tissue regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. July, p. 1–20, 2023. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1205792.

HAN, Xia; HUNG, Hsiang-Chieh; JAIN, Priyesh; SUN, Fang; XU, Xuewei; YANG, Wei; BAI, Tao; JIANG, Shaoyi. Sterilization, hydration-dehydration and tube fabrication of zwitterionic hydrogels. **Biointerphases**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 1–7, 2017. DOI: 10.1116/1.4983502. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1116/1.4983502>.

HATEFI ARDAKANI, Saeed; MOSLEMZADEH, Hesam; MOHAMMADI, Soheil. Delamination analysis in bimetals consisting of shape memory alloy and elastoplastic layers. **Composite Structures**, [S. l.], v. 225, n. May, 2019. DOI: 10.1016/j.compstruct.2019.111149.

HERRADA-MANCH, Helena; ALEJANDRO, Manuel; AGUILAR, Enrique. Essential Guide to Hydrogel Rheology in Extrusion 3D Printing : How to Measure It and Why It Matters ? [S. l.], 2023.

HO, Tzu Chuan; CHANG, Chin Chuan; CHAN, Hung Pin; CHUNG, Tze Wen; SHU, Chih Wen; CHUANG, Kuo Pin; DUH, Tsai Hui; YANG, Ming Hui; TYAN, Yu Chang. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 1–29, 2022. DOI: 10.3390/molecules27092902.

HOTRA, Oleksandra; KOVTUN, Svitlana; DEKUSHA, Oleg. Analysis of the characteristics of bimetallic and semiconductor heat flux sensors for in-situ measurements of envelope element thermal resistance. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, [S. l.], v. 182, n. April, p. 109713, 2021. DOI: 10.1016/j.measurement.2021.109713. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2021.109713>.

HU, Weikang; WANG, Zijian; XIAO, Yu; ZHANG, Shengmin; WANG, Jianglin. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. **Biomaterials Science**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 843–855, 2019. DOI: 10.1039/c8bm01246f.

HUANG, Shanghui et al. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. **Bioengineering and Translational Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 1–30, 2022. DOI:

10.1002/btm2.10315.

HUIYUAN LUO, FUPING DONG , QIAN WANG, Yihang Li and Yuzhu Xiong. Construction of Porous Starch-Based Hydrogel via Regulating the Ratio of Amylopectin/Amylose for Enhanced Water-Retention. **Molecules**, [S. l.], v. 26, p. 12, 2021.

HUZUM, Bogdan; PUHA, Bogdan; NECOARA, Riana; GHEORGHEVICI, Stefan; PUHA, Gabriela; FILIP, Alexandru; SIRBU, Paul; ALEXA, Ovidiu. Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 1–9, 2021. DOI: 10.3892/etm.2021.10750.

ILIĆ-STOJANOVIĆ, Snežana; NIKOLIĆ, Ljubiša; CAKIĆ, Suzana. A Review of Patents and Innovative Biopolymer-Based Hydrogels. **Gels**, [S. l.], v. 9, n. 7, 2023. DOI: 10.3390/gels9070556.

ISMAIL, Hamisah; MOHAMAD, Hasmaliza. Bioactivity and biocompatibility properties of sustainable wollastonite bioceramics from rice husk ash/rice straw ash: A review. **Materials**, [S. l.], v. 14, n. 18, 2021. DOI: 10.3390/ma14185193.

JACOB, Joby; HAPONIUK, Józef T.; THOMAS, Sabu; GOPI, Sreeraj. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. **Materials Today Chemistry**, [S. l.], v. 9, p. 43–55, 2018. DOI: 10.1016/j.mtchem.2018.05.002.

JACOB, Shery; NAIR, Anroop B.; SHAH, Jigar; SREEHARSHA, Nagaraja; GUPTA, Sumeet; SHINU, Pottathil. Emerging role of hydrogels in drug delivery systems, tissue engineering and wound management. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 3, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13030357.

JAVAID, Mohd; HALEEM, Abid; KHAN, Ibrahim Haleem; SUMAN, Rajiv. Understanding the potential applications of Artificial Intelligence in Agriculture Sector. **Advanced Agrochem**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 15–30, 2023. DOI: 10.1016/j.aac.2022.10.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aac.2022.10.001>.

JAYACHANDRAN, Brindha; PARVIN, Thansila N.; ALAM, M. Mujahid; CHANDA, Kaushik; MM, Balamurali. Insights on Chemical Crosslinking Strategies for Proteins. **Molecules**, [S. l.], v. 27, n. 23, 2022. DOI: 10.3390/molecules27238124.

JAYAKUMAR, Anjali; JOSE, Vishal K.; LEE, Jong Min. Hydrogels for Medical and Environmental Applications. **Small Methods**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 1–19, 2020. DOI: 10.1002/smt.201900735.

JEENCHAM, Rachasit; TAWONSAWATRUKE, Tulyapruet; NUMPAISAL, Piya On; RUKSAKULPIWAT, Yupaporn. Reinforcement of Injectable Hydrogel for Meniscus Tissue Engineering by Using Cellulose Nanofiber from Cassava Pulp. **Polymers**, [S. l.], v. 15, n. 9, 2023. DOI: 10.3390/polym15092092.

JEONG, Hyunja. Feasibility Study of Google's Teachable Machine in Diagnosis of Tooth-Marked Tongue. **Journal of Dental Hygiene Science**, [S. l.], v. 20, n. 4, p.

206–212, 2020. DOI: 10.17135/jdhs.2020.20.4.206.

Jl, Donghwan; IM, Pilseon; SHIN, Sunmi; KIM, Jaeyun. Specimen Geometry Effect on Experimental Tensile Mechanical Properties of Tough Hydrogels. **Materials**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 785, 2023. DOI: 10.3390/ma16020785.

JIAO, Tian; LIAN, Qin; ZHAO, Tingze; WANG, Huichao; LI, Dichen. Preparation, Mechanical and Biological Properties of Inkjet Printed Alginate/Gelatin Hydrogel. **Journal of Bionic Engineering**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 574–583, 2021. DOI: 10.1007/s42235-021-0036-9.

JIN HO LEE; WON GON KIM; SUNG SOO KIM; JU HIE LEE; HAI BANG LEE. Development and characterization of an alginate-impregnated polyester vascular graft. **Journal of Biomedical Materials Research**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 200–208, 1997. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199708)36:2<200::AID-JBM8>3.0.CO;2-O.

JOSHI, Jnanada; HOMBURG, Sarah Vanessa; EHRMANN, Andrea. Atomic Force Microscopy (AFM) on Biopolymers and Hydrogels for Biotechnological Applications—Possibilities and Limits. **Polymers**, [S. l.], v. 14, n. 6, 2022. DOI: 10.3390/polym14061267.

KAHL, Melanie; GERTIG, Markus; HOYER, Phillipp; FRIEDRICH, Oliver; GILBERT, Daniel F. Ultra-low-cost 3D bioprinting: Modification and application of an off-the-shelf desktop 3D-printer for biofabrication. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 7, n. JUL, p. 1–12, 2019. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00184.

KALIARAJ, Gobi Saravanan; SHANMUGAM, Dilip Kumar; DASAN, Arish; MOSAS, Kamalan Kirubakaran Amirtharaj. Hydrogels—A Promising Materials for 3D Printing Technology. **Gels**, [S. l.], v. 9, n. 3, 2023. DOI: 10.3390/gels9030260.

KALRA, Anubha; LOWE, Andrew. An Overview of Factors Affecting the Skin's Young's Modulus. **Journal of Aging Science**, [S. l.], v. 4, n. 2, 2016. DOI: 10.4172/2329-8847.1000156.

KAPUSTA, Oliwia; JAROSZ, Anna; STADNIK, Katarzyna; GIANNAKOUDAKIS, Dimitrios A.; BARCZYŃSKI, Bartłomiej; BARCZAK, Mariusz. Antimicrobial Natural Hydrogels in Biomedicine: Properties, Applications, and Challenges—A Concise Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 24, n. 3, 2023. DOI: 10.3390/ijms24032191.

KARIMAH, Azizatul; RIDHO, Muhammad Rasyidur; MUNAWAR, Sasa Sofyan; ADI, Danang Sudarwoko; ISMADI; DAMAYANTI, Ratih; SUBIYANTO, Bambang; FATRIASARI, Widya; FUDHOLI, Ahmad. A review on natural fibers for development of eco-friendly bio-composite: characteristics, and utilizations. **Journal of Materials Research and Technology**, [S. l.], v. 13, p. 2442–2458, 2021. DOI: 10.1016/j.jmrt.2021.06.014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.06.014>.

KARIMI, A.; SHOJAEI, A. Measurement of the Mechanical Properties of the Human Kidney. **Irbm**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 292–297, 2017. DOI: 10.1016/j.irbm.2017.08.001. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.irbm.2017.08.001>.

KAROYO, Abdalla H.; WILSON, Lee D. A review on the design and hydration properties of natural polymer-based hydrogels. **Materials**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 1–36, 2021. DOI: 10.3390/ma14051095.

KASAAI, Mohammad R. Molecular Weight Distribution for Biopolymers: A Review. **Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 39–44, 2018. DOI: 10.12691/jpbpc-6-1-5. Disponível em: <http://pubs.sciepub.com/jpbpc/6/1/5/>.

KHODADADI YAZDI, Mohsen et al. Agarose-based biomaterials for advanced drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 326, n. April, p. 523–543, 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.028. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.028>.

KONOP, Marek; RYBKA, Mateusz; DRAPAŁA, Adrian. Keratin biomaterials in skin wound healing, an old player in modern medicine: A mini review. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 13, n. 12, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13122029.

KOPAČ, Tilen; RUČIGAJ, Aleš; KRAJNC, Matjaž. The mutual effect of the crosslinker and biopolymer concentration on the desired hydrogel properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 159, p. 557–569, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.088.

KOSTENKO, Anastassia; CONNON, Che J.; SWIOKLO, Stephen. Storable Cell-Laden Alginate Based Bioinks for 3D Biofabrication. **Bioengineering**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2023. DOI: 10.3390/bioengineering10010023.

KUMAR GUPTA, Girish; DE, Sudipta; FRANCO, Ana; BALU, Alina Mariana; LUQUE, Rafael. Sustainable Biomaterials: Current Trends, Challenges and Applications. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. E48, 2015. DOI: 10.3390/molecules21010048.

KWILAS, Anna R.; DONAHUE, Renne N.; TSANG, Kwong Y.; HODGE, James W. Extracellular matrix-derived biomaterials in engineering cell function. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1–17, 2015. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2019.107421.Extracellular.

LE, Ngoc Nhi T.; ZORN, Stefan; SCHMITT, Samantha K.; GOPALAN, Padma; MURPHY, William L. Hydrogel arrays formed via differential wettability patterning enable combinatorial screening of stem cell behavior. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 34, p. 93–103, 2016. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.09.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.09.019>.

LEE, Donghee; ZHANG, Haipeng; RYU, Sangjin. Elastic Modulus Measurement of Hydrogels. [S. l.], p. 865–884, 2019. DOI: 10.1007/978-3-319-77830-3_60.

LEE, Dongkyoung; PATHAK, Shiva; JEONG, Jee Heon. Design and manufacture of 3D cell culture plate for mass production of cell-spheroids. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-50186-0. Disponível

em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-50186-0>.

LEE, Kuen Yong; MOONEY, David J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 106–126, 2012. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.

LEHMANN, Ruth et al. Human organoids: A new dimension in cell biology. **Molecular Biology of the Cell**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1129–1137, 2019. DOI: 10.1091/mbc.E19-03-0135.

LEWIS, Jamal S. Materials that harness and modulate the immune system. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 176, n. 5, p. 139–148, 2018. DOI: 10.4049/jimmunol.1801473.The.

LI, Huijun; TAN, Cavin; LI, Lin. Review of 3D printable hydrogels and constructs. **Materials and Design**, [S. l.], v. 159, p. 20–38, 2018. DOI: 10.1016/j.matdes.2018.08.023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.08.023>.

LI, Jianghua; CAI, Chao; LI, Jiarui; LI, Jun; LI, Jia; SUN, Tiantian; WANG, Lihao; WU, Haotian; YU, Guangli. Chitosan-based nanomaterials for drug delivery. **Molecules**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 1–26, 2018. a. DOI: 10.3390/molecules23102661.

LI, Jianyu; MOONEY, David J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. **Nature Reviews Materials**, [S. l.], v. 1, n. 12, p. 1–18, 2016. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.71. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.

LI, Jinhua; WU, Chengtie; CHU, Paul K.; GELINSKY, Michael. 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications. **Materials Science and Engineering R: Reports**, [S. l.], v. 140, n. January, p. 100543, 2020. a. DOI: 10.1016/j.mser.2020.100543. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mser.2020.100543>.

LI, Na; GUO, Rui; ZHANG, Zhenyu Jason. Bioink Formulations for Bone Tissue Regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 9, n. February, p. 1–17, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.630488.

LI, Xiaomeng; SUN, Qingqing; LI, Qian; KAWAZOE, Naoki; CHEN, Guoping. Functional hydrogels with tunable structures and properties for tissue engineering applications. **Frontiers in Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. OCT, p. 1–20, 2018. b. DOI: 10.3389/fchem.2018.00499.

LI, Yanli et al. A tough chitosan-alginate porous hydrogel prepared by simple foaming method. **Journal of Solid State Chemistry**, [S. l.], v. 294, n. October 2020, p. 121797, 2021. DOI: 10.1016/j.jssc.2020.121797. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2020.121797>.

LI, Yunfeng; KUMACHEVA, Eugenia. **APPLIED SCIENCES AND ENGINEERING** Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and

drug screening. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://advances.sciencemag.org/>.

LI, Zhanzhao et al. Fresh and hardened properties of extrusion-based 3D-printed cementitious materials: A review. **Sustainability (Switzerland)**, [S. l.], v. 12, n. 14, p. 1–33, 2020. b. DOI: 10.3390/su12145628.

LI, Zili; LIN, Zhiquan. Recent advances in polysaccharide-based hydrogels for synthesis and applications. **Aggregate**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 1–26, 2021. DOI: 10.1002/agt2.21.

LIN, Chengxiong; WANG, Yaocheng; HUANG, Zhengyu; WU, Tingting; XU, Weikang; WU, Wenming; XU, Zhibiao. Advances in Filament Structure of 3D Bioprinted Biodegradable Bone Repair Scaffolds. **International Journal of Bioprinting**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 43–64, 2021. DOI: 10.18063/IJB.V7I4.426.

LIU, Shuai et al. Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications. **Military Medical Research**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–30, 2023. DOI: 10.1186/s40779-023-00448-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40779-023-00448-w>.

LIU, Yuxin et al. Soft and elastic hydrogel-based microelectronics for localized low-voltage neuromodulation. **Nature Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 58–68, 2019. DOI: 10.1038/s41551-018-0335-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41551-018-0335-6>.

LOO, Siew Leng; VÁSQUEZ, Lía; ATHANASSIOU, Athanassia; FRAGOULI, Despina. Polymeric Hydrogels—A Promising Platform in Enhancing Water Security for a Sustainable Future. **Advanced Materials Interfaces**, [S. l.], v. 8, n. 24, 2021. DOI: 10.1002/admi.202100580.

LOUREIRO, Joana Angélica; PEREIRA, Maria Carmo. PLGA based drug carrier and pharmaceutical applications: The most recent advances. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 9, p. 1–5, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090903.

LOUREIRO, Jorge; MIGUEL, S. P.; GALV, Victor; PATROCINIO, David; PAGADOR, Blas; FRANCISCO, M. S.; RIBEIRO, Maximiano P.; COUTINHO, Paula. Three-Dimensionally Printed Hydrogel Cardiac Patch for Infarct Regeneration Based on Natural Polysaccharides. [S. l.], 2023.

LU, Liyan; YUAN, Shiliang; WANG, Jing; SHEN, Yun; DENG, Shuwen; XIE, Luyang; YANG, Qixiang. The Formation Mechanism of Hydrogels. **Current Stem Cell Research & Therapy**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 490–496, 2017. DOI: 10.2174/1574888x12666170612102706.

LUNDAHL, Meri J.; CUNHA, A. Gisela; ROJO, Ester; PAPAGEORGIOU, Anastassios C.; RAUTKARI, Lauri; ARBOLEDA, Julio C.; ROJAS, Orlando J. Strength and Water Interactions of Cellulose i Filaments Wet-Spun from Cellulose Nanofibril Hydrogels. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. June, p. 1–13, 2016. DOI: 10.1038/srep30695.

LUTZWEILER, Gaëtan; HALILI, Albana Ndreu; VRANA, Nihal Engin. The overview of porous, bioactive scaffolds as instructive biomaterials for tissue regeneration and their clinical translation. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 1–29, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12070602.

LYNCH, Courtney R.; KONDIH, Pierre P. D.; CHOONARA, Yahya E. Advanced strategies for tissue engineering in regenerative medicine: A biofabrication and biopolymer perspective. **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/molecules26092518.

MAGANARIS, Constantinos N.; NARICI, Marco V. Mechanical properties of tendons. **Tendon Injuries: Basic Science and Clinical Medicine**, [S. l.], p. 14–21, 2005. DOI: 10.1007/1-84628-050-8_2.

MAHMOOD, Ayyaz; AKRAM, Tehmina; CHEN, Huafu; CHEN, Shenggui. On the Evolution of Additive Manufacturing (3D/4D Printing) Technologies: Materials, Applications, and Challenges. **Polymers**, [S. l.], v. 14, n. 21, 2022. DOI: 10.3390/polym14214698.

MAITRA, Jaya; SHUKLA, Vivek Kumar. Cross-linking in Hydrogels - A Review. **American Journal of Polymer Science**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 25–31, 2014. DOI: 10.5923/j.ajps.20140402.01.

MAJI, Somnath. Engineering Hydrogels for the Development of Three-Dimensional In Vitro Models. [S. l.], 2022.

MALEKTAJ, Haniyeh; DROZDOV, Aleksey D.; DECLAVILLE CHRISTIANSEN, Jesper. Mechanical Properties of Alginate Hydrogels Cross-Linked with Multivalent Cations. **Polymers**, [S. l.], v. 15, n. 14, 2023. DOI: 10.3390/polym15143012.

MANCHA SÁNCHEZ, Enrique et al. Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. August, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00776.

MANSOR, M. R.; NURFAIZEY, A. H.; TAMALDIN, N.; NORDIN, M. N. A. **Natural fiber polymer composites: Utilization in aerospace engineering**. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2019. DOI: 10.1016/B978-0-08-102426-3.00011-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-102426-3.00011-4>.

MANSOUR, Alaa; ROMANI, Maya; ACHARYA, Anirudh Balakrishna; RAHMAN, Betul; VERRON, Elise; BADRAN, Zahi. Drug Delivery Systems in Regenerative Medicine: An Updated Review. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 1–23, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15020695.

MANTHA, Somasundar; PILLAI, Sangeeth; KHAYAMBASHI, Parisa; UPADHYAY, Akshaya; ZHANG, Yuli. Smart Hydrogels in Tissue Engineering and. **Materials**, [S. l.], v. 12, n. 3323, p. 33, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC68/>.

MARIANI, Erminia; LISIGNOLI, Gina; BORZÌ, Rosa Maria; PULSATELLI, Lia. Biomaterials: Foreign bodies or tuners for the immune response? **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 3, 2019. DOI: 10.3390/ijms20030636.

MARRELLA, Alessandra et al. Cell-laden hydrogel as a clinical-relevant 3D model for analyzing neuroblastoma growth, immunophenotype, and susceptibility to therapies. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 10, n. AUG, p. 1–15, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01876.

MARTIN, Nicholas; YOUSSEF, George. Dynamic properties of hydrogels and fiber-reinforced hydrogels. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [S. l.], v. 85, n. June, p. 194–200, 2018. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2018.06.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.06.008>.

MARTINS, Cláudia; SOUSA, Flávia; ARAÚJO, Francisca; SARMENTO, Bruno. Functionalizing PLGA and PLGA Derivatives for Drug Delivery and Tissue Regeneration Applications. **Advanced Healthcare Materials**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–24, 2018. DOI: 10.1002/adhm.201701035.

MARY, Christie Sonia; SWAMIAPPAN, Sasikumar. Sodium alginate with PEG/PEO blends as a floating drug delivery carrier - In vitro evaluation. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 435–442, 2016. DOI: 10.15171/apb.2016.056. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2016.056>.

MASAEI, Reza; ZANDSALIMI, Kavosh; TAYEBI, Lobat. Biomaterials Evaluation: Conceptual Refinements and Practical Reforms. **Therapeutic Innovation and Regulatory Science**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 120–127, 2019. DOI: 10.1177/2168479018774320.

MEHDIKHANI, Mahoor; GORBATIKH, Larissa; VERPOEST, Ignaas; LOMOV, Stepan V. Voids in fiber-reinforced polymer composites: A review on their formation, characteristics, and effects on mechanical performance. **Journal of Composite Materials**, [S. l.], v. 53, n. 12, p. 1579–1669, 2019. DOI: 10.1177/0021998318772152.

MENEZES, Gabriela M.; TEULÉ, Florence; LEWIS, Randolph V.; SILVA, Luciano P.; RECH, Elíbio L. Nanoscale investigations of synthetic spider silk fibers modified by physical and chemical processes. **Polymer Journal**, [S. l.], v. 45, n. 9, p. 997–1006, 2013. DOI: 10.1038/pj.2013.21.

MEROTTO, Elena; PAVAN, Piero G. Three-Dimensional Bioprinting of Naturally Derived Hydrogels for the Production of Biomimetic Living Tissues: Benefits and Challenges. [S. l.], 2023.

MIDHA, Vinay Kumar; DAKURI, Arjun. Spun bonding Technology and Fabric Properties: a Review. **Journal of Textile Engineering & Fashion Technology**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 126–133, 2017. DOI: 10.15406/jteft.2017.01.00023.

MIRABEDINI, Azadeh. Developing Novel Spinning Methods to Fabricate Continuous Multifunctional Fibres for A thesis submitted in the fulfilment of the. [S. l.], p. 1–235, 2017.

MIURA, Keiki; YAMADA, Norikazu; HANADA, Shuji; JUNG, Taek Kyun; ITOI, Eiji. The bone tissue compatibility of a new Ti-Nb-Sn alloy with a low Young's modulus. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 2320–2326, 2011. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.02.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2011.02.008>.

MOGHADASI, Kaveh et al. A review on biomedical implant materials and the effect of friction stir based techniques on their mechanical and tribological properties. **Journal of Materials Research and Technology**, [S. l.], v. 17, p. 1054–1121, 2022. DOI: 10.1016/j.jmrt.2022.01.050.

MOYSIDOU, Chrysanthi Maria; BARBERIO, Chiara; OWENS, Róisín Meabh. Advances in Engineering Human Tissue Models. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 8, n. January, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2020.620962.

MÜLLER, Michael; FISCH, Philipp; MOLNAR, Marc; EGGERT, Sebastian; BINELLI, Marco; MANIURA-WEBER, Katharina; ZENOBI-WONG, Marcy. Development and thorough characterization of the processing steps of an ink for 3D printing for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 108, n. November 2019, p. 110510, 2020. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110510. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110510>.

NAGHIZADEH, Ziba; KARKHANEH, Akbar; KHOJASTEH, Arash. Self-crosslinking effect of chitosan and gelatin on alginate based hydrogels: Injectable in situ forming scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, [S. l.], v. 89, n. November 2017, p. 256–264, 2018. DOI: 10.1016/j.msec.2018.04.018.

NAKANO, T. Mechanical properties of metallic biomaterials. **Metals for Biomedical Devices**, [S. l.], p. 71–98, 2010. DOI: 10.1533/9781845699246.2.71.

NASUTION, Halimatuddahlia; HARAHAH, Hamidah; DALIMUNTHE, Nisaul F.; GINTING, M. Hendra S.; JAAFAR, Mariatti; TAN, Orlando O. H.; ARUAN, Hotmauli K.; HERFANANDA, Alief L. Hydrogel and Effects of Crosslinking Agent on Cellulose-Based Hydrogels: A Review. **Gels**, [S. l.], v. 8, n. 9, 2022. DOI: 10.3390/gels8090568.

NEGUT, Irina; BITA, Bogdan; GROZA, Andreea. Polymeric Coatings and Antimicrobial Peptides as Efficient Systems for Treating Implantable Medical Devices Associated-Infections. **Polymers**, [S. l.], v. 14, n. 8, 2022. DOI: 10.3390/polym14081611.

NGO, Tuan D.; KASHANI, Alireza; IMBALZANO, Gabriele; NGUYEN, Kate T. Q.; HUI, David. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. **Composites Part B: Engineering**, [S. l.], v. 143, n. February, p. 172–196, 2018. DOI: 10.1016/j.compositesb.2018.02.012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.02.012>.

NICHIFOR, Marieta. Role of Hydrophobic Associations in Self-Healing Hydrogels Based on Amphiphilic Polysaccharides. **Polymers**, [S. l.], v. 15, n. 5, 2023. DOI: 10.3390/polym15051065.

NIE, Lei et al. Temperature responsive hydrogel for cells encapsulation based on graphene oxide reinforced poly (N- isopropylacrylamide). **Materials Today Communications**, [S. l.], v. 31, n. August 2021, p. 103697, 2022. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2022.103697. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103697>.

NIKOLOVA, Maria P.; CHAVALI, Murthy S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 4, n. October, p. 271–292, 2019. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2019.10.005.

NORAHAN, Mohammad Hadi; PEDROZA-GONZÁLEZ, Sara Cristina; SÁNCHEZ-SALAZAR, Mónica Gabriela; ÁLVAREZ, Mario Moisés; TRUJILLO DE SANTIAGO, Grissel. Structural and biological engineering of 3D hydrogels for wound healing. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 24, n. August 2022, p. 197–235, 2023. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2022.11.019.

NORMAN, Michael D. A.; FERREIRA, Silvia A.; JOWETT, Geraldine M.; BOZEC, Laurent; GENTLEMAN, Eileen. Measuring the elastic modulus of soft culture surfaces and three-dimensional hydrogels using atomic force microscopy. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 2418–2449, 2021. DOI: 10.1038/s41596-021-00495-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-021-00495-4>.

NUSS, Katja M. R.; RECHENBERG, Brigitte Von. Biocompatibility Issues with Modern Implants in Bone - A Review for Clinical Orthopedics. **The Open Orthopaedics Journal**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 66–78, 2008. DOI: 10.2174/1874325000802010066.

O'NEILL, Stephen J. K. et al. Tissue-Mimetic Supramolecular Polymer Networks for Bioelectronics. **Advanced Materials**, [S. l.], v. 35, n. 1, 2023. DOI: 10.1002/adma.202207634.

OKWUOSA, Tochukwu C.; SADIA, Muzna; ISREB, Abdullah; HABASHY, Rober; PEAK, Matthew; ALHNAN, Mohamed A. Can filaments be stored as a shelf-item for on-demand manufacturing of oral 3D printed tablets? An initial stability assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 600, n. February, p. 120442, 2021. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120442. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120442>.

OLADOSU, Yusuff; RAFII, Mohd Y.; AROLU, Fatai; CHUKWU, Samuel Chibuike; SALISU, Monsuru Adekunle; FAGBOHUN, Ifeoluwa Kayode; MUFTAUDEEN, Taoheed Kolawole; SWARAY, Senesie; HALIRU, Bello Sani. Superabsorbent Polymer Hydrogels for Sustainable Agriculture: A Review. **Horticulturae**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 1–17, 2022. DOI: 10.3390/horticulturae8070605.

OMIDIAN, Hossein; ROCCA, Jose G.; PARK, Kinam. Elastic, superporous hydrogel hybrids of polyacrylamide and sodium alginate. **Macromolecular Bioscience**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 703–710, 2006. DOI: 10.1002/mabi.200600062.

P, Pradeep; J, Edwin Raja Dhas. Characterization of Chemical and Physical Properties of Palm Fibers. **Advances in Materials Science and Engineering: An**

International Journal (MSEJ), [S. l.], v. 2, n. 4, p. 01–06, 2015. DOI: 10.5121/msej.2015.2401.

P STENVINKEL, J PAINER, RJ JOHNSON, B. Natterson-Horowitz. Biomimetics - Nature's roadmap to insights and solutions for burden of life style diseases. **Physiology & behavior**, [S. l.], v. 176, n. 5, p. 139–148, 2018. DOI: 10.4049/jimmunol.1801473.The.

P STENVINKEL, J PAINER, RJ JOHNSON, B. Natterson-Horowitz. Biomimetics - Nature's roadmap to insights and solutions for burden of life style diseases. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 156, p. 250–268, 2023. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.08.051.

PAMPLONA, Regina; GONZÁLEZ-LANA, Sandra; ROMERO, Pilar; OCHOA, Ignacio; MARTÍN-RAPÚN, Rafael; SÁNCHEZ-SOMOLINOS, Carlos. Tuning of Mechanical Properties in Photopolymerizable Gelatin-Based Hydrogels for In Vitro Cell Culture Systems. **ACS Applied Polymer Materials**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 1487–1498, 2023. DOI: 10.1021/acsapm.2c01980.

PARHI, Rabinarayan. Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: A review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 515–530, 2017. DOI: 10.15171/apb.2017.064. Disponível em: <https://doi.org/10.15171/apb.2017.064>.

PARIHAR, Arpana. 3D Printing : Advancement in Biogenerative Engineering to Combat Shortage of Organs and Bioapplicable Materials. [S. l.], p. 173–199, 2022.

PARK, Nuri; KIM, Jaeyun. Hydrogel-Based Artificial Muscles: Overview and Recent Progress. **Advanced Intelligent Systems**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 1900135, 2020. DOI: 10.1002/aisy.201900135.

PARK, Soyeon; SHOU, Wan; MAKATURA, Liane; MATUSIK, Wojciech; FU, Kun (Kelvin). 3D printing of polymer composites: Materials, processes, and applications. **Matter**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 43–76, 2022. DOI: 10.1016/j.matt.2021.10.018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matt.2021.10.018>.

PASQUI, Daniela; DE CAGNA, Milena; BARBUCCI, Rolando. Polysaccharide-based hydrogels: The key role of water in affecting mechanical properties. **Polymers**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 1517–1534, 2012. DOI: 10.3390/polym4031517.

PAUL, Sujata; DAS, Biplajit; SHARMA, Hemanta Kumar. A Review on Bio-Polymers Derived from Animal Sources with Special Reference to their Potential Applications. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 209–223, 2021. DOI: 10.22270/jddt.v11i2.4763.

PERSAUD, Alicia; MAUS, Alexander; STRAIT, Lia; ZHU, Donghui. 3D Bioprinting with Live Cells. **Engineered Regeneration**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 292–309, 2022. DOI: 10.1016/j.engreg.2022.07.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.07.002>.

PRADEEP, P.; AND EDWIN RAJA DHAS, J. Wet-spinning of Biomedical Polymers: from Single Fibers Production to Additive Manufacturing of 3D Scaffolds. **Structure and Properties of High-Performance Fibers**, [S. I.], v. 66, n. 12, p. 1075–1077, 2017.

PRASAD, Karthika et al. Metallic biomaterials: Current challenges and opportunities. **Materials**, [S. I.], v. 10, n. 8, 2017. DOI: 10.3390/ma10080884.

RAFIEI, Mehrnoosh; CHUNG, Jin Teng; CHAU, Ying. Roles of biomaterials in modulating the innate immune response in ocular therapy. **Frontiers in Drug Delivery**, [S. I.], v. 3, n. February, p. 1–27, 2023. DOI: 10.3389/fddev.2023.1077253.

RAHMAN, Mahbuba; HASAN, Mohammad Rubayet. **Synthetic Biopolymers**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1007/978-3-319-95990-0_1.

RAHMATI, Maryam; PENNISI, Cristian Pablo; BUDD, Emma; MOBASHERI, Ali; MOZAFARI, Masoud. Biomaterials for regenerative medicine: Historical perspectives and current trends. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. I.], v. 1119, p. 1–19, 2018. DOI: 10.1007/5584_2018_278.

RATNAMANI, Matangi Parimala; ZHANG, Xinping; WANG, Hongjun. A Comprehensive Assessment on the Pivotal Role of Hydrogels in Scaffold-Based Bioprinting. **Gels**, [S. I.], v. 8, n. 4, 2022. DOI: 10.3390/gels8040239.

RAZA, Faisal et al. A review on recent advances in stabilizing peptides/proteins upon fabrication in hydrogels from biodegradable polymers. **Pharmaceutics**, [S. I.], v. 10, n. 1, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10010016.

RINOLDI, Chiara et al. Tendon Tissue Engineering: Effects of Mechanical and Biochemical Stimulation on Stem Cell Alignment on Cell-Laden Hydrogel Yarns. **Advanced Healthcare Materials**, [S. I.], v. 8, n. 7, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1002/adhm.201801218.

RIZWAN, Muhammad; YAHYA, Rosiyah; HASSAN, Aziz; YAR, Muhammad; AZZAHARI, Ahmad Danial; SELVANATHAN, Vidhya; SONSUDIN, Faridah; ABOULOULA, Cheyma Naceur. pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications. **Polymers**, [S. I.], v. 9, n. 4, 2017. DOI: 10.3390/polym9040137.

ROCHA, Joana; ARAÚJO, Joana C.; FANGUEIRO, Raul; FERREIRA, Diana P. Wetspun Polymeric Fibrous Systems as Potential Scaffolds for Tendon and Ligament Repair, Healing and Regeneration. **Pharmaceutics**, [S. I.], v. 14, n. 11, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14112526.

ROUF, Saquib; MALIK, Abrar; SINGH, Navdeep; RAINA, Ankush; NAVEED, Nida; SIDDIQUI, Md Irfanul Haque; HAQ, Mir Irfan Ul. Additive manufacturing technologies: Industrial and medical applications. **Sustainable Operations and Computers**, [S. I.], v. 3, n. March, p. 258–274, 2022. DOI: 10.1016/j.susoc.2022.05.001.

ROYA ABKA-KHAJOU EI, LATIFA TOUNSI, Nasim Shahabi; PATEL, Anil Kumar; ABDELKAFI, Slim; MICHAUD, And Philippe. Structures, Properties and Applications of Alginates. **Marine Drugs**, [S. l.], v. 20, n. 364, p. 73–82, 2022.

RUBIO-VALLE, J. F.; PEREZ-PUYANA, V.; JIMÉNEZ-ROSADO, M.; GUERRERO, A.; ROMERO, A. Evaluation of smart gelatin matrices for the development of scaffolds via 3D bioprinting. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [S. l.], v. 115, n. December 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2020.104267.

S. A. BENTO, Cristiana; GASPAR, Marisa C.; COIMBRA, Patrícia; DE SOUSA, Hermínio C.; E. M. BRAGA, Mara. A review of conventional and emerging technologies for hydrogels sterilization. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 634, n. February, p. 122671, 2023. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2023.122671. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122671>.

SAHOO, Deepti Rekha; BISWAL, Trinath. Alginate and its application to tissue engineering. **SN Applied Sciences**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–19, 2021. DOI: 10.1007/s42452-020-04096-w. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04096-w>.

SALTHOUSE, Daniel; NOVAKOVIC, Katarina; HILKENS, Catharien M. U.; FERREIRA, Ana Marina. Interplay between biomaterials and the immune system: Challenges and opportunities in regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 155, p. 1–18, 2023. DOI: 10.1016/j.actbio.2022.11.003.

SAMIR, Aya; ASHOUR, Fatma H.; HAKIM, A. A. Abde.; BASSYOUNI, Mohamed. Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications. **npj Materials Degradation**, [S. l.], v. 6, n. 1, 2022. DOI: 10.1038/s41529-022-00277-7.

SANTOS, Givanildo Alves Dos. The Importance of Metallic Materials as Biomaterials. **Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine: Open Access**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 300–302, 2017. DOI: 10.15406/atroa.2017.03.00054.

SAYD, Tarek; HAMOUI, Omar El; ALIES, Bruno; GAUDIN, Karen; LESPE, Gaëtane; BATTU, Serge. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. [S. l.], 2021.

SCHWAB, Andrea; LEVATO, Riccardo; D'ESTE, Matteo; PILUSO, Susanna; EGLIN, David; MALDA, Jos. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. **Chemical Reviews**, [S. l.], v. 120, n. 19, p. 11028–11055, 2020. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00084.

SERAFIN, Aleksandra; CULEBRAS, Mario; COLLINS, Maurice N. Synthesis and evaluation of alginate, gelatin, and hyaluronic acid hybrid hydrogels for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 233, n. November 2022, p. 123438, 2023. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123438. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123438>.

SHAHZAMANI, Mahnaz; TAHERI, Somayeh; ROGHANIZAD, Ahmadreza; NASERI, Navid; DINARI, Mohammad. Preparation and characterization of hydrogel nanocomposite based on nanocellulose and acrylic acid in the presence of urea. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 147, p. 187–193, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.038. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.038>.

SHEEHY, E. J.; CUNNIFFE, G. M.; O'BRIEN, F. J. Collagen-based biomaterials for tissue regeneration and repair. **Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair**, [S. l.], p. 127–150, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-08-100803-4.00005-X.

SHINOHARA, Minoru; SABRA, Karim; GENNISSON, Jean Luc; FINK, Mathias; TANTER, Mickaél L. Real-time visualization of muscle stiffness distribution with ultrasound shear wave imaging during muscle contraction. **Muscle and Nerve**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 438–441, 2010. DOI: 10.1002/mus.21723.

SHORT, Aaron R.; CZEISLER, Catherine; STOCKER, Benjamin; COLE, Sara; OTERO, José Javier; WINTER, Jessica O. Imaging Cell–Matrix Interactions in 3D Collagen Hydrogel Culture Systems. **Macromolecular Bioscience**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1002/mabi.201600478.

SILVA, Rafael Resende Assis; MARQUES, Clara Suprani; ARRUDA, Tarsila Rodrigues; TEIXEIRA, Samiris Cocco; DE OLIVEIRA, Taíla Veloso. Biodegradation of Polymers: Stages, Measurement, Standards and Prospects. **Macromol**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 371–399, 2023. DOI: 10.3390/macromol3020023.

SKOPINSKA-WISNIEWSKA, Joanna; TUSZYNSKA, Marta; OLEWNIK-KRUSZKOWSKA, Ewa. Comparative study of gelatin hydrogels modified by various cross-linking agents. **Materials**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 1–17, 2021. DOI: 10.3390/ma14020396.

SODIUM, Modified; POLY, Alginate; BIALIK-W, Katarzyna. Impact of the Type of Crosslinking Agents on the Properties of Modified Sodium Alginate/Poly(vinyl Alcohol) Hydrogels. **Molecules**, [S. l.], v. 26, n. 8, p. 2381, 2021.

SONG, Bin; LIANG, Hongxu; SUN, Ruru; PENG, Pai; JIANG, Yun; SHE, Diao. Hydrogel synthesis based on lignin/sodium alginate and application in agriculture. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 144, p. 219–230, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.082. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.082>.

SONG, Jiyeon; GERECHT, Sharon. Hydrogels to Recapture Extracellular Matrix Cues That Regulate Vascularization. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [S. l.], n. August, p. 291–302, 2023. DOI: 10.1161/atvbaha.122.318235.

SONG, Richard; MURPHY, Maxwell; LI, Chenshuang; TING, Kang; SOO, Chia; ZHENG, Zhong. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. **Drug Design, Development and Therapy**, [S. l.], v. 12, p.

3117–3145, 2018. DOI: 10.2147/DDDT.S165440.

SOORI, Mohsen; AREZOO, Behrooz; DASTRES, Roza. Artificial intelligence, machine learning and deep learning in advanced robotics, a review. **Cognitive Robotics**, [S. l.], v. 3, n. March, p. 54–70, 2023. DOI: 10.1016/j.cogr.2023.04.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cogr.2023.04.001>.

SPICER, Christopher D. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: The importance of polymer choice. **Polymer Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 184–219, 2020. DOI: 10.1039/c9py01021a.

STOJKOV, Gorjan; NIYAZOV, Zafarjon; PICCHIONI, Francesco; BOSE, Ranjita K. Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications. **Gels**, [S. l.], v. 7, n. 4, 2021. DOI: 10.3390/gels7040255.

STOPPEL, Whitney L.; WHITE, Joseph C.; HORAVA, Sarena D.; HENRY, Anna C.; SUSAN, C.; BHATIA, Surita R.; BROOK, Stony. Terminal sterilization of alginate hydrogels: Efficacy and impact on mechanical properties. [S. l.], 2021. DOI: 10.1002/jbm.b.33070.Terminal.

SUN, Bo; ZHANG, Min; SHEN, Jing; HE, Zhibin; FATEHI, Pedram; NI, Yonghao. Applications of Cellulose-based Materials in Sustained Drug Delivery Systems. **Current Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 26, n. 14, p. 2485–2501, 2018. DOI: 10.2174/0929867324666170705143308.

SYKES, Claire. Time- and temperature-controlled transport: Supply chain challenges and solutions. **P and T**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 154–158, 2018.

SZCZĘŚNY, Grzegorz; KOPEC, Mateusz; POLITIS, Denis J.; KOWALEWSKI, Zbigniew L.; ŁAZARSKI, Adam; SZOLC, Tomasz. A Review on Biomaterials for Orthopaedic Surgery and Traumatology: From Past to Present. **Materials**, [S. l.], v. 15, n. 10, 2022. DOI: 10.3390/ma15103622.

TALIB, Sharjil; GUPTA, Sumit; CHAUDHARY, Vijay; GUPTA, Pallav; WAHID, Mohd Atif. Additive manufacturing: Materials, techniques and biomedical applications. **Materials Today: Proceedings**, [S. l.], v. 46, n. xxxx, p. 6847–6851, 2021. DOI: 10.1016/j.matpr.2021.04.438. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.438>.

TAO, Meihan et al. Sterilization and disinfection methods for decellularized matrix materials: Review, consideration and proposal. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 2927–2945, 2021. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.02.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.02.010>.

TAPPA, Karthik; JAMMALAMADAKA, Udayabhanu. Novel biomaterials used in medical 3D printing techniques. **Journal of Functional Biomaterials**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2018. DOI: 10.3390/jfb9010017.

TAYE, Mohammad Mustafa. Understanding of Machine Learning with Deep Learning : Architectures, Workflow, Applications and Future Directions. **Computers**,

[S. l.], v. 12, n. 5, 2023.

TILLEMAN, Tamara Raveh. Optimization of Incisions in Cutaneous Surgery including Mohs ' Micrographic Surgery . The validity of paradigms in skin surgery Het optimaliseren van de incisievorm bij cutane chirurgie waaronder de Mohs ' Micrografische Tamara Raveh Tilleman. [S. l.], p. 172, 2004. Disponível em: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/43550634/Analyses_of_skin_waste_during_excision_o20160309-6931-7y3r5e.pdf?response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DAnalyses_of_Skin_Waste_during_Excision_o.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-

TORRES, Fernando G.; COMMEAUX, Solene; TRONCOSO, Omar P. Starch-based biomaterials for wound-dressing applications. **Starch/Staerke**, [S. l.], v. 65, n. 7–8, p. 543–551, 2013. DOI: 10.1002/star.201200259.

TRAN, Huong D. N.; PARK, Ki Dong; CHING, Yern Chee; HUYNH, Cong; NGUYEN, Dai Hai. A comprehensive review on polymeric hydrogel and its composite: Matrices of choice for bone and cartilage tissue engineering. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [S. l.], v. 89, p. 58–82, 2020. DOI: 10.1016/j.jiec.2020.06.017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.06.017>.

TROY, Eoin; TILBURY, Maura A.; POWER, Anne Marie; WALL, J. Gerard. Nature-based biomaterials and their application in biomedicine. **Polymers**, [S. l.], v. 13, n. 19, p. 1–37, 2021. DOI: 10.3390/polym13193321.

VAIANI, Lorenzo et al. Ceramic Materials for Biomedical Applications: An Overview on Properties and Fabrication Processes. **Journal of Functional Biomaterials**, [S. l.], v. 14, n. 3, 2023. DOI: 10.3390/jfb14030146.

VASILE, Cornelia; PAMFIL, Daniela; STOLERU, Elena; BAICAN, Mihaela. New developments in medical applications of hybrid hydrogels containing natural polymers. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 7, 2020. DOI: 10.3390/molecules25071539.

VESKOVIĆ, Ana; NAKARADA, Đura; POPOVIĆ BIJEIĆ, Ana. A novel methodology for hydrogel water content determination by EPR: The basis for real-time monitoring of controlled drug release and hydrogel swelling and degradation. **Polymer Testing**, [S. l.], v. 98, 2021. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2021.107187.

VIGATA, Margaux; MEINERT, Christoph; HUTMACHER, Dietmar W.; BOCK, Nathalie. Hydrogels as drug delivery systems: A review of current characterization and evaluation techniques. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 1–45, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12121188.

VINCENT, Apolline. Study of Porosity of Gelatin-Alginate Hydrogels to Model Brain Study of Porosity of Gelatin-Alginate Hydrogels to Model Brain Matter for Studying Traumatic Brain Injuries Matter for Studying Traumatic Brain Injuries. [S. l.], 2022. Disponível em: https://opencommons.uconn.edu/srhonors_theseshttps://opencommons.uconn.edu/srhonors_theses/887.

VIRUMBRALES-MUÑOZ, Maria et al. Force spectroscopy-based simultaneous topographical and mechanical characterization to study polymer-to-polymer interactions in coated alginate microspheres. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-56547-z.

VIRYCH, Pavlo; NADTOKA, Oksana; DOROSCHUK, Volodymyr; LELYUSHOK, Sergey; CHUMACHENKO, Vasyli; BEZUGLA, Tetiana; KUTSEVOL, Nataliya. Cefuroxime-Loaded Hydrogels for Prevention and Treatment of Bacterial Contamination of Open Wounds. **International Journal of Polymer Science**, [S. l.], v. 2021, 2021. DOI: 10.1155/2021/4935642.

VOLPI, Marina; PARADISO, Alessia; COSTANTINI, Marco; ŚWIĘSZKOWSKI, Wojciech. Hydrogel-Based Fiber Biofabrication Techniques for Skeletal Muscle Tissue Engineering. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 379–405, 2022. DOI: 10.1021/acsbmaterials.1c01145.

VROMAN, Isabelle; TIGHZERT, Lan. Biodegradable polymers. **Materials**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 307–344, 2009. DOI: 10.3390/ma2020307.

VYAS, Cian; PEREIRA, Rúben; HUANG, Boyang; LIU, Fengyuan; WANG, Weiguang; BARTOLO, Paulo. Engineering the vasculature with additive manufacturing. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 2, p. 1–13, 2017. DOI: 10.1016/j.cobme.2017.05.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cobme.2017.05.008>.

WANG, Dongze; DE BOER, Gregory; NEVILLE, Anne; GHANBARZADEH, Ali. A Review on Modelling of Viscoelastic Contact Problems. **Lubricants**, [S. l.], v. 10, n. 12, 2022. a. DOI: 10.3390/lubricants10120358.

WANG, Lini; ZHANG, Hui Jie; LIU, Xueqian; LIU, Yun; ZHU, Xing; LIU, Xinhua; YOU, Xiangyu. A Physically Cross-Linked Sodium Alginate-Gelatin Hydrogel with High Mechanical Strength. **ACS Applied Polymer Materials**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 3197–3205, 2021. DOI: 10.1021/acsapm.1c00404.

WANG, Xuechuan; BAI, Zhongxue; ZHENG, Manhui; YUE, Ouyang; HOU, Mengdi; CUI, Boqiang; SU, Rongrong; WEI, Chao; LIU, Xinhua. Engineered gelatin-based conductive hydrogels for flexible wearable electronic devices: Fundamentals and recent advances. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 100451, 2022. b. DOI: 10.1016/j.jsamd.2022.100451. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2022.100451>.

WANG, Zongjie; KUMAR, Hitendra; TIAN, Zhenlin; JIN, Xian; HOLZMAN, Jonathan F.; MENARD, Frederic; KIM, Keekyoung. Visible Light Photoinitiation of Cell-Adhesive Gelatin Methacryloyl Hydrogels for Stereolithography 3D Bioprinting. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [S. l.], v. 10, n. 32, p. 26859–26869, 2018. DOI: 10.1021/acsam.8b06607.

WARBURTON, Linnea; RUBINSKY, Boris. Cryopreservation of 3D Bioprinted Scaffolds with Temperature-Controlled-Cryoprinting. **Gels**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 502, 2023. DOI: 10.3390/gels9060502.

WARREN, David S.; SUTHERLAND, Sam P. H.; KAO, Jacqueline Y.; WEAL, Geoffrey R.; MACKAY, Sean M. The preparation and simple analysis of a clay nanoparticle composite hydrogel. **Journal of Chemical Education**, [S. l.], v. 94, n. 11, p. 1772–1779, 2017. DOI: 10.1021/acs.jchemed.6b00389.

WHITEHEAD, Alexander J.; KIRKLAND, Natalie J.; ENGLER, Adam J. Atomic force microscopy for live-cell and hydrogel measurement. **Methods in Molecular Biology**, [S. l.], v. 2299, p. 217–226, 2021. DOI: 10.1007/978-1-0716-1382-5_16.

WILLIAMS, David F. Challenges With the Development of Biomaterials for Sustainable Tissue Engineering. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 7, n. May, p. 1–10, 2019. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00127.

WINDISCH, Johannes; REINHARDT, Olena; DUIN, Sarah; SCHÜTZ, Kathleen; RODRIGUEZ, Nuria Juliana Novoa; LIU, Suihong; LODE, Anja; GELINSKY, Michael. Bioinks for Space Missions: The Influence of Long-Term Storage of Alginate-Methylcellulose-Based Bioinks on Printability as well as Cell Viability and Function. **Advanced Healthcare Materials**, [S. l.], v. 2300436, p. 1–19, 2023. DOI: 10.1002/adhm.202300436.

WIRANATA, Ardi; OHSUGI, Yunosuke; MINAMINOSONO, Ayato; KUWAJIMA, Yu; MAEDA, Shingo. Electromechanical tensile test equipment for stretchable conductive materials. **HardwareX**, [S. l.], v. 11, p. e00287, 2022. DOI: 10.1016/j.ohx.2022.e00287. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2022.e00287>.

WONG, Jenny Jenn Ney; FADZLY, Nik. Development of species recognition models using Google teachable machine on shorebirds and waterbirds. **Journal of Taibah University for Science**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1096–1111, 2022. DOI: 10.1080/16583655.2022.2143627. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/16583655.2022.2143627>.

WU, H.; FAHY, W. P.; KIM, S.; KIM, H.; ZHAO, N.; PILATO, L.; KAFI, A.; BATEMAN, S.; KOO, J. H. Recent developments in polymers/polymer nanocomposites for additive manufacturing. **Progress in Materials Science**, [S. l.], v. 111, n. November 2019, 2020. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2020.100638.

XIE, Mengbo; SU, Jingjing; ZHOU, Shengxi; LI, Jingan. Application of Hydrogels as Three-Dimensional Bioprinting Ink for Tissue Engineering. [S. l.], 2023.

XING, Yanghui; ZENG, Buhui; YANG, Wang. Light responsive hydrogels for controlled drug delivery. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 10, n. December, p. 1–9, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1075670.

XU, Fei; DAWSON, Chloe; LAMB, Makenzie; MUELLER, Eva; STEFANEK, Evan. Hydrogels for Tissue Engineering: Addressing Key Design Needs Toward Clinical Translation. [S. l.], v. 10, n. May, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.849831.

YAARI, Amit; SCHILT, Yaelle; TAMBURU, Carmen; RAVIV, Uri; SHOSEYOV, Oded. Wet Spinning and Drawing of Human Recombinant Collagen. **ACS**

Biomaterials Science and Engineering, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 349–360, 2016. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.5b00461.

YANG, You et al. Wet-spinning fabrication of shear-patterned alginate hydrogel microfibers and the guidance of cell alignment. **Regenerative Biomaterials**, [S. l.], v. 4, n. 5, p. 299–307, 2017. DOI: 10.1093/rb/rbx017.

YI, Hee-Gyeong; KIM, Seon-Jin; KIM, Min-Gyun; KIM, Jangho; JEON, Jessie S.; PARK, Jinsoo. Bioprinting methods for fabricating in vitro tubular blood vessel models. **Cyborg and Bionic Systems**, [S. l.], p. 1–18, 2023. DOI: 10.34133/cbsystems.0043.

YING, Xue. An Overview of Overfitting and its Solutions. **Journal of Physics: Conference Series**, [S. l.], v. 1168, n. 2, 2019. DOI: 10.1088/1742-6596/1168/2/022022.

YOGENDRA PRASAD, P.; PRASAD, Dumpa; MALLESWARI, Naga; SHETTY, Monali N.; GUPTA, Neha. Implementation of Machine Learning Based Google Teachable Machine in Early Childhood Education. **Article in International Journal of Early Childhood Special Education**, [S. l.], v. 14, n. May, p. 2022, 2022. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/360438764>.

ZAFAR, Muhammad Sohail; AMIN, Faiza; FAREED, Muhmmad Amber; GHABBANI, Hani; RIAZ, Samiya; KHURSHID, Zohaib; KUMAR, Naresh. Biomimetic aspects of restorative dentistry biomaterials. **Biomimetics**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 1–42, 2020. DOI: 10.3390/biomimetics5030034.

ZARE, Mina; BIGHAM, Ashkan; ZARE, Mohamad; LUO, Hongrong; REZVANI GHOMI, Erfan; RAMAKRISHNA, Seeram. Phema: An overview for biomedical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 12, 2021. DOI: 10.3390/ijms22126376.

ZASZCZY, Angelika. Advances in 3D Printing for Tissue Engineering. [S. l.], 2021.

ZEMŁA, Joanna; BOBROWSKA, Justyna; KUBIAK, Andrzej; ZIELIŃSKI, Tomasz; PABIJAN, Joanna; POGODA, Katarzyna; BOBROWSKI, Piotr; LEKKA, Małgorzata. Indenting soft samples (hydrogels and cells) with cantilevers possessing various shapes of probing tip. **European Biophysics Journal**, [S. l.], v. 49, n. 6, p. 485–495, 2020. DOI: 10.1007/s00249-020-01456-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00249-020-01456-7>.

ZHANG, Hongbin; ZHANG, Fei; WU, Juan. Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze-thaw technique. **Reactive and Functional Polymers**, [S. l.], v. 73, n. 7, p. 923–928, 2013. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2012.12.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2012.12.014>.

ZHAO, Lianghui; WANG, Hongwei; FENG, Chengcheng; SONG, Fangying; DU, Xianli. Preparation and Evaluation of Starch Hydrogel/Contact Lens Composites as

Epigallocatechin Gallate Delivery Systems for Inhibition of Bacterial Adhesion. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 9, n. November, p. 1–9, 2021. a. DOI: 10.3389/fbioe.2021.759303.

ZHAO, Zhibin; WU, Jingyao; LI, Tianfu; SUN, Chuang; YAN, Ruqiang; CHEN, Xuefeng. Challenges and Opportunities of AI-Enabled Monitoring, Diagnosis & Prognosis: A Review. **Chinese Journal of Mechanical Engineering (English Edition)**, [S. l.], v. 34, n. 1, 2021. b. DOI: 10.1186/s10033-021-00570-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s10033-021-00570-7>.

ZHU, Junmin; MARCHANT, Roger E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Review of Medical Devices**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 607–626, 2011. DOI: 10.1586/erd.11.27.

ZHU, Shouan; CHEN, Pengfei; CHEN, Yang; LI, Muzhi; CHEN, Can; LU, Hongbin. 3D-Printed Extracellular Matrix/Polyethylene Glycol Diacrylate Hydrogel Incorporating the Anti-inflammatory Phytomolecule Honokiol for Regeneration of Osteochondral Defects. **American Journal of Sports Medicine**, [S. l.], v. 48, n. 11, p. 2808–2818, 2020. DOI: 10.1177/0363546520941842.

ANEXO 1 – LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DO DOUTORADO

Artigos publicados

- Araujo, Thalita Fonseca; Pereira, Tatiane Melo; Araujo Neto, Lucio Assis; Bonatto, Cínthia Caetano; Silva, Luciano Paulino. Enzymatic browning modulates properties of silver nanoparticles produced with banana peel extract. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, v., p. 225-262, 2020. Fator de Impacto: 3,543.
- Neto, Lucio Assis Araujo; Pereira, Tatiane Melo; Silva, Luciano Paulino. Magnetic nanoparticles coated with carbohydrates for 3D culture of bacteria. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 116, p. 111267, 2020. Fator de Impacto: 7,328.
- Araujo Neto, Lucio Assis; Pereira, Tatiane Melo; Silva, Luciano Paulino. Evaluation of behavior, growth, and swarming formation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in culture medium modified with silver nanoparticles. *MICROBIAL PATHOGENESIS*, v. X, p. 104480, 2020. Fator de Impacto: 3,738.

Capítulo de livro publicado

- Silva, Luciano Paulino; da Rocha Vaz, Gabriela Mendes; Pupe, Júlia Moreira; Chafran, Liana Soares; Neto, Lucio Assis Araujo; Santiago, Thaís Ribeiro; Araujo, Thalita Fonseca; Polez, Vera Lúcia Perussi. Green Nanoparticles for Biomedical and Bioengineering Applications. *Nanoparticles and their Biomedical Applications*. 0ed.: Springer Singapore, 2020, v., p. 225-262.

Livros publicados/organizados ou edições

- Silva, L. P. (Org.); Bonatto, C. C. (Org.); Vaz, G. M. (Org.); Puppe, J. (Org.); Araujo-Neto, L. A. (Org.); Pereira, T. M. (Org.). *Resumos do I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB)*. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2021. v. 1. 221p.

Organização de evento

- Silva, L. P.; Boninato, C. C.; Da Rocha Vaz, Gabriela Mendes; Pupe, Júlia Moreira; Araujo Neto, L. A.; Pereira, T. M. I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB). 2020. (Congresso).

Participação em eventos

- II Simpósio Araucária em Biologia Celular e Molecular, 2019. Apresentando o trabalho intitulado por “Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas modificadas superficialmente com carboidratos para cultivo celular de microrganismos”.
- XXIV Encontro do Talento Estudantil, apresentando o trabalho “Confecção de fibras biopoliméricas produzidas por fiação molhada para diferenciação celular”. 2019.
- Apresentação Oral em formato de palestra no Projeto BiotecMeet. Panorama Geral da Bioengenharia - UTFPR. 2020.
- I Semana Avançada – Biotecnologia/UFU. Utilização de nanopartículas produzidas por rotas verdes para o tratamento de doenças humanas. 2020.
- I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB). Confecção de fibras biopoliméricas por fiação molhada para uso em processos de diferenciação celular. 2020.
- XXV Encontro do Talento Estudantil, apresentando o trabalho “Confecção de fibras biopoliméricas produzidas por fiação molhada para diferenciação celular”. 2020.
- 2nd International Conference in Nanoscience and Nanobiotechnology (II ICONNANO). Fabrication of biopolymeric fibers by wet spinning for cell differentiation. 2021.
- II Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (II CDNB). Produção de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso de *Araucaria angustifolia*. 2021.
- III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (III CDNB). Utilização do Chemoface como software para o planejamento composto central de hidrogéis biopoliméricos. 2022.

- IV Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (III CDNB). Composição de biopolímeros e concentração de agente reticulante modulam as propriedades micro e nanomecânicas de filamentos à base de hidrogéis. 2022.

Prêmios

- 1º Lugar no concurso de painéis do XXIV Encontro do Talento Estudantil, Animal, Pós-Graduação, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (2019).
- Menção Honrosa no concurso de e-Pôsteres pelo trabalho apresentado intitulado por Produção de nanopartículas de prata utilizando extrato aquoso de *Araucaria angustifolia*, II Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (2021).
- 3º Lugar no concurso de e-Pôsteres pelo trabalho apresentado intitulado por Utilização do Chemoface como software para o planejamento composto central de hidrogéis biopoliméricos, III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (2022).

Curso

- Curso Teórico de Boas Práticas em Cultura de Células – Banco de células do Rio de Janeiro. 2019.
- Curso de Gestão de Risco. Modalidade virtual. Embrapa, Brasília. 2022

Eventos internos do Laboratório

- Reuniões semanais e Ciclo de Seminários do Laboratório de Nanobiotecnologia durante os semestres de 2019, 2020, 2021, 2022 e 2023.
- VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV e XV Simpósios do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO).