



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**FORMULAÇÃO DE BIOTINTA DE GOMA XANTANA COM PLURONIC F127
PARA PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR**

VITOR DE MATTOS

Foz do Iguaçu
2025

**FORMULAÇÃO DE BIOTINTA DE GOMA XANTANA COM PLURONIC F127
PARA PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR**

VITOR DE MATTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Universidade Federal da Integração Latino Americana – UNILA.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz
Coorientadora: Dra. Janaina de Andréa Dernowsek

Foz do Iguaçu
2025

NOME DO(S) AUTOR(ES) VITOR DE MATTOS

**FORMULAÇÃO DE BIOTINTA DE GOMA XANTANA COM PLURONIC
F127 PARA PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRAXELULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz
UNILA

Coorientadora: Dra. Janaina de Andrea Dernowsek

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Foz do Iguaçu, 18 de Dezembro de 2025.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à equipe da Quantis, nomeadamente à Janaina Dernowsek, Thais França, Lucas Guarnier, Gabriela Morais, Kamila Leichtweis e Julie Sanday, por todo o acolhimento e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal. O ambiente que vocês proporcionaram foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação. Agradeço pela paciência em compartilhar conhecimentos, pela parceria no dia a dia e por tornarem a rotina de trabalho e aprendizado mais leve e inspiradora. O senso de responsabilidade e a visão técnica que desenvolvi na Quantis não tem preço.

Agradeço aos meus pais, Lucia e Augusto, pela confiança de me deixarem ir atrás de um sonho, pela persistência de correr atrás desse sonho comigo, por contribuírem com cada palavra de conforto e por sempre estarem dispostos a considerar minhas idéias caóticas e confiarem no meu potencial. Agradeço também aos meus tios, João e Ana, pelo carinho constante e por sempre estarem presentes, oferecendo o conforto e o apoio necessários nos momentos decisivos.

Agradeço ao meu irmão Felipe, à minha irmã Carolina e à minha cunhada Carolina Rezende, por serem mais do que família, por serem amigos e confidentes. Obrigado por estarem ao meu lado, pela torcida constante e por compreenderem minhas ausências e dedicação durante este processo. O apoio de vocês foi o combustível para que eu persistisse e alcançasse esta etapa final.

Um agradecimento especial aos meus amigos Emily, Gustavo e Lopes. Vocês foram essenciais para que os desafios da graduação fossem superados com mais leveza. Agradeço pelas risadas, pelo companheirismo e por compartilharem as angústias e as alegrias desta caminhada. Ter encontrado a amizade de vocês no meio deste percurso foi um presente que levarei para a vida.

Agradeço, finalmente, à Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), por ser o espaço físico que fez com que eu atingisse todas as minhas conquistas acadêmicas. Esse espaço precisa de mais incentivos, apoios, recursos, docentes, equipamentos, funcionários, bolsas, e muitos outros aspectos para realmente atingir não só uma educação de qualidade, mas também um espaço de permanência estudantil. Apesar desses pontos, só tenho a agradecer à UNILA por me tornar um cientista, ou melhor, um biotecnologista.

“Não se pode aprender algo de uma lição sem dor; já que não se pode ganhar algo sem algum sacrifício. Mas quando essa dor é superada e a lição incorporada, o resultado é um coração infalível, de aço.”

Hiromu Arakawa

RESUMO

A bioimpressão 3D consolidou-se como uma tecnologia transformadora na medicina regenerativa, visando o desenvolvimento de substitutos biológicos funcionais. Contudo, a eficácia desta abordagem na manufatura aditiva é frequentemente restringida pelo "paradoxo da printabilidade-bioatividade", dilema que opõe a necessidade de alta viscosidade para fidelidade estrutural às condições fisiológicas ideais para a sobrevivência celular. O Pluronic F127 (PF), um copolímero tribloco anfifílico (PEO-PPO-PEO), embora amplamente utilizado por sua transição sol-gel termorreversível, exige altas concentrações para ser imprimível, resultando em um ambiente citotóxico e denso. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e otimizar uma biotinta híbrida composta por PF e Goma Xantana (GX), um heteropolissacarídeo aniônico de alto peso molecular produzido por fermentação bacteriana, de atuar como agente estabilizador, visando mitigar a toxicidade do polímero sintético através da redução de sua concentração para níveis subletais, compensada pela estabilização reológica do biopolímero natural. A metodologia abrangeu a formulação de um hidrogel híbrido (PF15% + GX6%), submetido a uma caracterização que incluiu análises reológicas, testes de printabilidade, avaliação de citocompatibilidade em fibroblastos L929 e quantificação da produção de Matriz Extracelular via coloração Picro Sirius Red. Os resultados reológicos comprovaram que a incorporação da GX atuou eficazmente como um agente de reforço estrutural, elevando a tensão de escoamento e permitindo a processabilidade de uma solução de PF que, isoladamente, seria líquida. Entretanto, os ensaios de printabilidade revelaram que, embora a extrusão fosse viável, a biotinta não apresentou boa fidelidade de forma final, ocorrendo deformações pós-deposição que indicam a necessidade de ajustes futuros na formulação para garantir a resolução geométrica. Biologicamente, a análise de viabilidade celular não demonstrou diferença estatística significativa entre a formulação híbrida e os controles, sugerindo que a alta densidade da matriz pode ter imposto barreiras difusionais aos nutrientes, limitando a atividade metabólica imediata. Apesar desses desafios, a funcionalidade da biotinta foi validada pela detecção positiva de síntese de colágeno, comprovando que o microambiente é capaz de estimular a resposta celular e a remodelação da matriz. Conclui-se que a hibridização PF/GX é uma estratégia promissora para superar a inércia biológica de materiais sintéticos, estabelecendo uma base funcional para a engenharia de tecidos, embora demande otimizações futuras focadas na estabilização da forma impressa e na suplementação nutricional para maximizar a viabilidade biológica.

Palavras-chave: Pluronic F127, Goma Xantana, Matriz Extracelular, Bioimpressão, Colágeno

RESUMEN

La bioimpresión 3D se ha consolidado como una tecnología transformadora en la medicina regenerativa, con el objetivo de desarrollar sustitutos biológicos funcionales. Sin embargo, la eficacia de este enfoque en la manufactura aditiva se ve frecuentemente restringida por la "paradoja de la imprimibilidad-bioactividad", un dilema que contrapone la necesidad de alta viscosidad para la fidelidad estructural a las condiciones fisiológicas ideales para la supervivencia celular. El Pluronic F127 (PF), un copolímero tribloque anfifílico (PEO-PPO-PEO), aunque ampliamente utilizado por su transición sol-gel termorreversible, requiere altas concentraciones para ser imprimible, resultando en un ambiente citotóxico y denso. Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar y optimizar una biotinta híbrida compuesta por PF y Goma Xantana (GX), un heteropolisacárido aniónico de alto peso molecular producido por fermentación bacteriana, capaz de actuar como agente estabilizador, buscando mitigar la toxicidad del polímero sintético mediante la reducción de su concentración a niveles subletales, compensada por la estabilización reológica del biopolímero natural. La metodología abarcó la formulación de un hidrogel híbrido (PF15% + GX6%), sometido a una caracterización que incluyó análisis reológicos, pruebas de imprimibilidad, evaluación de citocompatibilidad en fibroblastos L929 y cuantificación de la producción de Matriz Extracelular vía tinción Picro Sirius Red. Los resultados reológicos comprobaron que la incorporación de la GX actuó eficazmente como un agente de refuerzo estructural, elevando el umbral de fluencia y permitiendo la procesabilidad de una solución de PF que, aisladamente, sería líquida. Sin embargo, los ensayos de imprimibilidad revelaron que, aunque la extrusión fue viable, la biotinta no presentó buena fidelidad de forma final, ocurriendo deformaciones post-deposición que indican la necesidad de ajustes futuros en la formulación para garantizar la resolución geométrica. Biológicamente, el análisis de viabilidad celular no demostró diferencia estadística significativa entre la formulación híbrida y los controles, sugiriendo que la alta densidad de la matriz puede haber impuesto barreras difusionales a los nutrientes, limitando la actividad metabólica inmediata. A pesar de estos desafíos, la funcionalidad de la biotinta fue validada por la detección positiva de síntesis de colágeno, comprobando que el microambiente es capaz de estimular la respuesta celular y la remodelación de la matriz. Se concluye que la hibridación PF/GX es una estrategia prometedora para superar la inercia biológica de materiales sintéticos, estableciendo una base funcional para la ingeniería de tejidos, aunque demanda optimizaciones futuras centradas en la estabilización de la forma impresa y en la suplementación nutricional para maximizar la

viabilidade biológica.

Palabras clave: Pluronic F127, goma xantana, matriz extracelular, bioimpresión, colágeno

ABSTRACT

3D bioprinting has established itself as a transformative technology in regenerative medicine, aiming at the development of functional biological substitutes. However, the efficacy of this approach in additive manufacturing is often restricted by the 'printability-bioactivity paradox,' a dilemma that opposes the need for high viscosity for structural fidelity against the ideal physiological conditions for cell survival. Pluronic F127 (PF), an amphiphilic triblock copolymer (PEO-PPO-PEO), although widely used for its thermoreversible sol-gel transition, requires high concentrations to be printable, resulting in a cytotoxic and dense environment. This study aimed to develop and optimize a hybrid bioink composed of PF and Xanthan Gum (XG), a high molecular weight anionic heteropolysaccharide produced by bacterial fermentation, capable of acting as a stabilizing agent, seeking to mitigate the toxicity of the synthetic polymer by reducing its concentration to sublethal levels, compensated by the rheological stabilization of the natural biopolymer. The methodology encompassed the formulation of a hybrid hydrogel (15% PF + 6% XG), subjected to characterization that included rheological analyses, printability tests, cytocompatibility evaluation in L929 fibroblasts, and quantification of Extracellular Matrix production via Picro Sirius Red staining. Rheological results proved that the incorporation of XG effectively acted as a structural reinforcement agent, increasing yield stress and allowing the processability of a PF solution that, in isolation, would be liquid. However, printability assays revealed that, although extrusion was feasible, the bioink did not present good final shape fidelity, with post-deposition deformations indicating the need for future formulation adjustments to ensure geometric resolution. Biologically, cell viability analysis showed no statistically significant difference between the hybrid formulation and controls, suggesting that the high matrix density may have imposed diffusional barriers to nutrients, limiting immediate metabolic activity. Despite these challenges, the bioink functionality was validated by the positive detection of collagen synthesis, proving that the microenvironment is capable of stimulating cellular response and matrix remodeling. It is concluded that PF/XG hybridization is a promising strategy to overcome the biological inertia of synthetic materials, establishing a functional basis for tissue engineering, although it demands future optimizations focused on printed shape stabilization and nutritional supplementation to maximize biological viability.

Key words: Pluronic F127, Xanthan Gum, Extracellular Matrix, Bioprinting, Collagen

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação taxonômica das gomas naturais baseada na origem biológica e fontes de extração.	16
Figura 2 – Distinção conceitual entre Biotinta (<i>Bioink</i>) e Tinta de Biomaterial (<i>Biomaterial Ink</i>) segundo a Sociedade Internacional de Biofabricação.....	20
Figura 3 – Fluxograma esquemático das etapas, técnicas e aplicações clínicas da bioimpressão 3D.	21
Figura 4 – Representação esquemática das estratégias de funcionalização de polímeros: reticulação, modificação química e misturas (<i>blends</i>).	22
Figura 5 – Espectro de aplicabilidade industrial e biomédica da Goma Xantana, com ênfase em propriedades reológicas.	26
Figura 6 – Estruturas químicas dos precursores e mecanismo de formação da rede do hidrogel híbrido XG/PF-127.	27
Figura 7 – Modelo estrutural comparativo das micelas de Pluronic F127 e o mecanismo de estabilização física pela Goma Xantana.	28
Figura 8 – Classificação reológica dos fluidos: distinção entre comportamentos Newtonianos e Não-Newtonianos (Shear-thinning e Tixotropia).	30
Figura 9 – Teste do tubo invertido: avaliação qualitativa da estabilidade reológica das formulações à temperatura ambiente.	48
Figura 10 – Teste de termorresponsividade: avaliação da transição sol-gel e estabilidade física das biotintas a 37°C.....	49
Figura 11 – Avaliação da printabilidade, aspecto macroscópico dos construtos impressos e análise morfométrica da fidelidade geométrica comparada ao modelo digital.....	50
Figura 12 – Viabilidade celular relativa de fibroblastos L929 avaliada pelo ensaio de resazurina após exposição às biotintas.....	53
Figura 13 – Quantificação de colágeno total sintetizado por fibroblastos L929 nos diferentes grupos experimentais (Ensaio Sirius Red).	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Comparativo de parâmetros operacionais entre sistemas de bioimpressão (Multiheads, Estereolitografia e Microfluídica).	17
Quadro 2 – Classificação funcional, características principais e exemplos de materiais utilizados como biotintas ou tintas de biomaterial.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Definição dos Grupos Experimentais.....	58
--	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância (<i>Analysis of Variance</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
GX	Goma Xantana
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MEC	Matriz Extracelular
PBS	Tampão Fosfato-Salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PF	Pluronic F127 (Poloxamer 407)
SFB	Soro Fetal Bovino

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
LISTA DE QUADROS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. DESENVOLVIMENTO.....	15
2.2. Bioimpressão 3D e a Dinâmica da Extrusão.....	16
2.3. Ensaio 3D e Scaffolds.....	18
2.4. Biotintas: Definições e Requisitos.....	19
2.5. O Desafio do Pluronic F127 como Matriz Estrutural.....	22
2.6. Estratégias de Bioinks Híbridos e Multicomponentes.....	24
2.7. Reologia Aplicada à Bioimpressão.....	27
2.9. Aspectos Regulatórios, Éticos e Sustentabilidade.....	30
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVOS.....	33
4.1. OBJETIVOS GERAIS.....	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4.2.1. Caracterização reológica e printabilidade iniciais.....	33
4.2.2. Otimização da Formulação e Análise de Citocompatibilidade.....	33
4.2.3. Avaliação da Bioatividade Funcional.....	34
5. METODOLOGIA.....	35
5.1. Materiais.....	35
5.2. Preparo e Desenvolvimento das Formulações de Biotinta.....	35
5.3. Caracterização Reológica e Printabilidade.....	37
5.3.1. Teste do Tubo Invertido.....	38
5.3.2. Teste de Printabilidade e Fidelidade de Forma.....	38
5.4. Cultura Celular.....	39
5.5. Viabilidade e Funcionalidade Pós-Impressão (Resazurina).....	40
5.6. Quantificação de Colágeno Total (Ensaio PicroSirius Red).....	41

6. RESULTADOS.....	43
6.1. Otimização Reológica e Estabilidade Estrutural.....	43
6.2. Avaliação da Printabilidade e Fidelidade Geométrica.....	45
6.3. Viabilidade Celular e Redução de Citotoxicidade.....	47
6.4. Bioatividade Funcional e Produção de Matriz Extracelular.....	50
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
8. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

A bioimpressão 3D consolidou-se como uma tecnologia revolucionária no campo da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa, oferecendo perspectivas transformadoras para a saúde humana. Conforme destacado por Xie et al. (2023), esta abordagem tecnológica surge como uma resposta direta à escassez crítica de órgãos para transplante, onde a demanda global supera a oferta. O principal objetivo desta área é a biofabricação de substitutos biológicos funcionais, tecidos autólogos capazes de reparar ou substituir estruturas lesionadas, como pele, cartilagem e tecido ósseo, mitigando os riscos de rejeição imunológica e superando as limitações de terapias reconstrutivas convencionais.

No entanto, a translação clínica desta tecnologia enfrenta barreiras físicas e biológicas significativas, especialmente no processo de extrusão, o método mais difundido para a bioimpressão de hidrogéis. Holland (2025) argumenta que existe um descompasso entre a expectativa tecnológica e a realidade experimental, uma vez que a maioria das formulações atuais falha em reconciliar a resolução necessária para a arquitetura tecidual com a sobrevivência celular. Este impasse é tecnicamente descrito como o "paradoxo da printabilidade-bioatividade". Este dilema, elucidado por Malekpour e Chen (2022) e Zhang et al. (2023), manifesta-se na dificuldade de encontrar um único material que satisfaça requisitos opostos. De um lado, biomateriais naturais (como colágeno e alginato) oferecem um microambiente bioquimicamente rico e favorável à adesão celular, mas frequentemente resultam em hidrogéis mecânicos frágeis com baixa fidelidade de impressão e colapso estrutural. Do outro lado, biomateriais sintéticos (como o Pluronic) possuem propriedades reológicas excelentes e estabilidade mecânica para a fabricação, mas são biologicamente inertes, carecendo dos sítios de ligação necessários para a proliferação e diferenciação celular.

Para superar tais limitações, o desenvolvimento de biotintas, definidas por Groll et al. (2019) como materiais que incorporam células vivas durante o processo de biofabricação, distinguindo-se das tintas de biomaterial, que carecem de células, exige estratégias de formulação variadas e específicas. Parak et al. (2019) postula que não existe uma "biotinta ideal" única capaz de satisfazer simultaneamente todos os requisitos biológicos e físicos. Diante desta lacuna, a funcionalização através da mistura de biomateriais diversos surge como uma estratégia indispensável para expandir o intervalo teórico-técnico onde é possível obter alta fidelidade de forma sem comprometer a função celular.

Neste contexto, o Pluronic F127 (PF) destaca-se como um dos polímeros sintéticos mais explorados devido à sua transição sol-gel termorreversível e comportamento de

afinamento por cisalhamento (*shear-thinning*), facilitando a extrusão. Contudo, Datta et al. (2018) alertam que sua aplicação como matriz isolada é severamente limitada pela rápida dissolução em condições fisiológicas e pela inércia biológica. Mais criticamente, para atingir a viscosidade estrutural necessária, o PF requer altas concentrações (superiores a 20% p/v). Gao et al. (2021) revisam que, nestas concentrações, o polímero atua como um surfactante agressivo, capaz de romper membranas celulares e comprometer a viabilidade do construto, restringindo seu uso, muitas vezes, a um material de sacrifício ou "tinta fugitiva".

Para viabilizar o uso do PF como um construto 3D estrutural permanente e biocompatível, a formulação de "Biotintas Multicomponentes" apresenta-se como a abordagem mais promissora. Ashammakhi et al. (2019) defendem que a combinação de polímeros sintéticos, que oferecem adaptabilidade reológica, com polímeros naturais, que provêm biofuncionalidade, permite a criação de compósitos com propriedades inalcançáveis pelos materiais isolados. Alinhado a essa perspectiva, este trabalho propõe a incorporação da Goma Xantana (GX), um polissacarídeo microbiano de alto peso molecular, à matriz de PF.

A GX é reconhecida por seu comportamento pseudoplástico e atoxicidade. Lai et al. (2024) demonstraram que a GX exibe uma tensão de escoamento (*yield stress*) distinta e uma rápida recuperação de viscosidade, características fundamentais para proteger as células do cisalhamento durante a passagem pelo bico e garantir a fidelidade da forma imediatamente após a deposição. Entretanto, o uso isolado da GX como biotinta tem sido historicamente limitado pela dificuldade de manter a forma em meio fisiológico devido à ausência de mecanismos simples para sua reticulação.

A hipótese central deste estudo, baseando-se por Bercea et al. (2013), é que a associação destes dois materiais gera um efeito sinérgico, com as cadeias de GX interagindo fisicamente com as micelas de PF, atuando como um reforço estrutural que aumenta a elasticidade e a tensão de escoamento do sistema. Esta interação permite uma redução substancial da concentração de PF necessária para a bioimpressão, mitigando sua citotoxicidade intrínseca, ao mesmo tempo em que a formulação híbrida oferece um microambiente estável para o desenvolvimento celular.

Além da otimização física, a transição para modelos tridimensionais (3D) proporcionada por esta biotinta é imperativa para a validade biológica do construto. Jensen e Teng (2020) e Smithmyer et al. (2019) argumentam que culturas em monocamada (2D) falham em reproduzir a fisiologia tecidual, forçando uma morfologia artificial e alterando vias de sinalização. Em contrapartida, o ambiente 3D restabelece as interações célula-matriz, essenciais para que fibroblastos adotem uma morfologia fisiológica e iniciem a produção de

Matriz Extracelular (MEC), superando a inércia dos materiais sintéticos.

Portanto, o presente trabalho fundamenta-se no desenvolvimento e na otimização de uma biotinta híbrida de PF e GX. A estratégia foca na redução da concentração do componente sintético para níveis subletais, compensada pelo reforço reológico do polímero natural. Busca-se, assim, solucionar o “paradoxo da printabilidade-bioatividade”, resultando em um sistema capaz de garantir alta fidelidade de impressão, viabilidade celular superior e, fundamentalmente, induzir a síntese de colágeno, validando o material para aplicações em engenharia de tecidos moles.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. BIOMATERIAIS: DEFINIÇÃO E CLASSES

A base para qualquer aplicação em bioengenharia reside na seleção adequada da matéria-prima. A premissa básica para definir um biomaterial foi estabelecida na *Consensus Development Conference* do National Institutes of Health (NIH) em 1982, caracterizando-o como qualquer substância, seja de origem sintética ou natural, excluindo-se fármacos, que pode ser utilizada por qualquer período como parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui tecidos, órgãos ou funções do corpo. A evolução histórica dessa definição acompanhou o progresso tecnológico; se inicialmente o foco era a inércia química para evitar rejeição, atualmente a inovação busca materiais bioativos. Conforme destaca PIRES (2015), a fronteira da pesquisa reside no desenvolvimento de materiais funcionalizados capazes de promover respostas biológicas específicas em nível molecular, interagindo ativamente com o sistema hospedeiro para garantir eficácia e segurança.

Os biomateriais são tradicionalmente categorizados em três classes principais: metais, cerâmicas e polímeros, cada qual com propriedades distintas que ditam suas aplicações. Metais (como titânio e aço inoxidável) e cerâmicas (como alumina e hidroxiapatita) são valorizados por sua elevada resistência mecânica e à corrosão, sendo preferenciais para aplicações ortopédicas e odontológicas que exigem suporte de carga. No entanto, sua alta rigidez e peso específico muitas vezes resultam em baixa biocompatibilidade biomecânica com tecidos moles, além de dificuldades de processamento em geometrias complexas.

Em contrapartida, os polímeros, subdivididos em sintéticos e naturais, oferecem maior versatilidade para a engenharia de tecidos moles. Polímeros sintéticos, como o PF, destacam-se pela facilidade de processamento, reprodutibilidade e propriedades mecânicas ajustáveis, embora possam apresentar degradação rápida ou bioinércia. Já os materiais derivados biologicamente ou polímeros naturais oferecem biocompatibilidade superior e mimetismo da matriz extracelular, mas enfrentam desafios relacionados à variabilidade de lote, baixa resistência mecânica e complexidade de manipulação e características reológicas que dificultam a bioimpressão.

A compreensão da proveniência biológica dos biomateriais é determinante para a previsibilidade de seu comportamento reológico. Conforme ilustrado na **Figura 1**, os

polissacarídeos naturais distribuem-se em classes distintas, onde a origem dita as propriedades físico-químicas intrínsecas.

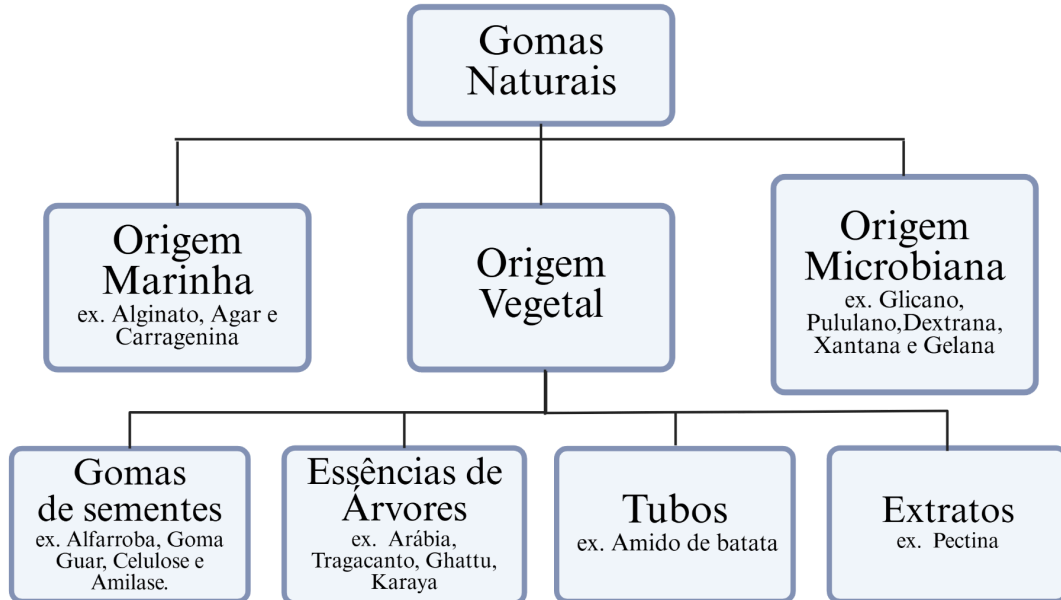


Figura 1. Sistematização dos polímeros naturais divididos em três categorias primárias segundo a fonte de obtenção: origem marinha (algas), origem vegetal e origem microbiana. A ramificação vegetal é subdividida conforme a parte anatômica da planta (sementes, exsudatos, tubérculos) ou método de isolamento. O esquema destaca a posição taxonômica da Goma Xantana como um polímero de origem microbiana, distinta das gomas extraídas de sementes ou exsudatos arbóreos. **Fonte:** Adaptado de Mohammadinejad et al. (2020).

Enquanto as gomas vegetais e marinhas dependem de extração direta e estão sujeitas à variabilidade climática e sazonal da colheita, as gomas de origem microbiana, como a GX utilizada nesta formulação híbrida, são obtidas via processos de fermentação controlada. Esta distinção taxonômica é crucial para a biofabricação, e justifica a escolha da GX nesta área, pela sua alta reprodutibilidade, pureza e independência de fatores ambientais, garantindo a padronização de lote necessária para a impressão 3D, uma vantagem técnica sobre os exsudatos arbóreos ou extratos de sementes.

A pesquisa em biomateriais é, portanto, intrinsecamente multidisciplinar, integrando princípios da química, biologia e engenharia para desenvolver sistemas híbridos que combinem as vantagens destas diferentes classes, superando suas limitações individuais.

2.2. BIOIMPRESSÃO 3D E A DINÂMICA DA EXTRUSÃO

A bioimpressão 3D consolidou-se como uma tecnologia transformadora na medicina regenerativa, capaz de endereçar a escassez crítica de órgãos para transplante ao fabricar substitutos biológicos funcionais. Dentre as técnicas disponíveis, por seu custo benefício e praticidade, a bioimpressão baseada em extrusão é a mais difundida para a deposição de hidrogéis carregados com células, permitindo a construção de arquiteturas complexas camada por camada.

A seleção da plataforma de biofabricação é determinante para o sucesso da engenharia de tecidos, exigindo um equilíbrio entre a velocidade de processamento e a versatilidade material. Conforme detalhado no **Quadro 1**, embora sistemas microfluídicos ofereçam altas velocidades de impressão e maior capacidade de combinação de materiais, os sistemas baseados em múltiplos cabeçotes (multiheads), que operam sob princípios de extrusão são particularmente vantajosos para o uso de hidrogéis que dependem de comportamento shear-thinning e gelificação física ou química.

Sistema de bioimpressão	Sistema Multicabeças	Estereolitografia	Bioimpressão
multibiotintas	(Multiheads system)	(Stereolithography)	Microfluídica
(Parâmetros)			(Microfluidic bioprinting)
Velocidade de impressão	Baixa	Baixa a média	Rápida
Métodos de gelificação	Químico, afinamento por cisalhamento (shear-thinning)	Fotoreticulação	Químico, afinamento por cisalhamento (shear-thinning)
Máximo de tipos de células (com base em relatórios atuais)	3 tipos de células	2 tipos de células	–
Máximo de tipos de materiais (com base em relatórios atuais)	3 tipos de materiais	2 tipos de materiais	7 tipos de materiais

Quadro 1. O quadro apresenta uma análise comparativa entre três tecnologias de biofabricação (sistemas de múltiplos cabeçotes, estereolitografia e bioimpressão microfluídica), destacando variáveis críticas como velocidade de impressão, mecanismos de gelificação (químico, *shear-thinning* ou fotoreticulação) e a capacidade máxima reportada de integração simultânea de tipos celulares e biomateriais. A comparação evidencia a aptidão dos sistemas de extrusão (*multiheads*) para processar materiais dependentes de afinamento por cisalhamento.

Fonte: Adaptado da referência 8 (2025).

Esta característica valida a escolha técnica deste trabalho pela bioimpressão por extrusão, uma vez que a biotinta híbrida de PF e GX foi desenvolvida especificamente para

explorar a pseudoplasticidade e a recuperação tixotrópica como mecanismos de estabilização estrutural, propriedades que são limitadas ou inaplicáveis em métodos baseados puramente em luz, como a estereolitografia.

Contudo, este processo enfrenta barreiras físicas significativas, descritas por HOLLAND (2025) como um descompasso entre o desempenho tecnológico e a realidade experimental, visto que muitas biotintas falham em reconciliar a resolução estrutural com a sobrevivência celular.

O processo de extrusão é regido pela problemática entre a pressão de dispensação e a integridade biológica. O fluxo de material através da ponteira gera um gradiente de tensão de cisalhamento (shear stress) que atinge valores máximos nas paredes da agulha. É nesta região que ocorre a maior parte do dano celular mecânico, podendo levar à ruptura da membrana ou à apoptose induzida por estresse. MALEKPOUR e CHEN (2022) descrevem este cenário como um conflito direto: a redução do diâmetro do bico para aumentar a resolução impõe um aumento exponencial no cisalhamento, prejudicando a viabilidade.

Para mitigar esse efeito sem sacrificar a precisão da impressão, é imperativo o uso de materiais que exibam um comportamento reológico específico: o afinamento por cisalhamento (shear-thinning). ASHAMMAKHI et al. (2019) explicam que biotintas com essa propriedade sofrem uma redução drástica de viscosidade sob a tensão aplicada no bico, facilitando o fluxo e protegendo as células, mas recuperam sua estrutura de gel imediatamente após a deposição. Esse mecanismo de cura reológica é o principal responsável pela manutenção da integridade celular e da fidelidade de forma em sistemas de extrusão bem-sucedidos.

2.3. ENSAIO 3D E SCAFFOLDS

A transição de modelos de cultura bidimensionais (2D) para tridimensionais (3D) é motivada pela necessidade de superar as limitações intrínsecas das placas de cultivo convencionais. JENSEN e TENG (2020) argumentam que células cultivadas em monocamadas sobre superfícies plásticas rígidas adotam uma morfologia artificialmente alongada e polarizada, recebendo uma exposição homogênea a nutrientes que não reflete os gradientes de difusão encontrados *in vivo*. Esse ambiente artificial altera o fenótipo celular e a resposta a fármacos, limitando a validade preditiva desses ensaios.

Em contraste, os sistemas 3D permitem que as células se organizem espacialmente,

restabelecendo as interações célula-célula e célula-matriz em todas as direções, essenciais para a sinalização fisiológica. SMITHMYER et al. (2019) demonstraram que a geometria de cultivo influencia diretamente a expressão gênica, por exemplo, fibroblastos em 3D apresentam uma morfologia mais quiescente e fisiológica em comparação à ativação miofibroblástica exacerbada vista em 2D. Portanto, a utilização de construtos tridimensionais, como em biotintas, é imperativa para mimetizar a arquitetura complexa dos tecidos nativos e estudar suas respostas celulares.

Dentre as técnicas de cultivo 3D baseadas em suporte (*scaffold-based*), os hidrogéis destacam-se pela capacidade única de simular a Matriz Extracelular (MEC), devido ao seu alto teor de água e estrutura porosa que permite a difusão de oxigênio e fatores solúveis. Diferentemente das técnicas *scaffold-free* (como esferóides), que dependem da autoagregação celular, os hidrogéis funcionam como um arcabouço estrutural imediato que guia a organização tecidual. A formulação híbrida proposta explora essa versatilidade, combinando a reprodutibilidade estrutural de polímeros sintéticos com a biofuncionalidade de polímeros naturais para criar um microambiente instrutivo.

2.4. BIOTINTAS: DEFINIÇÕES E REQUISITOS

Para ser processado via extrusão e atuar como um construto funcional, o material deve atender a requisitos que o qualifiquem como uma "biotinta". Em conformidade com o consenso da Sociedade Internacional de Biofabricação, apresentado por GROLL et al. (2019), existe uma distinção terminológica crucial: "tintas de biomaterial" são bioimpressas na fase acelular e semeadas posteriormente, e o produto dessa bioimpressão é um scaffold, enquanto "biotintas" (*bioinks*) são formuladas para incorporar e processar células vivas durante o ato de fabricação, e seu resultado dessa bioimpressão é classificada como construto 3D.

A correta classificação do material desenvolvido é fundamental para o rigor científico e metodológico. Conforme elucidado na **Figura 2**, existe uma demarcação clara estabelecida pela Sociedade Internacional de Biofabricação: enquanto as "tintas de biomaterial" servem apenas como arcabouços inertes para colonização posterior, as verdadeiras "biotintas" exigem a presença de células como componente integral da formulação durante o ato de extrusão.

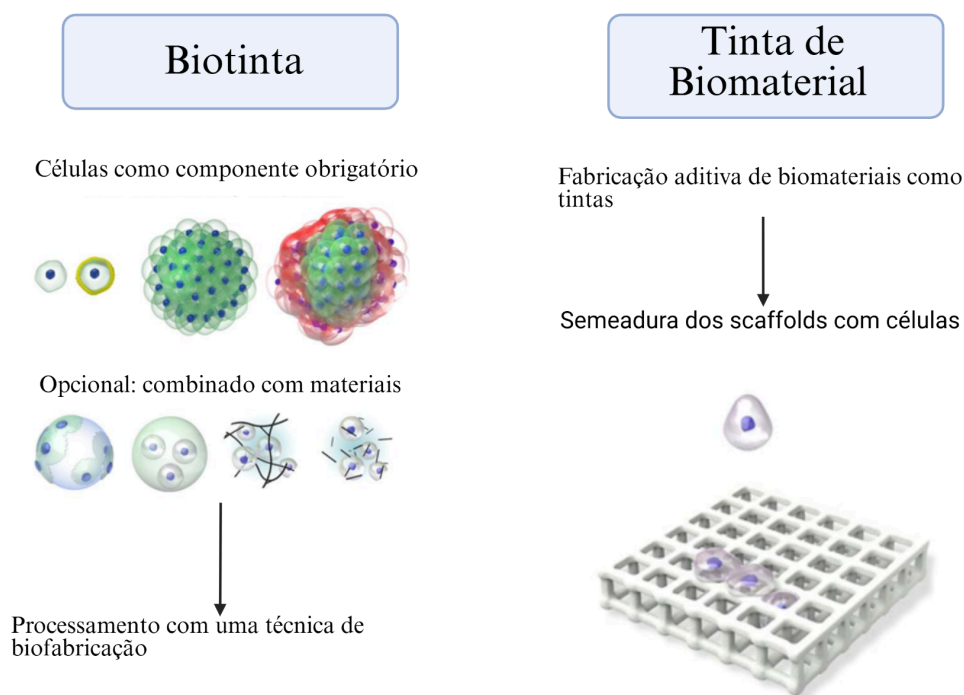


Figura 2. Representação esquemática da definição de consenso para materiais de biofabricação. À esquerda, a **Biotinta** é caracterizada pela formulação que incorpora células vivas (isoladas, revestidas ou em agregados) como componente obrigatório durante o processo de fabricação. À direita, a **Tinta de Biomaterial** refere-se a materiais processados via manufatura aditiva para formar um suporte (*scaffold*) acelular, onde o contato com as células ocorre apenas em uma etapa posterior de sementeira (*seeding*). **Fonte:** Adaptado de Groll et al. (2019) .

O sistema híbrido desenvolvido neste trabalho enquadra-se estritamente na definição de biotinta (ilustrada à esquerda do esquema), uma vez que os fibroblastos L929 foram encapsulados na matriz polimérica pré-impressão. Esta distinção implica que a formulação não deve atender apenas a critérios mecânicos de suporte, mas também garantir a sobrevivência celular frente às tensões de cisalhamento geradas durante o processamento.

A formulação deste estudo classifica-se como uma verdadeira biotinta, pois foi projetada para suportar as restrições biológicas do encapsulamento celular durante a extrusão.

O desenvolvimento de biotintas eficazes é, no entanto, limitado pelo complexo "Paradoxo da Imprimibilidade-Bioatividade". Este dilema descreve a dificuldade de harmonizar propriedades reológicas, como alta viscosidade e rigidez, necessárias para a fidelidade da forma do construto, com a funcionalidade biológica superior. Biotintas muito

rígidas exigem altas pressões de extrusão que são letais para as células, enquanto hidrogéis muito macios e favoráveis às células colapsam estruturalmente, falhando em manter a geometria projetada.

A concepção da biotinta híbrida deste trabalho fundamenta-se na premissa de PARAK et al. (2019) de que não existe uma "biotinta ideal" única, natural ou sintética, capaz de satisfazer simultaneamente todos esses requisitos conflitantes.

A consolidação da bioimpressão como ferramenta terapêutica depende da orquestração precisa entre biologia e engenharia. Conforme esquematizado na **Figura 3**, o desenvolvimento de um substituto biológico funcional constitui uma cadeia processual integrada que transcende a manufatura aditiva isolada.

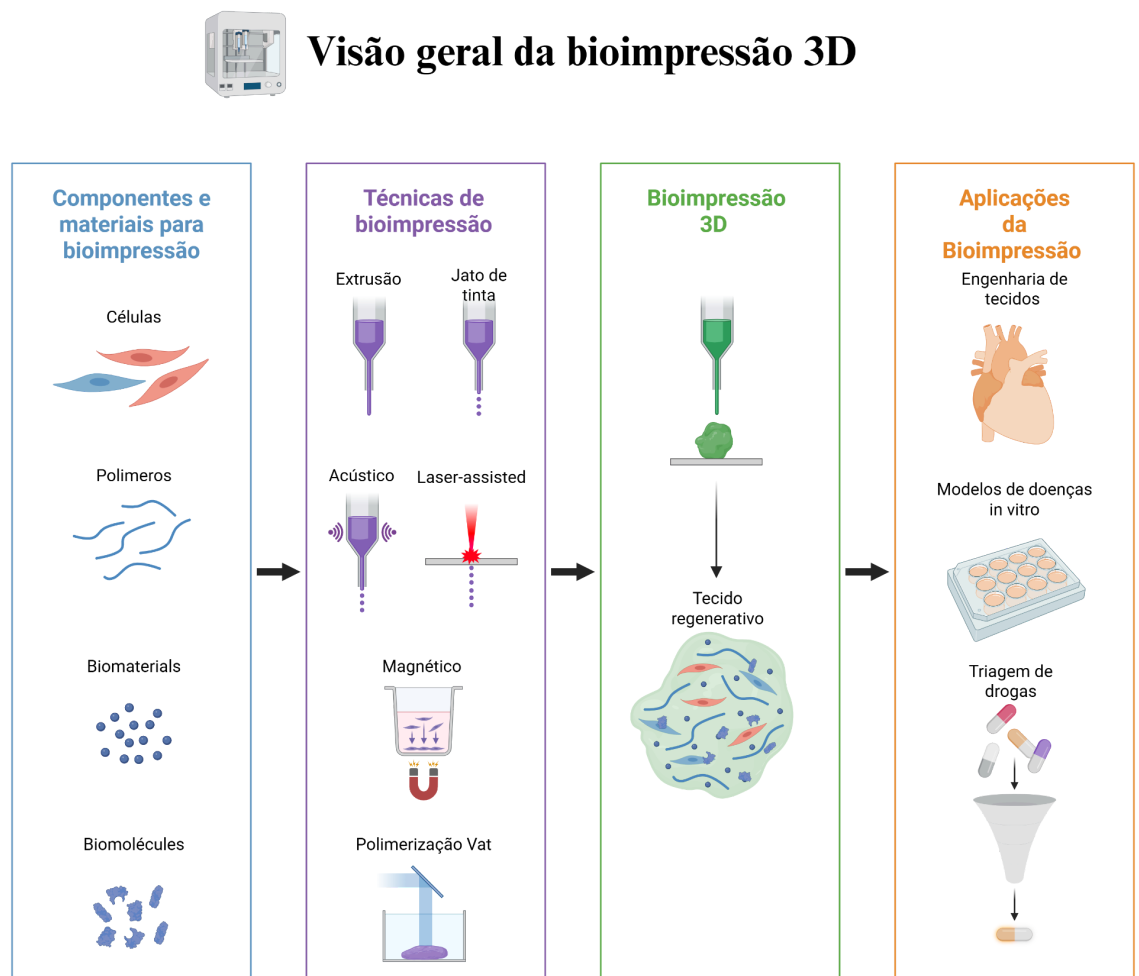


Figura 3. Representação sistêmica do fluxo de trabalho em biofabricação. O processo inicia-se com a seleção dos insumos biológicos e materiais (células, polímeros, biomoléculas), seguido pela escolha da

tecnologia de deposição (destacando-se a extrusão, *inkjet* e laser). A etapa central ilustra a bioimpressão propriamente dita, culminando nas aplicações finais: engenharia de tecidos regenerativos (como a criação de enxertos cardíacos), modelos de doenças *in vitro* e triagem de fármacos (*drug screening*). **Fonte:** Adaptado da Mathur et al. (2025).

O fluxo inicia-se na seleção rigorosa dos componentes da biotinta, células vivas e polímeros estruturais e avança através da escolha da técnica de deposição mais adequada à reologia do material. Embora o esquema ilustre diversas abordagens tecnológicas, como a impressão assistida por laser ou acústica, a técnica de extrusão destaca-se neste trabalho pela sua capacidade única de processar hidrogéis de alta densidade celular, permitindo a transição dos componentes básicos (polímeros e biomoléculas) para aplicações complexas em medicina regenerativa e engenharia de tecidos.

A estratégia de funcionalização por mistura (*blending*) torna-se essencial. A combinação de polímeros com funções distintas visa expandir as possibilidades de aplicação, criando arquétipos funcionais onde as limitações de bioatividade de um componente são compensadas pelas propriedades reológicas do outro.

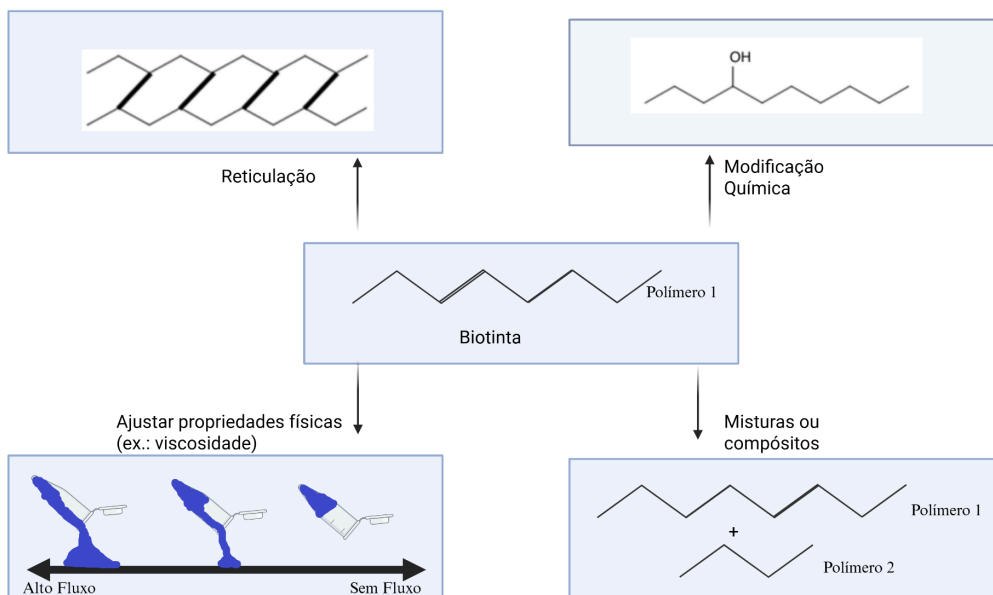


Figura 4. Resumo das abordagens metodológicas para a adaptação de biomateriais em bioimpressão. O esquema destaca quatro rotas distintas: reticulação (*crosslinking*) para estabilização de rede, modificação química para inserção de grupos funcionais, ajuste de propriedades físicas (viscosidade) e a formação de misturas ou compósitos (*blends*). A estratégia de mistura (canto inferior direito) envolve a combinação física de dois polímeros distintos para obter propriedades sinérgicas, sem necessariamente alterar a estrutura covalente

primária. **Fonte:** Adaptado de Parak et al. (2019).

A limitação dos hidrogéis puros em atender simultaneamente aos requisitos biológicos e mecânicos impulsiona a busca por métodos de aprimoramento material. A **Figura 4** sintetiza as rotas disponíveis para esta adequação, variando desde modificações químicas covalentes até ajustes físicos. Neste trabalho, a abordagem selecionada recai sobre a estratégia de "Blends ou Compósitos" (destacada no quadrante inferior direito), fundamentada na mistura física de polímeros. Ao contrário da modificação química complexa ou do uso de reticuladores tóxicos, a hibridização explora a interação intermolecular sinérgica para corrigir a reologia (viscosidade) e a bioatividade, preservando a integridade química dos componentes originais e evitando a introdução de subprodutos citotóxicos no sistema celular.

2.5. O DESAFIO DO PLURONIC F127 COMO MATRIZ ESTRUTURAL

O PF é um copolímero sintético tribloco amplamente explorado na bioimpressão devido à sua característica termossensível, apresentando uma transição sol-gel reversível que facilita a extrusão. Contudo, sua aplicação como matriz estrutural permanente enfrenta desafios críticos.

A seleção racional dos constituintes de uma biotinta deve considerar o papel funcional específico desejado para a engenharia do tecido alvo. Conforme sistematizado no Quadro 2, os biomateriais são tradicionalmente segregados em categorias distintas baseadas em sua permanência e bioatividade.

Frequentemente, o PF é citado na literatura apenas como "tinta fugitiva" ou material de sacrifício para criar canais temporários, devido à sua rápida dissolução e erosão quando submerso em meios aquosos fisiológicos.

Além da instabilidade estrutural, o PF apresenta limitações mecânicas e biológicas quando utilizado isoladamente. AYDIN (2023) classifica o PF como um material de força mecânica limitada, incapaz de suportar multicamadas sem colapso estrutural, a menos que utilizado em concentrações mais elevadas (acima de 25%). No entanto, o aumento da concentração exacerba sua citotoxicidade: conforme revisado por GAO et al. (2021), em altas concentrações (acima de 20%), o PF atua como um surfactante agressivo, podendo romper membranas celulares e comprometer severamente a viabilidade do construto.

Material	Características	Exemplos
Estrutural		• Alginato
	• Suporta adesão celular	• Gelatina
	• Mantém a fidelidade da forma durante e após a impressão	• Colagénio
	• Reticulável através de interações covalentes ou iónicas	• Quitosano
	• Resistente à dissolução sob condições de cultura celular	• Seda
Funcional		• Celulose Nanofibrilada
	• Possui grupos que se ligam reversivelmente a fatores de crescimento e morfogênicos	• Ácido Hialurónico
	• Contém fatores de crescimento ou morfogênicos ligados covalentemente ou ancorados	• GAGs (Glicosaminoglicanos)
	• Possui péptidos de adesão celular específicos ou sequências de degradação	• Heparina
	• Solúvel sob condições suaves	• Queratinas • Gelatina
Sacrificial	• Subprodutos não tóxicos	• Pluronicos
	• Mantém a fidelidade da forma até que as condições de dissolução sejam atingidas	• Alginato
	• Mecanicamente robusto	• Agarose • PCL
Não Biológico	• Resiste a cargas	• PLGA
	• Suporta estruturas mais macias	• Poliuretanos

Quadro 2. Categorização dos materiais empregados na biofabricação segundo sua função primária no construto. A tabela distingue materiais estruturais (suporte mecânico e adesão), funcionais (interação bioquímica), de sacrifício (suporte temporário removível) e não-biológicos (suporte de carga), exemplificando os

polímeros mais comuns em cada classe e suas limitações intrínsecas, como a solubilidade do Pluronic. **Fonte:** Adaptado de Williams et al. (2018).

Outro obstáculo é a bioinércia do material. DATTA et al. (2018) alertam que o PF puro impede a adesão celular natural devido à ausência de sítios de ancoragem em sua estrutura sintética. Essa característica, somada à alta densidade da rede em concentrações elevadas, dificulta a migração celular e a remodelação da matriz. Portanto, para transformar o PF de um material de sacrifício em um *scaffold* permanente funcional, a incorporação de agentes estabilizadores e bioativos torna-se uma estratégia necessária.

2.6. ESTRATÉGIAS DE BIOINKS HÍBRIDOS E MULTICOMPONENTES

Para superar as deficiências individuais dos biomateriais, a formulação de biotintas compostas (multicomponentes) consolidou-se como a estratégia predominante na biofabricação. XIE et al. (2023) destacam que essa abordagem permite combinar as características reológicas ideais de polímeros sintéticos com a biofuncionalidade de polímeros naturais. A formulação híbrida desenvolvida neste trabalho segue essa lógica, utilizando a GX para corrigir as limitações do PF.

A seleção da GX para compor a biotinta híbrida transcende seu uso convencional como espessante alimentício. Conforme ilustrado na **Figura 5**, o biopolímero ocupa hoje um nicho estratégico na Engenharia de Tecidos, distinto de suas aplicações industriais ou cosméticas.

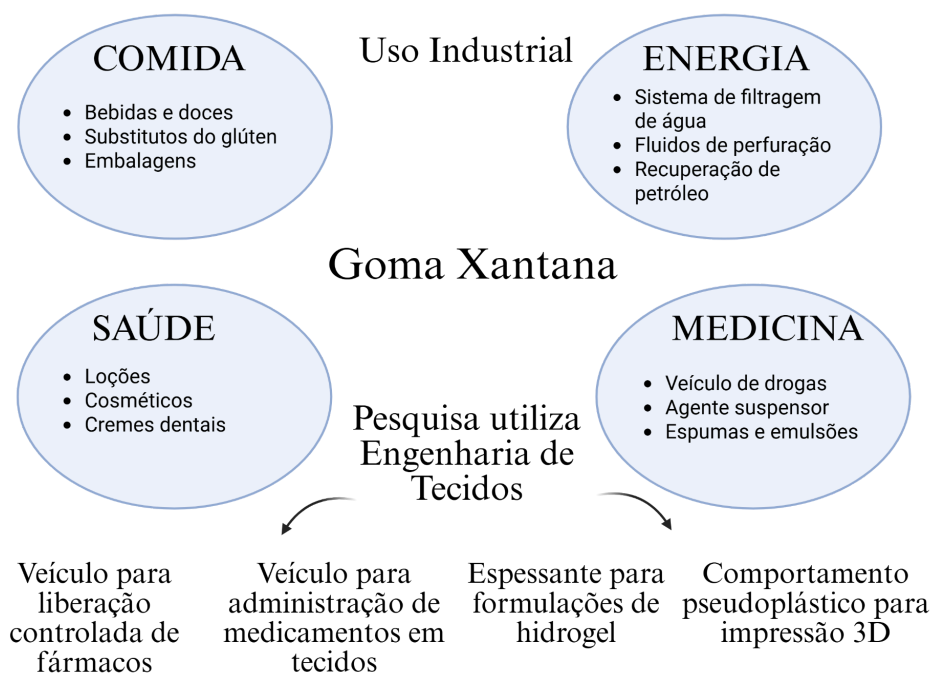


Figura 5. Diagrama esquemático das vertentes de utilização da Goma Xantana. O fluxo categoriza as aplicações desde o uso industrial tradicional (alimentício e energético) e de saúde geral (cosméticos), até as aplicações biomédicas avançadas (setas inferiores). O destaque em vermelho evidencia o reposicionamento do polímero na pesquisa atual, onde atua especificamente como espessante para hidrogéis e agente indutor de comportamento *shear-thinning* (afinamento por cisalhamento), propriedades fundamentais para a viabilização da bioimpressão 3D. **Fonte:** Mohammadinejad et al. (2020).

O diagrama evidencia que, no contexto da pesquisa biomédica, a GX é valorizada não apenas como veículo de fármacos, mas primordialmente por suas funções estruturais: atuar como "espessante para formulações de hidrogel" e conferir "comportamento *shear-thinning*". Estas duas propriedades específicas, destacadas na base da figura, que a GX é o aditivo ideal para corrigir a baixa viscosidade e a falta de sustentação do PF diluído, viabilizando a bioimpressão sem recorrer a modificações químicas sintéticas.

A estabilidade estrutural desta mistura encontra respaldo nos achados de SUHAIL et al. (2023), que elucidaram as interações em hidrogéis compósitos destes polímeros. Análises demonstram a formação de ligações de hidrogênio robustas entre os grupos hidroxila e carboxila da GX e os grupos éter do PF.

A fundamentação química para a estabilidade da biotinta reside na compatibilidade molecular entre seus constituintes, conforme detalhado na **Figura 6**.

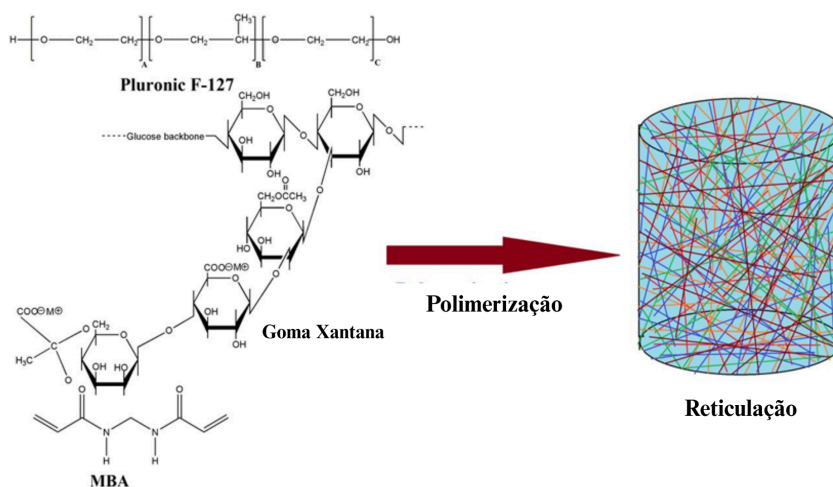


Figura 6. Ilustração das estruturas moleculares do copolímero tribloco Pluronic F127 (destacando os blocos PEO-PPO-PEO) e do polissacarídeo Goma Xantana (evidenciando a cadeia principal celulósica e cadeias laterais aniônicas). O esquema demonstra o processo de formação da rede tridimensional (*Crosslinked hydrogel*), onde a interação entre as cadeias poliméricas resulta em uma matriz densa e entrelaçada, responsável pela estabilidade estrutural do composto. **Fonte:** Adaptado de Suhail et al. (2023).

A estrutura do PF, composta por segmentos hidrofílicos (PEO) e hidrofóbicos (PPO), oferece múltiplos sítios de interação para o polissacarídeo. O esquema molecular evidencia que a GX, rica em grupos hidroxila (-OH) e carboxila (-COOH) em suas cadeias laterais, atua como um doador de prótons para a formação de ligações de hidrogênio intermoleculares com os grupos éter do PF. Conforme corroborado por Suhail et al. (2023), é essa ancoragem química secundária que somada ao emaranhamento físico das cadeias longas estabiliza as micelas sintéticas, impedindo a dissociação da rede em meio aquoso e dispensando o uso de reticuladores químicos covalentes tóxicos.

Esse mecanismo de interação química valida a hipótese de que a GX atua como um agente de reforço molecular, estabilizando as micelas do PF e conferindo maior estabilidade térmica e resistência à dissolução sem a necessidade de reticuladores químicos tóxicos.

A estabilidade reológica superior observada na biotinta híbrida não é acidental, mas resulta de uma arquitetura microestrutural específica. A **Figura 7** elucidada o mecanismo físico por trás dessa estabilização: enquanto a gelificação do PF puro (a) depende exclusivamente do empacotamento denso de micelas um equilíbrio termodinâmico suscetível à diluição ou

resfriamento, a incorporação da GX introduz um "arcabouço" secundário ao sistema.

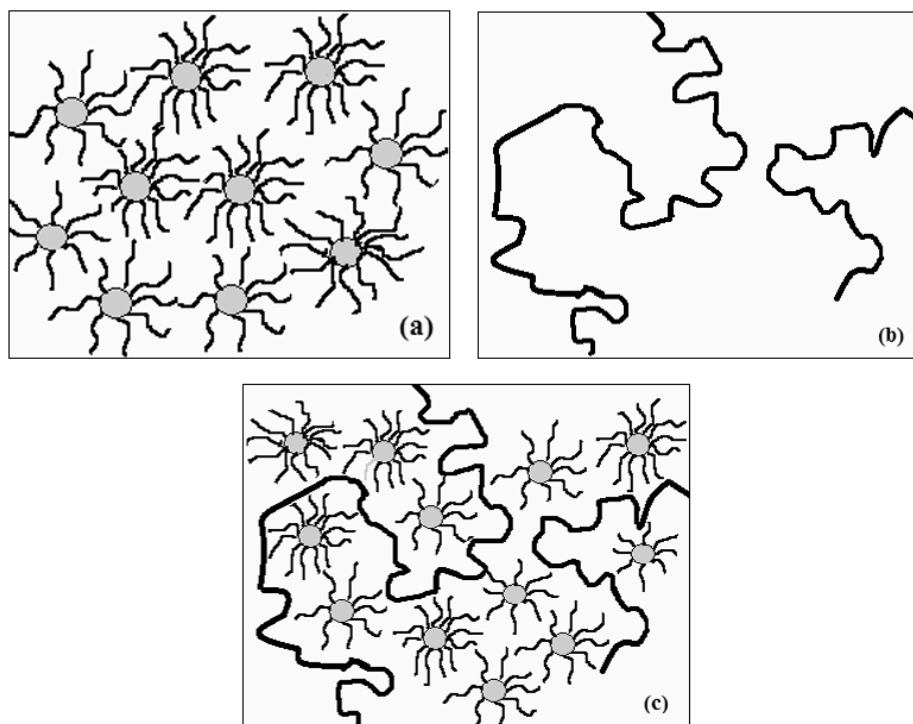


Figura 7. Modelo estrutural comparativo dos componentes da biotinta em condições fisiológicas. **(a)** O hidrogel de Pluronic F127 puro exibe um arranjo de micelas esféricas (núcleos de PPO e coroas de PEO) compactadas. **(b)** A solução de Goma Xantana apresenta cadeias poliméricas longas e dispersas. **(c)** O hidrogel híbrido (Xantana/Pluronic F127) ilustra o fenômeno de sinergia estrutural, onde as macromoléculas de xantana (linhas escuras) penetram nos espaços intersticiais e "envelopam" as micelas de Pluronic. Este arranjo cria uma barreira física que restringe a mobilidade micelar e reforça a coesão da rede. **Fonte:** Bercea et al. (2013)

Conforme demonstrado em (c), as longas cadeias rígidas do biopolímero permeiam a matriz sintética, preenchendo os vazios entre as micelas e promovendo um emaranhamento físico (*entanglement*). Este fenômeno atua como um travamento estérico que impede a dissociação rápida da rede polimérica, justificando como foi possível reduzir a concentração de PF para 15% sem causar o colapso estrutural da biotinta.

Este reforço mecânico é corroborado por estudos de BOONLAI et al. (2022) e BERCEA et al. (2013), que observaram que a incorporação de polissacarídeos de cadeia longa em matrizes de PF resulta em um aumento significativo na elasticidade e no módulo de armazenamento (G'). As cadeias de GX penetram nos espaços entre as micelas, criando um emaranhamento físico que impede a dissociação rápida da rede. Essa estratégia permite reduzir a concentração do polímero sintético para níveis não citotóxicos, mantendo a fidelidade de impressão e criando um sistema robusto capaz de suportar cultura prolongada.

2.7. REOLOGIA APLICADA À BIOIMPRESSÃO

A forma eficaz de validação da biotinta é fundamentalmente por seu comportamento reológico. A fidelidade de forma dos construtos impressos depende da existência de uma Tensão de Escoamento (*Yield Stress*). Segundo BERCEA (2023), este é o parâmetro físico crítico que impede o escoamento do material sob a ação da gravidade após a deposição. A rede estruturada pela GX eleva o *yield stress* da biotinta acima do limiar crítico, prevenindo o colapso das camadas e garantindo a resolução vertical das estruturas.

Além da sustentação, a dinâmica de fluxo é vital. A GX confere à biotinta uma rápida recuperação tixotrópica (*self-healing*) e um comportamento pseudoplástico acentuado. LAI et al. (2024) observaram que hidrogéis contendo GX recuperam cerca de 70-90% de sua viscosidade original em segundos após a interrupção do cisalhamento. Essa propriedade permite que o material flua facilmente pelo bico, protegendo as células do estresse mecânico, e recupere instantaneamente sua consistência sólida ao atingir a base de impressão, assegurando a precisão geométrica.

A estabilidade do filamento durante a deposição também é assegurada pelo controle reológico. TALLURI et al. (2022) demonstraram que um comportamento pseudoplástico excessivo, sem a contrapartida de uma consistência adequada, pode levar a instabilidades laterais como o serpenteamento (*buckling*). A adição de GX à matriz de PF desempenha a função dupla de garantir a fluidez sob tensão e fornecer a consistência necessária para evitar defeitos de deposição, mantendo o processo dentro da "zona de impressão estável" e permitindo a fabricação de construtos com alta fidelidade.

2.8. INTERAÇÃO CELULAR E PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR

A forma eficaz de validação da biotinta é fundamentalmente por seu comportamento reológico. A viabilidade da bioimpressão por extrusão depende estritamente do posicionamento reológico da biotinta dentro das categorias apresentadas na **Figura 8**.

Diferentemente de fluidos Newtonianos, cuja viscosidade é constante, as biotintas funcionais devem exibir um comportamento Não-Newtoniano complexo. O diagrama elucidado as duas características-chave incorporadas à formulação híbrida deste estudo através da adição de GX: o comportamento *Shear-thinning* (Pseudoplástico), que permite a fluidez sob a alta tensão do bico de impressão, e a Tixotropia (*Time-Dependent*), que garante a recuperação da viscosidade em repouso. A classificação visualizada justifica a necessidade de aditar o PF,

visando modular o material para que ele transite especificamente por essas ramificações reológicas que garantem a proteção celular e a fidelidade estrutural.

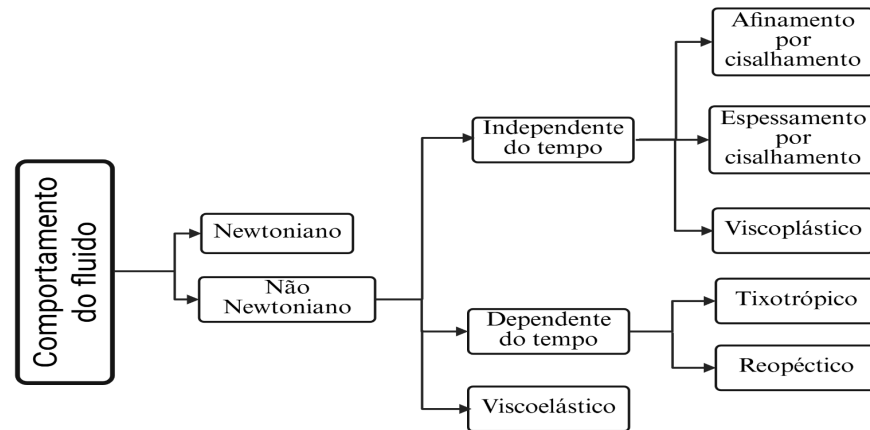


Figura 8. Organograma da mecânica dos fluidos categorizando os materiais segundo sua resposta à tensão de cisalhamento. A ramificação dos fluidos Não-Newtonianos é a de maior interesse para a bioimpressão, subdividindo-se em comportamentos Independentes do Tempo (destaque para *Shear-thinning* ou pseudoplástico) e Dependentes do Tempo (destaque para *Thixotropic* ou tixotropia). Estas duas propriedades específicas são os requisitos fundamentais para que uma biotinta seja extrudável e capaz de reter sua forma pós-deposição. **Fonte:** Adaptado de LI et al. (2020).

A compreensão aprofundada das variáveis físicas que regem o fluxo de fluidos complexos é indispensável para o desenvolvimento de biotintas funcionais. Conforme detalhado na **Tabela 2**, o sucesso da bioimpressão por extrusão depende do equilíbrio sinérgico entre parâmetros frequentemente antagônicos.

Parâmetro	Definição	Impacto na Imprimibilidade	Impacto na Viabilidade Celular
Afinamento por cisalhamento (Shear-thinning)	Viscosidade diminui sob cisalhamento	Permite a extrusão	Reduz a tensão de cisalhamento
Tensão de escoamento ()	Tensão mínima para iniciar o fluxo	Previne o entupimento do bico	Limita as forças de mistura
Razão G' / G''	Dominância elástica vs. viscosa	Integridade estrutural	Mitiga a deformação pós-impressão
Tixotropia	Recuperação da viscosidade	Previne	o Protege as células

dependente do tempo escorrimento das pós-extrusão
camadas

Quadro 2. Descrição das propriedades físicas fundamentais (afinamento por cisalhamento, tensão de escoamento, razão viscoelástica e tixotropia) exigidas para a bioimpressão baseada em extrusão. A tabela correlaciona cada variável reológica com sua função no processamento do material (como a prevenção de entupimentos e a manutenção da integridade estrutural) e seu efeito protetor sobre a carga biológica (mitigação do estresse mecânico e deformação pós-impressão). **Fonte:** Adaptado de Elango et al. (2025).

O comportamento de afinamento por cisalhamento (*shear-thinning*) é o requisito primário para permitir o fluxo através de micróbicos sob pressões moderadas, protegendo as células do estresse mecânico letal. Simultaneamente, a biotinta deve exibir uma Tensão de Escoamento (*Yield Stress*) e uma recuperação tixotrópica rápida para transitar instantaneamente do estado fluido para o estado de gel após a deposição, garantindo a fidelidade da forma sem colapso gravitacional. A formulação híbrida proposta neste trabalho (PF/GX) foi desenhada especificamente para atender a esses critérios, onde a GX atua como o agente modulador que confere a tixotropia e o *yield stress* que o PF diluído, isoladamente, não possui.

A fidelidade de forma dos construtos impressos depende da existência de uma Tensão de Escoamento (*Yield Stress*). Segundo BERCEA (2023), este é o parâmetro físico crítico que impede o escoamento do material sob a ação da gravidade após a deposição. A rede estruturada pela GX eleva o *yield stress* da biotinta acima do limiar crítico, prevenindo o colapso das camadas e garantindo a resolução vertical das estruturas.

Além da sustentação, a dinâmica de fluxo é vital. A GX confere à biotinta uma rápida recuperação tixotrópica (*self-healing*) e um comportamento pseudoplástico acentuado. LAI et al. (2024) observaram que hidrogéis contendo GX recuperam cerca de 70-90% de sua viscosidade original em segundos após a interrupção do cisalhamento. Essa propriedade permite que o material flua facilmente pelo bico, protegendo as células do estresse mecânico, e recupere instantaneamente sua consistência sólida ao atingir a base de impressão, assegurando a precisão geométrica.

A estabilidade do filamento durante a deposição também é assegurada pelo controle reológico. TALLURI et al. (2022) demonstraram que um comportamento pseudoplástico excessivo, sem a contrapartida de uma consistência módulo elástico (G'') adequado, pode

levar a instabilidades laterais como o serpenteamento (*buckling*). A adição de GX à matriz de PF desempenha a função dupla de garantir a fluidez sob tensão e fornecer a consistência necessária para evitar defeitos de deposição, mantendo o processo dentro da "zona de impressão estável" e permitindo a fabricação de construtos com alta fidelidade.

2.9. ASPECTOS REGULATÓRIOS, ÉTICOS E SUSTENTABILIDADE

O desenvolvimento de uma biotinta deve considerar não apenas a viabilidade técnica, mas também o cenário regulatório e ético da biofabricação. A opção por uma formulação que não se utilize de biomateriais de origem animal (animal-free), composta por polímero sintético (PF) e microbiano (GX), alinha-se às tendências de sustentabilidade e segurança revisadas por AN e KIM (2025). Ao evitar componentes de origem animal, como colágeno suíno ou bovino, eliminam-se riscos de transmissão de patógenos zoonóticos e contornam-se barreiras éticas e religiosas, ampliando a aceitação universal de potenciais terapias.

Do ponto de vista da translação clínica, a padronização é crítica. MATHUR et al. (2025) e RIJAL (2023) enfatizam que a variabilidade de lote inerente aos materiais naturais animais dificulta a aprovação regulatória. Em contraste, a GX, produzida por fermentação controlada, oferece alta reprodutibilidade e consistência físico-química, facilitando a validação de processos de esterilização e caracterização conforme normas internacionais como ISO e ASTM.

Além disso, a classificação jurídica do material é um ponto de atenção. BEGISHEV et al. (2024) discutem o "limbo jurídico" na definição de biotintas, se constituem dispositivos médicos, produtos biológicos ou combinados. A formulação desenvolvida neste estudo, ao integrar células a uma matriz funcional, enquadra-se na definição técnica de "bioink", o que ditará os protocolos específicos de ensaios pré-clínicos de segurança e eficácia necessários para sua futura aprovação e aplicação terapêutica.

3. JUSTIFICATIVA

A relevância deste trabalho fundamenta-se na necessidade de superar as limitações intrínsecas às biotintas baseadas exclusivamente em PF. Embora este copolímero sintético seja amplamente reconhecido por suas propriedades termoresponsivas e um comportamento inerte na viabilidade celular inicial, sua aplicação isolada como matriz estrutural permanente é retida por problemáticas substanciais. Conforme classificado por Aydin (2003), o uso do PF puro é severamente restringido por sua baixa resistência mecânica e instabilidade estrutural, o que frequentemente resulta no colapso de construtos 3D ou obriga o aumento da concentração polimérica para níveis que comprometem a função biológica.

Este cenário configura o clássico “paradoxo da printabilidade-bioatividade”. Para atingir viscosidade e a fidelidade de impressão necessárias na técnica de extrusão, biotintas de PF demandam concentrações elevadas, tipicamente superiores a 20% (p/v). No entanto, tal abordagem gera um microambiente hiperosmótico e uma rede polimérica excessivamente densa, o que dificulta a migração celular e transporte de nutrientes, resultando em citotoxicidade e necrose. A justificativa central para a adição de GX reside, portanto, na estratégia de mitigar a essa toxicidade através da redução de concentração final de PF na biotina, compensando a perda de viscosidade e estabilidade mecânica através da sinergia reológica com um polissacarídeo natural. Tal modificação é documentada como essencial para transformar hidrogéis termossensíveis instáveis em materiais robustos e processáveis sem sacrificar a viabilidade celular final.

A escolha dos materiais que compõem esta biotinta reflete um alinhamento estratégico entre a otimização de uma formulação comercial desenvolvida pelo Quantis Biotechnology, e as tendências contemporâneas de sustentabilidade e ética na biofabricação. A opção pela formulação composta exclusivamente por GX (origem microbiana) e PF (sintético) elimina a dependência de proteínas de origem animal, como gelatina suína ou bovina. Esta abordagem animal-free não apenas contorna barreiras éticas, ampliando a aceitação universal de potenciais produtos terapêuticos, mas também mitiga riscos sanitários associados à transmissão de infecções zoonóticas e variabilidade de lote. Ademais, diferentemente de outros biomateriais, como a gelatina, que frequentemente requer modificações químicas complexas (como a metacrililação) para suportar temperaturas fisiológicas, este sistema híbrido proposto aproveita a gelificação termorreversível do PF que se solidifica à temperatura corporal, oferecendo uma vantagem prática imediata para aplicações *in situ*.

Adicionalmente, a necessidade de estimular a produção de MEC justifica-se pela natureza bioinerte dos componentes bases. Tanto o PF quanto a GX carecem de motivos de adesão RGD (Arginina-Glicina-Aspartato) nativos, fundamentais para a ancoragem via integrinas. Conseqüentemente, a sobrevivência e a proliferação celular neste sistema dependem da capacidade do ambiente físico, otimizando pela porosidade e rigidez da mistura, permitindo que os fibroblastos secretam rapidamente proteínas de adesão, como colágeno.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem como objetivo geral caracterizar e otimizar o desenvolvimento de uma biotinta termossensível híbrida, formulada a partir da associação do copolímero sintético PF com o biopolímero natural GX. A estratégia central desta otimização consiste na redução crítica da concentração de PF na formulação, visando solucionar o “paradoxo da printabilidade-bioatividade” que limita a aplicação de hidrogéis sintéticos puros.

O intuito é estabelecer um sistema que alcance o desempenho reológico ideal para a bioimpressão 3D baseada em extrusão, garantindo a fidelidade estrutural mediante a estabilização conferida pela GX, sem incorrer na citotoxicidade típica de altas concentrações de polímeros. Simultaneamente, o trabalho visa maximizar a viabilidade e a proliferação celular pós-impressão, criando um microambiente que induza e intensifique a produção de MEC com ênfase específica na síntese de colágeno.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Caracterização reológica e printabilidade iniciais

Determinar os parâmetros reológicos críticos da formulação de PF/GX através de testes de tubo invertido e teste de fidelidade de printabilidade.

4.2.2. Otimização da Formulação e Análise de Citocompatibilidade

Estabelecer a concentração mínima de PF que, em sinergia com GX, mantenha as propriedades de printabilidade ideais, permitindo a extrusão sob pressões reduzidas para minimizar o estresse mecânico sobre as células. Subsequentemente, avaliar a viabilidade celular comparando a formulação híbrida otimizada (baixa concentração de PF (15% (p/v)/GX (6% (p/v))) com controles de PF (21% (p/v)) e PF (15% (p/v)). Esta avaliação será conduzida por meio de ensaios metabólicos de resazurina, visando comprovar estatisticamente a redução da citotoxicidade e preservação da integridade da membrana celular conforme as normas ISO 10993-5.

4.2.3. Avaliação da Bioatividade Funcional

Avaliar a capacidade da biotinta híbrida otimizada de atuar como um microambiente que promove a função celular e a maturação tecidual. Este objetivo foca especificamente na caracterização quantitativa da produção de MEC pelos fibroblastos encapsulados. A funcionalidade será mensurada pela detecção e quantificação da síntese de proteínas colágenas utilizando o ensaio colorimétrico *Sirius Red*, demonstrando a capacidade das células de remodelar o construto sintético e depositar MEC.

5. METODOLOGIA

5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E LOCAL DE EXECUÇÃO

O presente estudo experimental foi conduzido nas instalações laboratoriais da Quantis Biotechnology, situada no complexo empresarial da Bayer (Rua Domingos Jorge, 1100 - Vila Socorro, São Paulo - SP, CEP 04779-900). As atividades de bancada, compreendendo desde a formulação das biotintas até a bioimpressão e as análises biológicas, foram executadas durante o período compreendido entre o início de setembro e o início de dezembro de 2025. Para a realização dos ensaios, utilizou-se uma infraestrutura laboratorial de nível de biossegurança adequado para a manipulação de culturas celulares de mamíferos (NB-2), equipada com cabines de segurança biológica, incubadoras de atmosfera controlada (CO₂) e sistemas de bioimpressão.

5.2. MATERIAIS

Para a execução das etapas experimentais, foram utilizados polímeros de grau analítico: o copolímero tribloco PF (P2443-1KG, Sigma-Aldrich) e o biopolímero GX (G1253-100G). Como veículo de dissolução e para manutenção da osmolaridade, empregou-se o Tampão Fosfato Salino 1X (PBS) (13-30262-05, Nova Biotecnologia). O cultivo celular foi conduzido utilizando células L929, mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12 sem fenol), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (10BioPlus -500, Nova Biotecnologia) e antibiótico na concentração 2X.

Para as análises de resposta biológica e funcionalidade, foram empregados o reagente de resazurina para ensaios de atividade metabólica e o kit *Sirius Red* (AB246832) para a quantificação específica de colágeno.

5.3. CULTURA CELULAR

O modelo biológico empregado consistiu na linhagem de fibroblastos murinos L929, gentilmente cedida pelo Instituto Butantan. Esta linhagem é estabelecida pela norma ISO 10993-5 como padrão de referência para a avaliação de citotoxicidade *in vitro* de dispositivos médicos e biomateriais. As células foram cultivadas em meio DMEM-F12. As culturas foram mantidas em estufa umidificada a 37°C, sob atmosfera controlada contendo 5% de CO₂. O crescimento celular foi monitorado até o alcance de aproximadamente 80% de confluência,

sendo utilizadas nos ensaios experimentais exclusivamente as células compreendidas entre as passagens 16 e 17, a fim de assegurar a estabilidade fenotípica e a reprodutibilidade dos resultados.

5.4. PREPARO E DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES DE BIOTINTA

O desenvolvimento da biotinta fundamentou-se na estratégia de mistura física (blending) para a constituição de uma rede de hidrogel semi-interpenetrante, seguindo os princípios descritos por Mohammadinejad et al. (2020). Esta abordagem foi adotada com o objetivo de integrar a GX à matriz de PF, visando combinar a termogelificação reversível do componente sintético com a estabilidade bioquímica e o comportamento pseudoplástico do polímero natural. A definição das concentrações poliméricas e a divisão dos grupos experimentais, conforme detalhado na Tabela 1, foram preenchidas por uma etapa de triagem experimental, norteadas pelas limitações biológicas e mecânicas descritas pela literatura.

Tabela 1 - Definição dos Grupos Experimentais

Grupo Experimental (Sigla)	Solução Estoque (Concentração em PBS)	Solução de Trabalho (Final) (Concentração final após adição de 30% de meio suplementado/células)
1. Controle PF 21%	PF 30% (p/v)	PF 21% (p/v)
2. Controle PF 15%	PF 21% (p/v)	PF 15% (p/v)
3. Controle GX 6%	GX 9% (p/v)	GX 6% (p/v)
4. Híbrida (PF 15% + GX 6%)	PF 21% + GX 9% (p/v)	PF 15% + GX 6% (p/v)

Tabela 1 - Composição detalhada das formulações de hidrogel utilizadas. A tabela especifica as concentrações

Pf e GX em duas etapas distintas, na Solução Estoque, preparada em PBS para solubilização inicial, e na Solução de Trabalho, que representa a concentração final após a diluição volumétrica padronizada (70% de hidrogel + 30% de meio cultivo suplementado/células). Esta correção garante que os grupos atinjam as propriedades reológicas alvo (ex: PF21% e PF 15%) no momento da bioimpressão. **Fonte:** Autoria própria (2025)

Para compensar a redução de viscosidade e a perda de estabilidade mecânica decorrente da diminuição da concentração de PF, foram realizados testes preliminares de otimização reológica variando a concentração de GX. Amostras contendo 2% e 5% (p/v) de GX foram avaliadas quanto à consistência e capacidade de formação de gel. Com base na estabilidade estrutural observada nestes testes iniciais e na capacidade de reforço de rede descrita por Bercea et al (2013), estabeleceu-se a formulação do grupo Híbrido, composta por PF 15% (p/v) e GX 6% (p/v) na solução final. Esta proporção específica foi selecionada para o estudo aprofundado por apresentar o equilíbrio ideal entre a fluidez necessária para a extrusão (produção contra cisalhamento) e a retenção de forma pós-deposição (yield stress), superando as limitações de viscosidade identificadas nas concentrações inferiores dos grupos controle.

5.4.1. Preparação da Solução de Estoque

O protocolo de preparo das formulações precursoras seguiu uma ordem de solubilização para garantir a homogeneidade da rede híbrida e evitar a formação de grumos, respeitando as concentrações concentradas descritas na coluna “Solução Estoque” da Tabela 1. Inicialmente, a GX foi adicionada ao Tampão Fosfato-Salino (PBS) sob agitação vigorosa e contínua, sendo mantida nessas condições até a completa dispersão e hidratação das cadeias do biopolímero, assegurando a formação de uma base viscosa uniforme. No caso do grupo Híbrido, a GX foi preparada na mesma concentração de 9% antes da adição de PF.

Subsequentemente à total solubilização da GX e estabilização do sistema, procedeu-se à adição do PF em pó para atingir as concentrações de estoque estipuladas, sendo 30% para o controle de PF 21% e 21% para os grupos de controle PF 15% e híbrido. Considerando a característica de solubilidade inversa deste copolímero, o processo foi conduzido estritamente sob baixa temperatura (2° a 5 °C). A mistura foi submetida a ciclos alternados de agitação mecânica (10 minutos) e repouso para hidratação (10 minutos) em refrigeração, repetindo-se o procedimento até a completa dissolução do polímero e a obtenção de uma solução translúcida e homogênea.

Para assegurar o equilíbrio termodinâmico e a completa hidratação das cadeias

poliméricas na rede mista, as soluções de estoque foram submetidas a um período de maturação em refrigeração (2°C a 5°C) por no mínimo 12 horas. Previamente à manipulação para os ensaios biológicos, o material foi submetido à esterilização por autoclavação (121°C por 20 minutos), seguido por um novo período de repouso em refrigeração por 12 horas para a reestabilização das micelas.

5.4.2. Preparação da Solução de Trabalho

A etapa final de formulação consistiu na diluição controlada da base polimérica (estoque) para atingir a consistência final de trabalho e a osmolaridade fisiológica apresentadas na última coluna da Tabela 1. O protocolo estabeleceu que todas as soluções estoque fossem misturadas com meio de cultura até atingir a concentração final de trabalho descrita na tabela experimental, fixando-se uma proporção volumétrica de 70% de hidrogel precursor e 30% de fase líquida. Essa diluição padronizada garantiu que a solução estoque de PF 30% resultasse no Controle PF 21%, e que a estoque híbrida (PF 21% + GX 9%) resultasse na formulação de trabalho Híbrida (PF 15% + GX 6%).

Para os grupos experimentais acelulares (destinados aos testes reológicos), a fase líquida incorporada foi composta exclusivamente por meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), mimetizando as condições nutricionais e iônicas do ambiente celular sem a presença do componente biológico, mantendo as concentrações finais de polímero estritas conforme a Tabela 1.

No que se refere à formulação final da biotinta (grupo celular), a incorporação da fase biológica foi realizada mediante uma adaptação do protocolo de homogeneização padrão da CELLINK®. As células fibroblásticas L929 foram ressuspensas em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e transferidas para o hidrogel na solução estoque até atingir a concentração final desejada. O processo utilizou duas seringas estéreis acopladas através de um conector luer-lock fêmea-fêmea: uma contendo a suspensão celular e a outra o hidrogel precursor (previamente resfriado para garantir o estado líquido/viscoso). Foram realizados ciclos de transferência entre as seringas, permitindo a mistura mecânica suave em sistema fechado até a obtenção de uma dispersão homogênea, respeitando as proporções finais de polímeros definidas na Tabela 1.

A concentração celular final na biotinta foi estabelecida em $8 * 10^5$ células/mL. Esta densidade foi selecionada para garantir um sinal metabólico robusto nos ensaios de viabilidade (resazurina) e quantificação, conforme os critérios de validação biológica para fibroblastos L929 descritos por Oberoi et al. (2021). Além disso, esta concentração respeita o

limite crítico onde a presença de células poderia alterar adversamente a viscosidade e o índice de fluxo da biotinta. Tal precaução visa evitar o entupimento do bico ou o aumento excessivo da tensão de cisalhamento (shear stress) durante a extrusão, fenômenos alertados nas revisões de Hölzl et al. (2016) 5 e Talluri et al. (2022).

5.5. Caracterização Reológica e Printabilidade

A caracterização física foi conduzida para validar se a formulação híbrida atende aos requisitos críticos para *bioinks* de extrusão, focando na determinação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento e na capacidade de recuperação viscoelástica. Em conformidade com as diretrizes de GROLL et al. (2019), a caracterização inicial foi realizada na "tinta de biomaterial" (fase acelular) para estabelecer parâmetros basais, introduzindo restrições como o limite de cisalhamento.

A avaliação focou na confirmação do comportamento não-Newtoniano protetor das células e na análise de recuperação viscoelástica, parâmetros determinantes para assegurar que a formulação híbrida mantenha a reprodutibilidade estrutural e a integridade das camadas impressas (*layer stacking*).

5.5.1. Teste do Tubo Invertido

A avaliação qualitativa da estabilidade estrutural e do comportamento de transição sol-gel das formulações foi conduzida através do método do tubo invertido (Inverted Tube Test). Para o preparo das amostras, alíquotas de 1 mL de cada grupo experimental (PF 21%, PF 15%, Híbrida, GX 6%) foram transferidas para eppendorf de 1,5 mL. Previamente ao teste, foi realizado um protocolo térmico, ajustado conforme a natureza físico-química dos polímeros. Os grupos controles de PF foram centrifugados a 4°C para manter o copolímero abaixo de sua temperatura crítica de gelificação, assegurando sua completa solubilização no estado líquido (estado sol), já os grupos contendo GX (GX 6% e Híbrido) foram centrifugados à 37 °C, visando promover a redução da viscosidade aparente e aumentar a fluidez das cadeias poliméricas para facilitar o assentamento do material no fundo do tubo.

As amostras foram mantidas em bancada a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). A estabilidade reológica foi monitorada cineticamente através da inversão dos tubos 180°, em cinco intervalos: t0 (imediate), t1 (2 minutos), t2 (5 minutos), t3 (30 minutos), e t4 (60

minutos). A cada intervalo, observou-se a presença ou ausência de escoamento do material sob ação da gravidade.

Para simular condições corpóreas, um novo conjunto de amostras foi incubado em uma estufa a 37°C. Nesta etapa, a avaliação do processo de gelificação foi realizada com duas medições, t_0 (imediatamente) e t_1 (5 minutos), observando-se a consistência do material após o período de incubação.

A classificação dos resultados seguiu o critério binário, “Sol”(líquido/escoamento perceptível) ou “Gel” (sólido/sem escoamento visível), determinando a consistência necessária para a viabilidade da bioimpressão.

5.5.2. Teste de Printabilidade e Fidelidade de Forma

A fabricação dos construtos tridimensionais foi conduzida através de manufatura aditiva baseada em extrusão, técnica selecionada por sua versatilidade no processamento de hidrogéis viscoelásticos. Utilizou-se a bioimpressora BioRender (BioEdTech), um sistema equipado com controle térmico de precisão e mecanismo de dispensação pneumática. Previamente ao processo de impressão, as biotintas de cada grupo experimental (PF 21%, PF 15%, GX 6% e Híbrida) foram carregadas em seringas estéreis de 10 mL e submetidas a um protocolo de estabilização térmica. As seringas foram mantidas em incubadora a 37°C por 1 hora, assegurando a homogeneização da temperatura em todo o volume do material e a completa transição sol-gel do componente PF antes do início da deposição.

A parametrização do processo de impressão foi rigorosamente padronizada para garantir a reprodutibilidade entre as triplicatas e mitigar o estresse mecânico sobre a carga biológica. A temperatura do cabeçote foi mantido constante a 37°C, condição crítica para preservar a viscosidade e o estado de gel durante a formação das camadas. A extrusão foi realizada através de um bico cilíndrico de 0,4 mm de diâmetro, operando com uma velocidade de translação do cabeçote (*feed rate*) de 10 mm/s e um fator de fluxo de extrusão calibrado em 0,5 mg/s. A definição destas variáveis visou operar dentro da janela de processamento segura descrita por Holland (2025) e Malekpour & Chen (2022), estabelecendo um equilíbrio hidrodinâmico onde a pressão pneumática aplicada é suficiente para superar a tensão de escoamento (*yield stress*) da biotinta, minimizando simultaneamente a tensão de cisalhamento (*shear stress*) nas paredes do bico para preservar a integridade estrutural.

Para a análise quantitativa da fidelidade de forma, utilizou-se um modelo digital padronizado (.stl) com geometria prismática de 25 mm x 25 mm x 20 mm. A avaliação da qualidade de impressão fundamentou-se no método semi-quantitativo proposto por Zhang et al. (2023) . Imediatamente após a fabricação, os construtos foram registrados através de fotografia digital de alta resolução, utilizando um dispositivo móvel posicionado em distância focal fixa e iluminação controlada para evitar distorções de paralaxe.

O processamento das imagens foi realizado no software ImageJ (NIH), onde se aplicou a calibração de escala para a mensuração precisa dos parâmetros morfométricos. A análise focou na determinação da uniformidade da largura dos filamentos (comparando o diâmetro extrudado real *versus* o diâmetro teórico do bico), na integridade da área dos poros (detecção de fusão ou oclusão) e na acurácia angular das arestas. Complementarmente, a estabilidade vertical e linear dos filamentos foi monitorada para identificar fenômenos reológicos adversos, como instabilidades laterais (serpenteamento/*coiling*) ou colapso gravitacional (*slumping*) das camadas inferiores, seguindo os critérios de estabilidade de fluidos estabelecidos por Talluri et al. (2022).

5.6. VIABILIDADE E FUNCIONALIDADE PÓS-IMPRESSÃO (RESAZURINA)

A análise quantitativa da viabilidade celular e da segurança biológica das formulações foi conduzida utilizando o ensaio de resazurina, um método colorimétrico baseado na redução metabólica. Este ensaio foi selecionado por sua alta sensibilidade no monitoramento da atividade mitocondrial e por sua natureza não destrutiva, permitindo correlacionar a resposta biológica com a composição da biotinta sem comprometer a integridade das amostras, conforme validado por Oberoi et al. (2021) para construtos bioimpressos.

O delineamento experimental foi estruturado em placas de cultivo de 48 poços, visando assegurar a robustez estatística e a reprodutibilidade dos dados analíticos. As biotintas representativas dos grupos experimentais foram analisadas em quadruplicata (n=4), e com o objetivo de estabelecer parâmetros de comparativos basais com o sistema de cultivo convencional, foram incluídos controles em monocamada (2D), o controle 2D vivo, composto por células mantidas exclusivamente em meio suplementado (referência de viabilidade máxima), e o controle 2D morto, contendo células em meio suplementado com 50% de Dimetilsulfóxido (DMSO) visando mitigar a variabilidade intrínseca ao processo de bioimpressão. Para a validação interna do sistema tridimensional, estabeleceram-se controles de processo em duplicata (n=2): o controle de morte 3D, constituído pela biotinta

suplementada com 50% de DMSO- para indução de lise celular, e o controle de biomaterial (biotinta acelar), destinado à subtração da autofluorescência de fundo (*background*) gerada pelos polímeros (PF e GX), estabelecendo o limiar de citotoxicidade total para a normalização dos resultados.

O protocolo de incubação iniciou-se com o preparo da solução de trabalho de resazurina diluída em Tampão Fosfato-Salino (PBS). A solução foi adicionada diretamente a cada poço contendo os construtos e o meio de cultura, estabelecendo-se um fator de diluição final de 3X no volume reacional. Esta diluição foi calibrada para atingir uma concentração final de resazurina de 0,015 mg/mL por poço, quantidade otimizada para garantir a saturação do substrato sem induzir toxicidade química às células remanescentes. Após a adição, as placas foram cuidadosamente homogeneizadas para assegurar a distribuição uniforme do reagente.

O sistema foi incubado em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por um período de 3 horas. Durante este intervalo, as células metabolicamente ativas converteram a resazurina (azul índigo, não fluorescente) em resorufina (rosa, altamente fluorescente) através da ação de oxidorreduzases citosólicas e mitocondriais.

Finalizado o tempo de incubação, a quantificação da atividade metabólica foi realizada por espectrofotometria utilizando o leitor de microplacas Varioskan™ (Thermo Fisher Scientific). A aquisição dos dados seguiu um protocolo de leitura em duplo comprimento de onda, registrando-se a densidade óptica (DO) em 570 nm, correspondente ao pico máximo de absorção da forma reduzida (resorufina) e em 600 nm, utilizado como comprimento de onda de referência para a forma oxidada (resazurina) e correção de turbidez.

O tratamento matemático dos dados brutos obedeceu a um algoritmo sequencial de correção em três etapas para garantir a precisão analítica. Inicialmente, calculou-se a absorbância líquida de cada poço através da subtração aritmética dos valores obtidos nos dois comprimentos de onda (570 nm e 600 nm), eliminando interferências espectrais inespecíficas. Na segunda etapa, o valor resultante foi ajustado pela subtração da média do sinal obtido nos poços do controle de biomaterial (branco), isolando-se estritamente a contribuição metabólica celular da absorção residual da matriz polimérica. Por fim, a viabilidade celular relativa foi determinada pela normalização dos dados corrigidos em relação à média do controle 2D vivo (considerado 100% de atividade), permitindo a classificação citotóxica final conforme os critérios da norma ISO 10993-5.

5.7. QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO TOTAL (ENSAIO PICO SIRIUS RED)

A funcionalidade biológica dos construtos e a capacidade de remodelação da matriz pelos fibroblastos encapsulados foram avaliadas quantitativamente através da determinação do teor de colágeno total depositado. O método empregado baseou-se no ensaio colorimétrico PicroSirius Red, fundamentado na propriedade do corante aniônico Sirius Red F3B em interagir especificamente, através de grupos sulfônicos, com os resíduos básicos das fibras de colágeno tipos I e III. Esta interação resulta em um complexo estável passível de precipitação e quantificação espectrofotométrica, conforme validado por Williams et al. (2018) como um indicador robusto de maturação tecidual.

O preparo das amostras seguiu um protocolo de diluição em duas etapas para assegurar a completa homogeneização da matriz polimérica e a redução da viscosidade. Inicialmente, realizou-se a adição de 600 μL de PBS diretamente aos poços contendo 300 μL de amostra (biotintas, controle morto 3D; tinta de biomaterial e controles 2D). Em seguida, a totalidade da mistura foi transferida para microtubos de 2 mL previamente preenchidos com uma alíquota adicional de 300 μL de PBS. Este procedimento resultou em um volume final de 1.200 μL e estabeleceu um fator de diluição total de 4X (1:4 v/v) padronizado para todos os grupos experimentais. Visando eliminar interferências geradas pela presença celular na leitura espectrofotométrica final, a suspensão diluída foi submetida a centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos, procedendo-se à recuperação exclusiva do sobrenadante para a continuidade do protocolo analítico

O protocolo colorimétrico foi iniciado com a transferência de uma alíquota de 100 μL da amostra diluída para microtubos, seguida pela adição de 400 μL de Ácido Acético 0,5M para acidificação do meio, otimizando a força iônica e favorecendo a interação eletrostática. Em seguida, adicionou-se 500 μL do reagente PicroSirius Red, submetendo o sistema a agitação vigorosa em vórtex e incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. Para a separação do complexo corante-colágeno, as amostras foram centrifugadas a 21.000 por 10 minutos, com posterior descarte do sobrenadante. O *pellet* precipitado foi submetido a uma etapa de lavagem com 500 μL de água destilada e nova centrifugação nas mesmas condições para remoção de resíduos inespecíficos. A eluição final foi realizada pela adição de 200 μL de solução de Hidróxido de Potássio (KOH) 0,1N, com agitação vigorosa até a completa

solubilização do corante.

Para a análise dos dados, transferiu-se 100µL do eluato alcalino, em duplicata técnica, para uma microplaca de 96 poços, mensurando-se a absorbância no comprimento de onda de 540 nm no leitor Varioskan™. O processamento dos dados brutos seguiu um rigoroso protocolo analítico. Inicialmente, os valores de absorbância foram corrigidos pela subtração do valor médio do branco (ácido acético puro). A determinação da concentração absoluta de colágeno foi realizada mediante a construção de uma curva padrão de calibração, plotando-se a absorbância média (y) versus concentrações conhecidas de colágeno (x). A partir da dispersão dos pontos, obteve-se a equação da reta através de regressão linear simples ($y = a * x + b$), onde a concentração final nas amostras desconhecidas foi calculada isolando-se a variável x ($x = (y - b)/a$). Os valores obtidos foram corrigidos pelos respectivos fatores de diluição, permitindo a comparação quantitativa da deposição de matriz extracelular entre os grupos.

6. RESULTADOS

A apresentação dos dados obtidos neste estudo segue a lógica de validação sequencial proposta nos objetivos específicos, visando responder à hipótese central de que a hibridização do copolímero sintético PF com o biopolímero natural GX permite a redução da concentração do polímero sintético sem prejuízo estrutural, superando o "paradoxo da printabilidade-bioatividade". Os resultados abrangem a caracterização física e reológica, a avaliação quantitativa da fidelidade de impressão, a análise da resposta biológica (viabilidade) e a funcionalidade tecidual (produção de colágeno).

6.1. OTIMIZAÇÃO REOLÓGICA E ESTABILIDADE ESTRUTURAL

A análise macroscópica da estabilidade reológica das formulações, conduzida por meio do teste do tubo invertido, revelou uma dicotomia comportamental fundamental regida pela temperatura e pela composição polimérica. Nos grupos controle constituídos apenas por Pluronic F127 (15% e 21%), observou-se uma dependência térmica crítica para a manutenção da estrutura. Na primeira bateria experimental, realizada à temperatura ambiente (22°C), estas amostras permaneceram no estado *sol* (líquido viscoso) mesmo após 60 minutos de repouso. Este comportamento evidencia que a temperatura de operação se manteve abaixo da Temperatura Crítica de Gelificação (CGC) do polímero, condição na qual as cadeias de PEO-PPO-PEO se encontram hidratadas e dispersas micelas livres, sem interação suficiente para formar uma rede tridimensional coesa.

Em contraste, as formulações aditivadas com GX (grupo Híbrido e GX) exibiram um comportamento reológico distinto e superior à temperatura ambiente. Independentemente da ausência de estímulo térmico, estas amostras mantiveram uma integridade estrutural robusta, resistindo ao fluxo gravitacional. A observação visual de superfícies irregulares e a retenção de bolhas de ar estáticas denotam a presença de uma elevada tensão de escoamento (*yield stress*). Conforme descrito por Lai et al. (2024), a GX estabelece uma rede polimérica física primária através de emaranhamento de cadeias e pontes de hidrogênio, capaz de sustentar a geometria do material antes mesmo da ativação térmica do PF.

A disparidade na consistência das formulações à temperatura ambiente, destacando a função da GX como agente estruturante imediato, está ilustrada na Figura 9.

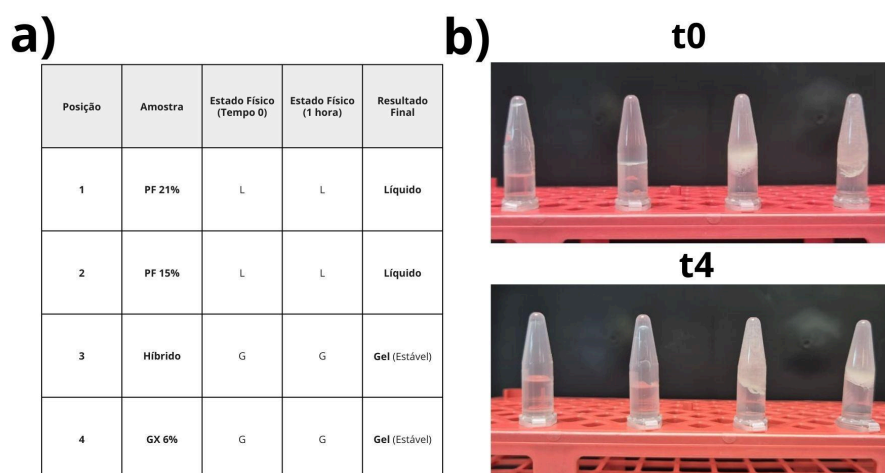


Figura 9. Caracterização da estabilidade reológica das biotintas à temperatura ambiente (22°C). (A) Tabela descritiva do estado físico (Líquido/Gel) das formulações ao longo do tempo de ensaio. (B) Registro macroscópico do teste de inversão do tubo nos tempos t_0 (imediate) e t_4 (após 60 minutos de repouso). As amostras (da esquerda para a direita: PF 21%, PF 15%, Híbrido e GX 6%) demonstram que os controles de Pluronic permanecem fluidos (L), enquanto a presença de Goma Xantana nas formulações Híbrida e GX 6% garante a manutenção do estado de gel (G) e a resistência ao escoamento gravitacional sem estímulo térmico.

A segunda bateria de testes demonstrou a termoresponsividade característica do componente sintético. A incubação a 37°C induziu a transição *sol-gel* no controle de PF 21% em um intervalo de apenas 5 minutos. O aporte térmico forneceu a energia necessária para a desidratação das unidades de óxido de propileno (PPO) no núcleo das micelas, resultando no rápido empacotamento micelar e na solidificação do material sob condições fisiológicas. No entanto, é crucial notar que o controle de PF 15% permaneceu predominantemente líquido ou formou um gel fraco incapaz de sustentar o próprio peso, corroborando os achados de Mappa et al. (2023) de que baixas concentrações de PF não atingem a viscosidade suficiente para bioimpressão sem aditivos.

A formulação Híbrida, por sua vez, demonstrou um efeito sinérgico a 37°C. A combinação da rede física da GX com a gelificação térmica do PF resultou em um sistema altamente estável. Estudos de Suhail et al. (2023) sugerem que essa estabilidade aprimorada decorre de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila da GX e os grupos éter do PF, que ancoram as micelas e impedem a dissociação da rede.

O comportamento térmico e a consolidação estrutural das matrizes em condições fisiológicas são apresentados na Figura 10.

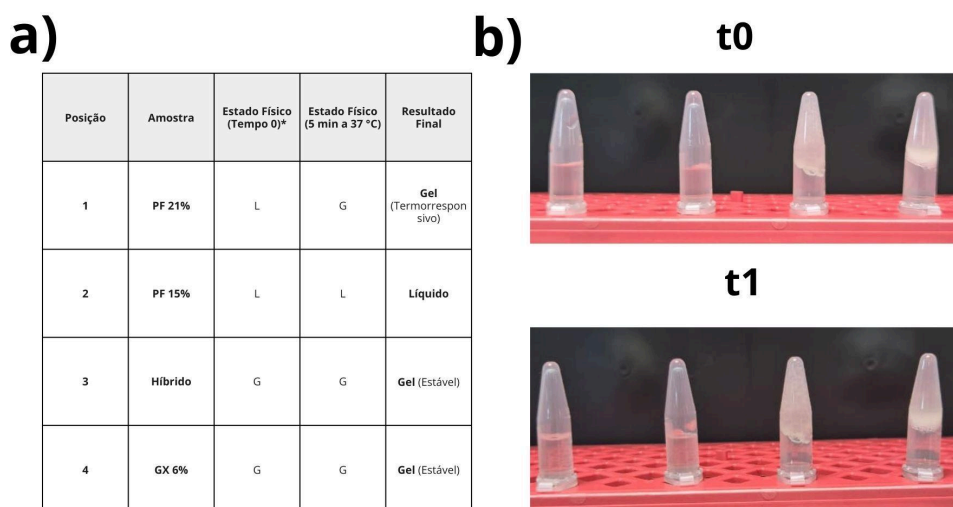


Figura 10. Avaliação da termorresponsividade e estabilidade física das formulações a 37°C. (A) Quadro de classificação do estado de gelificação em resposta ao estímulo térmico. (B) Aspecto visual das amostras em t0 (pré-incubação) e t1 (após 5 minutos de incubação). Nota-se a transição de fase *sol-gel* da amostra PF 21% e a estabilidade contínua das formulações Híbrido e GX 6% (Gel). Em contrapartida, a amostra PF 15% permaneceu em estado líquido (L), evidenciando que a redução da concentração polimérica compromete a gelificação térmica na ausência do reforço da GX.

Portanto, os resultados confirmam que a formulação híbrida apresenta-se como a candidata mais promissora para a biofabricação. A GX mitiga a instabilidade fluida do PF à temperatura ambiente, garantindo a fidelidade de forma necessária durante a extrusão, enquanto o PF contribui com o reforço da matriz após a incubação a 37°C, superando as limitações mecânicas observadas nos polímeros isolados.

6.2. AVALIAÇÃO DA PRINTABILIDADE E FIDELIDADE GEOMÉTRICA

A capacidade de processamento das formulações via extrusão (printability) foi avaliada qualitativamente quanto à formação de filamentos contínuos e quantitativamente quanto à fidelidade da forma depositada em relação ao modelo digital (CAD). Os ensaios de impressão revelaram desafios críticos na estabilização dos hidrogéis, evidenciando as limitações físicas impostas pela redução da concentração polimérica em favor da compatibilidade biológica. A formulação composta por PF 15% (Pura) demonstrou-se inviável para a biofabricação, apresentando, durante as tentativas de extrusão, um comportamento predominantemente líquido caracterizado pela ausência de uma Tensão de escoamento (Yield Stress) mínima necessária para sustentar a própria estrutura após a saída do bico. O escoamento imediato (slumping) impediu a formação de filamentos definidos e a

deposição de camadas subsequentes, levando à exclusão deste grupo das análises de fidelidade geométrica. Este resultado corrobora os dados de Mappa et al. (2023) e Datta et al. (2018), que estabelecem que concentrações reduzidas de PF não atingem a viscosidade estrutural nem a densidade micelar suficientes para atuar como suporte físico sem o auxílio de aditivos espessantes.

Em contrapartida, as formulações de PF 21%, GX 6% e Híbrida (PF 15% + GX 6%) apresentaram capacidade de extrusão satisfatória, permitindo a deposição de filamentos contínuos sem obstrução do bico (clogging). No entanto, a análise macroscópica e morfométrica dos construtos revelou uma baixa fidelidade de forma transversal a todos os grupos experimentais. Observou-se a ocorrência sistemática de imperfeições geométricas, caracterizadas principalmente pelo espalhamento lateral dos filamentos (spreading) e pela fusão dos poros da malha impressa, indicando que a recuperação reológica pós-deposição não foi imediata ou robusta o suficiente para contrabalançar as forças de gravidade e tensão superficial.

A caracterização visual dos construtos e a evidência das limitações de resolução geométrica estão apresentadas na Figura 11

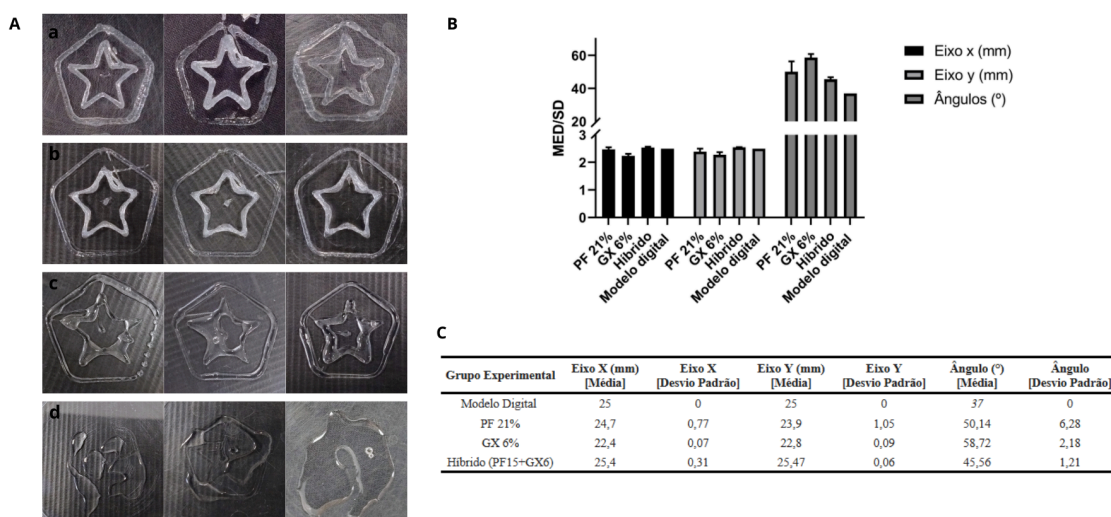


Figura 11 - (A) Imagens representativas do aspecto macroscópico das estruturas impressas para os diferentes grupos. (B) Representação gráfica comparativa das dimensões lineares (Eixos X e Y em mm) e angulares (em graus) das estruturas. As barras representam a Média \pm Desvio Padrão (SD). (C) Tabela detalhando os parâmetros de fidelidade de impressão. São apresentados os valores de Média e Desvio Padrão para os Eixos X e Y e Ângulos dos grupos experimentais PF 21%, GX 6% e Híbrido (PF15+GX6), comparados aos valores de referência do Modelo Digital.

Os resultados de baixa fidelidade observados, mesmo na formulação híbrida, ilustram a complexidade da "janela de biofabricação" descrita por Zhang et al. (2023) e Ji e Guvendiren (2017). Este conceito postula que existe um intervalo estreito de propriedades onde a "processabilidade" (facilidade de extrusão) e a "fidelidade de impressão" (capacidade de retenção de forma) coexistem. Ao priorizarmos a redução da concentração de PF para favorecer a sobrevivência celular, o sistema híbrido resultante apresentou propriedades mecânicas insuficientes para manter a geometria complexa com alta resolução. Holland (2025) argumenta que este descompasso entre a expectativa de design e a realidade experimental é comum na bioimpressão por extrusão, onde a maioria das formulações falha em reconciliar a resolução necessária com a sobrevivência celular.

A imperfeição no grupo PF 21%, teoricamente mais rígido, pode ser atribuída à natureza física das interações micelares. Aydin (2023) classifica o PF como um material de "força mecânica limitada", suscetível à deformação sob seu próprio peso se as condições de temperatura não forem estritamente controladas para manter o empacotamento micelar máximo. O espalhamento observado sugere que, embora o material gelifique termicamente, sua recuperação elástica não foi rápida o suficiente para evitar o spreading imediato sobre o substrato.

No caso específico da Formulação Híbrida, embora a GX tenha conferido a capacidade de impressão, resgatando o PF 15% do estado líquido através de seu comportamento pseudoplástico descrito por Lai et al. (2024), a estrutura final ainda carece de rigidez estática. Talluri et al. (2022) explicam que a estabilidade do filamento depende do equilíbrio delicado entre o índice de comportamento de fluxo (n) e o índice de consistência (K). É provável que a mistura híbrida tenha apresentado um comportamento de afinamento por cisalhamento adequado para o fluxo, protegendo as células do estresse mecânico conforme preconizado por Malekpour e Chen (2022), mas um módulo de armazenamento (G') em repouso insuficiente para prevenir a fusão dos filamentos adjacentes antes da estabilização completa. Portanto, os dados indicam que a hibridização com GX foi eficaz para viabilizar a extrudabilidade de concentrações reduzidas de PF, mas o sistema ainda requer otimização possivelmente através do aumento da concentração de GX ou da incorporação de um segundo mecanismo de reticulação, para atingir a alta fidelidade necessária para estruturas anatômicas complexas, sem comprometer o ganho biológico almejado.

6.3. VIABILIDADE CELULAR E REDUÇÃO DE CITOTOXICIDADE

A avaliação da citocompatibilidade, realizada por meio da quantificação da atividade metabólica mitocondrial no ensaio de resazurina, revelou uma distinção funcional rigorosa entre os polímeros naturais e sintéticos avaliados. Os resultados evidenciaram que o hidrogel composto exclusivamente por GX a 6% promoveu os índices mais elevados de absorbância, indicando uma preservação superior da integridade celular e do metabolismo dos fibroblastos L929 em comparação aos demais grupos experimentais. Este dado corrobora a literatura que descreve a GX como um biomaterial altamente citocompatível, cuja estrutura polianiônica e hidrofílica favorece a interação celular sem a liberação de subprodutos tóxicos, mimetizando as condições fisiológicas da matriz extracelular nativa.

Em contrapartida, a hipótese de que a redução da concentração do componente sintético na formulação híbrida resultaria em um ganho significativo de viabilidade não foi confirmada estatisticamente pelos dados brutos obtidos. Observou-se que todos os grupos contendo PF, independentemente da concentração (21% ou 15%) ou da associação com a GX (Híbrido), apresentaram uma redução acentuada na conversão de resazurina em resorufina, caracterizando um perfil de baixa viabilidade celular. A formulação híbrida otimizada (PF127 15% + GX) não diferiu estatisticamente dos controles de PF puro, sugerindo que a presença do copolímero, mesmo em níveis reduzidos, exerce um efeito deletério predominante sobre a cultura.

A disparidade metabólica observada entre o hidrogel natural e as formulações contendo o componente sintético, bem como a ausência de ganho significativo de viabilidade na estratégia de hibridização, estão ilustradas na Figura 12, que sumariza os valores médios de viabilidade celular e seus respectivos desvios padrão para cada grupo experimental, normalizados em relação ao controle positivo (células em monocamada). Estes dados numéricos permitem comparar diretamente o desempenho biológico da matriz natural pura (GX 6%) frente às formulações contendo o copolímero sintético em diferentes concentrações.

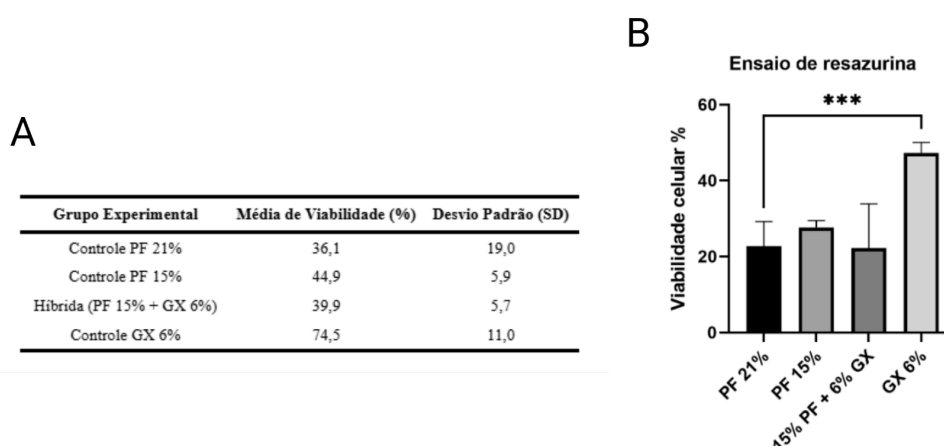


Figura 12 - (A) Os valores de viabilidade (%) celular relativa de fibroblastos L929 avaliada pelo ensaio de resazurina, foram normalizados em relação ao controle 2D vivo (considerado 100%). Média \pm Desvio Padrão (SD) obtidos de quadruplicatas biológicas (n=4). A análise estatística indicou diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). (B) Barras representam média \pm desvio padrão da absorbância. Asteriscos iguais indicam diferença estatística significativa.

A persistência da baixa atividade metabólica nos construtos híbridos pode ser atribuída a uma combinação de fatores físico-químicos e biológicos. Primeiramente, a natureza anfífilica do PF atua como um surfactante que pode interagir com as bicamadas lipídicas das membranas celulares, comprometendo sua integridade e induzindo citotoxicidade mesmo em concentrações moderadas. Adicionalmente, a alta densidade da rede polimérica formada pela interação sinérgica entre a GX e o PF pode ter imposto barreiras difusionais severas, limitando o transporte passivo de oxigênio e nutrientes para o interior do gel. Conforme descrito em estudos com hidrogéis densos em cultura estática, essa restrição de transporte cria microambientes hipóxicos que suprimem o metabolismo mitocondrial e podem levar à necrose celular precoce, independentemente da toxicidade química direta do material.

Outro fator crucial a ser considerado é a possível limitação na disponibilidade de meio de cultura nutritivo no microambiente celular imediato. A estrutura compacta e a alta viscosidade da biotinta híbrida podem restringir a difusão eficiente de fatores de crescimento e nutrientes essenciais presentes no meio externo para o interior do construto. Essa escassez nutricional local induz um estado de estresse metabólico, forçando as células a entrarem em um estado de dormência ou quiescência para economizar energia. Esse fenômeno corrobora a hipótese de uma adaptação fisiológica ao ambiente bioinerte e confinado, onde as células reduzem sua atividade metabólica basal enquanto tentam remodelar o entorno, resultando em leituras de absorbância reduzidas que não necessariamente indicam morte celular massiva,

mas sim um metabolismo deprimido.

Em síntese, os resultados do ensaio de resazurina ilustram o "trade-off reológico-biológico" descrito por Elango e Zamora-Ledezma (2025): a estratégia de hibridização foi eficaz para garantir a integridade estrutural (printabilidade), mas a densidade da rede, a química do surfactante sintético e a restrição nutricional impuseram desafios à viabilidade imediata. Estes dados sugerem que a otimização futura da biotinta deve focar em estratégias que aumentem a porosidade da rede ou na redução ainda mais agressiva da concentração de PF, possivelmente compensada por maiores teores de polímeros naturais ou funcionalização com peptídeos de adesão.

6.4. BIOATIVIDADE FUNCIONAL E PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR

A funcionalidade dos construtos bioimpressos e a capacidade dos fibroblastos L929 de remodelarem a matriz sintética foram avaliadas através da quantificação de colágeno total depositado, utilizando o método colorimétrico Sirius Red. A análise dos dados revelou padrões distintos de deposição de MEC, modulados diretamente pela composição polimérica e pelas propriedades mecânicas do substrato. A quantificação espectrofotométrica demonstrou uma variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na concentração de colágeno entre os grupos experimentais. O grupo PF 21% (Controle Positivo) exibiu a maior concentração absoluta de colágeno total ($0,011 \pm 0,018$ g/mL), seguido pela Formulação Híbrida ($0,007 \pm 0,006$ g/mL) e, por fim, pelo grupo PF 15% ($0,003 \pm 0,001$ g/mL).

A correlação entre a estabilidade da matriz e a atividade secretora celular, bem como a superioridade funcional da formulação híbrida em comparação ao polímero diluído, estão ilustradas na Figura 13.

A predominância da produção de colágeno no grupo PF 21%, apesar da viabilidade celular reduzida observada nos ensaios metabólicos anteriores, pode ser atribuída aos mecanismos de mecanotransdução celular. Conforme elucidado por Anil Kumar et al. (2019) e Williams et al. (2018), a rigidez do substrato (*stiffness*) atua como um sinal mecânico primário detectado pelas integrinas, onde ambientes mais rígidos estimulam a tensão do citoesqueleto e ativam vias de sinalização que favorecem a síntese de proteínas estruturais. Este resultado corrobora a hipótese de que a alta densidade micelar do PF 21% forneceu o estímulo físico necessário para induzir uma resposta adaptativa robusta nos fibroblastos remanescentes.

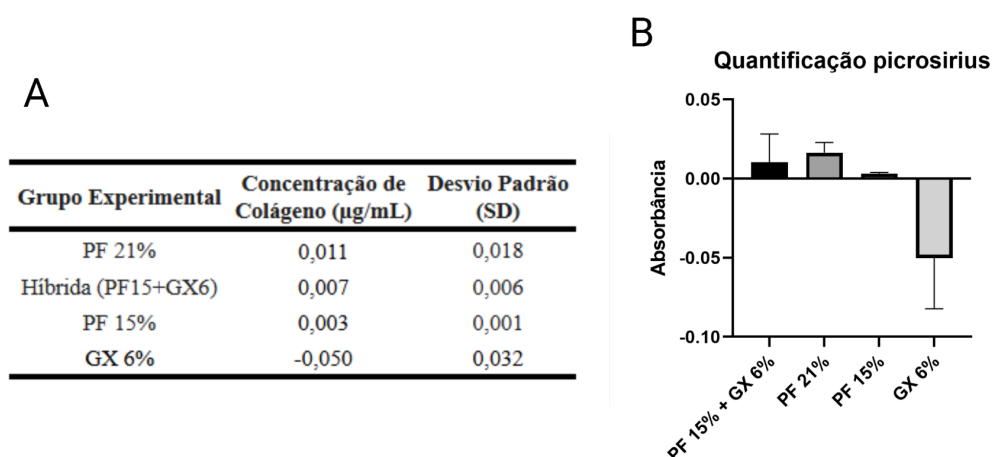


Figura 13 - (A) Tabela apresentando os valores de concentração de colágeno ($\mu\text{g/mL}$) e Desvio Padrão (SD) obtidos para os grupos experimentais PF 21%, Híbrida (PF15+GX6), PF 15% e GX 6%. (B) Quantificação pelo ensaio de picrossirius. As barras representam a média \pm desvio padrão da absorbância.

Em contrapartida, o desempenho da Formulação Híbrida é particularmente relevante para a validação da biotinta otimizada. Embora inferior ao controle de alta rigidez, a produção de colágeno no grupo híbrido foi significativamente superior à do PF de baixa concentração (15%). Este dado contrasta com a literatura clássica revisada por Turnbull et al. (2017), que classifica o PF isolado como um material que frequentemente carece de compatibilidade celular a longo prazo. A presença significativa de colágeno na matriz híbrida sugere que a adição de GX mitigou a inércia biológica do polímero sintético, fornecendo um suporte estrutural estável, descrito por Suhail et al. (2023) como uma rede entrelaçada resistente à erosão, que permitiu a ancoragem e a funcionalidade celular.

A detecção de colágeno é um indicador fundamental de sucesso da biotinta, pois valida a transição de um hidrogel passivo para um microambiente instrutivo. Volova et al. (2023) destacam que a capacidade de suportar a síntese de colágeno e glicosaminoglicanos é um requisito essencial para a regeneração de tecidos como a cartilagem e a derme. Além disso, segundo Javid et al. (2024), em hidrogéis sintéticos que carecem intrinsecamente de motivos de adesão RGD nativos, a sobrevivência celular depende da rápida secreção de MEC endógena para criar novos pontos de ancoragem via integrinas. Portanto, o resultado do grupo híbrido confirma que a formulação promoveu um ambiente permissivo à remodelação, superando a instabilidade física observada no grupo de PF 15% puro, onde o colapso estrutural falhou em fornecer os sinais mecânicos mínimos para a indução da síntese de matriz.

Por fim, a análise do grupo GX Pura destacou um desafio técnico na caracterização de biopolímeros complexos. A interferência na leitura de absorbância, causada pela interação inespecífica do corante Sirius Red com as cadeias polianiónicas da GX ou pela turbidez residual, impediu a quantificação precisa neste grupo. Este artefato metodológico ressalta a necessidade de refinamento nos protocolos de extração, sugerindo que a digestão enzimática prévia da matriz pode ser uma alternativa mais adequada para eliminar o *background* do material em estudos futuros. Em síntese, os dados validam a Formulação Híbrida como um biomaterial funcional que, ao equilibrar processabilidade e bioatividade, permite a deposição de MEC suficiente para iniciar a maturação tecidual.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo dedicou-se ao desenvolvimento e à caracterização de uma biotinta híbrida, desenvolvida a partir da associação estratégica entre o copolímero sintético PF e o biopolímero microbiano GX. A condução desta pesquisa foi norteadada pelo objetivo de superar o "paradoxo da printabilidade-bioatividade", um desafio central na biofabricação que busca reconciliar a necessidade de alta fidelidade estrutural com a manutenção da viabilidade biológica em construções tridimensionais. A hipótese central sustentava que a funcionalização reológica do PF, mediante a incorporação de GX, permitiria a redução da concentração do polímero sintético, mitigando sua citotoxicidade intrínseca, sem comprometer a processabilidade necessária para a técnica de extrusão.

No âmbito reológico, a hibridização demonstrou ser uma estratégia eficaz para a estabilização da rede polimérica. A caracterização reológica confirmou que a GX atuou como um agente de reforço estrutural, ancorando as micelas de PF através de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio. Esta interação sinérgica elevou a tensão de escoamento (yield stress) da mistura, permitindo que a formulação híbrida superasse a instabilidade líquida característica do PF puro em baixas concentrações.

Contudo, no que se refere à printabilidade final dos construtos, os resultados experimentais indicaram que, embora a processabilidade tenha sido viabilizada, nenhuma das formulações avaliadas apresentou uma fidelidade geométrica satisfatória após a deposição. Observou-se que a recuperação estrutural imediata não foi suficiente para impedir deformações ou o espalhamento (spreading) dos filamentos, evidenciando que o equilíbrio entre a fluidez necessária para a extrusão e a rigidez para a retenção de forma permanece um desafio crítico. Este desfecho corrobora a complexidade da "janela de biofabricação". Portanto, conclui-se que ajustes adicionais na formulação são imprescindíveis em trabalhos futuros, sugerindo-se a investigação de maiores concentrações de GX ou a implementação de mecanismos de reticulação secundária para aprimorar a resolução e a integridade final das estruturas impressas.

Em relação à resposta biológica, a análise de viabilidade celular não revelou diferenças estatísticas relevantes entre a formulação híbrida e os controles de PF. A redução da concentração de PF para 15% (p/v), embora teoricamente benéfica para diminuir a ação surfactante do polímero sobre as membranas celulares, não resultou em um ganho

significativo de sobrevivência imediata. A hipótese mais provável para este cenário reside na limitação nutricional dentro da matriz densa do hidrogel. Conforme elucidado, hidrogéis com alta densidade polimérica podem impor barreiras severas à difusão de nutrientes e oxigênio. Desta forma, para alcançar níveis de viabilidade superiores em estudos subsequentes, faz-se necessária a otimização da concentração interna de meio de cultura e indutores metabólicos na biotinta, visando mitigar o estresse nutricional e sustentar a homeostase celular nas fases iniciais pós-impressão.

Apesar das limitações de fidelidade e viabilidade imediata, a funcionalidade da biotinta foi validada pela capacidade de indução da síntese de MEC. A detecção quantitativa de colágeno nos construtos, confirmada pelo ensaio Sirius Red, demonstra que o material híbrido não atua apenas como um suporte inerte, mas como um microambiente instrutivo capaz de estimular a atividade secretora dos fibroblastos. A produção de colágeno sugere que, mesmo diante dos desafios metabólicos, a rigidez e a arquitetura da matriz híbrida forneceram sinais de mecanotransdução adequados para a resposta celular, um requisito essencial para a engenharia de tecidos moles.

Em suma, este trabalho estabeleceu uma base promissora para o desenvolvimento de biotintas compostas de baixo custo. A formulação PF/GX mostrou-se reologicamente estável e funcionalmente ativa quanto à produção de MEC. Para a translação efetiva desta tecnologia, os próximos passos devem focar prioritariamente no refinamento da fidelidade de impressão e na suplementação nutricional da matriz, visando consolidar um sistema que equilibre com precisão a arquitetura complexa e a plena vitalidade biológica.

8. REFERÊNCIAS

- AN, Jin-Hee; KIM, Hack-Youn. Scaffolds bioink for three-dimensional (3D) bioprinting. **Food Science of Animal Resources**, v. 45, n. 1, p. 126–144, 2025.
- ANIL KUMAR, Shweta et al. A visible light-cross-linkable, fibrin-gelatin-based bioprinted construct with human cardiomyocytes and fibroblasts. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, n. 9, p. 4551–4563, 2019.
- ASHAMMAKHI, N. et al. Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs. **Materials Today Bio**, v. 1, p. 100008, 2019.
- AYDIN, Levent. A review of current state of bioinks. **MedLiber of Regenerative Medicine**, v. 1, n. 1, p. 09–22, 2023.
- BEGISHEV, Ildar et al. Bioink as a type of biologically active substances: issues of technology and legal regulation. **BIO Web of Conferences**, v. 82, p. 01002, 2024.
- BERCEA, Maria. Rheology as a tool for fine-tuning the properties of printable bioinspired gels. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2766, 2023.
- BERCEA, Maria; DARIE, Raluca Nicoleta; MORARIU, Simona. Rheological investigation of xanthan/Pluronic F127 hydrogels. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 58, n. 2-3, p. 189–196, 2013.
- BOONLAI, Wannisa et al. Development and characterization of pluronic F127 and methylcellulose based hydrogels for 3D bioprinting. **Polymer Bulletin**, v. 80, n. 4, p. 4555-4572, 2023.
- CUI, Rongwei et al. Natural polymer derived hydrogel bioink with enhanced thixotropy improves printability and cellular preservation in 3D bioprinting. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 11, n. 17, p. 3907–3918, 2023.
- DATTA, Pallab et al. Biomaterials for bioprinting microvasculature. **Acta Biomaterialia**, v. 13, p. 91011, 2018.

DECARLI, Monize C. et al. Xanthan gum–iron system: natural, mechanically tunable, bioactive, and magnetic-responsive hydrogels for biomedical engineering applications. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 17, p. 51588–51604, 2025.

GAO, Qiqi; KIM, Byoung-Soo; GAO, Ge. Advanced strategies for 3D bioprinting of tissue and organ analogs using alginate hydrogel bioinks. **Marine Drugs**, v. 19, n. 12, p. 708, 2021.

GROLL, J. et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, v. 11, n. 1, p. 013001, 2018.

GUNGOR-OZKERIM, P. Selcan et al. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 5, p. 915–946, 2018.

HOLLAND, Ian. Extrusion bioprinting: meeting the promise of human tissue biofabrication?. **Progress in Biomedical Engineering**, v. 7, n. 2, 023001, 2025.

HÖLZL, Katja et al. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, p. 032002, 2016.

JAFARKHANI, Mahboubeh et al. Bioprinting in vascularization strategies. **Iranian Biomedical Journal**, v. 23, n. 1, p. 9, 2019.

JAVID, Hossein et al. RGD peptide in cancer targeting: benefits, challenges, solutions, and possible integrin-RGD interactions. **Cancer Medicine**, v. 13, n. 2, p. e6800, 2024.

JENSEN, Caleb; TENG, Yong. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, art. 33, 2020.

JI, Shen; GUVENDIREN, Murat. Recent advances in bioink design for 3D bioprinting of tissues and organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 23, 2017.

KANOKOVA, Denisa et al. Active media perfusion in bioprinted highly concentrated collagen bioink enhances the viability of cell culture and substrate remodeling. **Gels**, v. 10, n. 5, p. 316, 2024.

LAI, Guanyu; MEAGHER, Laurence. Versatile xanthan gum-based support bath material compatible with multiple crosslinking mechanisms: rheological properties, printability, and cytocompatibility study. **Biofabrication**, v. 16, n. 3, p. 035005, 2024.

LI, J.; WU, C.; CHU, P. K.; GELINSKY, M. Hydrogels for 3D printing: rational design strategies and emerging biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 140, p. 100543, 2020.

LI, Ruoqing et al. Bioinks adapted for in situ bioprinting scenarios of defect sites: a review. **RSC Advances**, v. 13, n. 11, p. 7153–7167, 2023.

LIU, Suihong et al. Novel protein-rich bioactive bioink stimulates cellular proliferation and response in 3D bioprinted volumetric constructs. **Advanced Healthcare Materials**, v. 14, n. 10, p. e2404470, 2025.

MALEKPOUR, A.; CHEN, X. Printability and cell viability in extrusion-based bioprinting from experimental, computational, and machine learning views. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 13, n. 4, p. 40, 2022.

MAPPA, Taufik Abdullah et al. An innovative biofunctional composite hydrogel with enhanced printability, rheological properties, and structural integrity for cell scaffold applications. **Polymers**, v. 15, n. 15, p. 3223, 2023.

MATHUR, Vidhi et al. Innovative bioinks for 3D bioprinting: exploring technological potential and regulatory challenges. **Journal of Tissue Engineering**, v. 16, p. 20417314241308022, 2025.

MOHAMMADINEJAD, Reza et al. Recent advances in natural gum-based biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: a review. **Polymers**, v. 12, n. 1, p. 176, 2020.

OBEROI, Gunpreet et al. The impact of 3D-printed LAY-FOMM 40 and LAY-FOMM 60 on L929 cells and human oral fibroblasts. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 4, p. 1869–1877, 2021.

PARAK, Azraa et al. Functionalizing bioinks for 3D bioprinting applications. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 198-205, 2019.

RIJAL, Girdhari. Bioinks of natural biomaterials for printing tissues. **Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 705, 2023.

SALG, Gabriel Alexander et al. Vascularization in bioartificial parenchymal tissue: bioink and bioprinting strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8589, 2022.

SHARMA, Chhavi et al. Cellulose-based 3D printing bio-inks for biomedical applications: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 305, n. Pt 2, p. 141174, 2025.

SMITHMYER, Megan E.; CASSEL, Samantha E.; KLOXIN, April M. Bridging 2D and 3D culture: probing impact of extracellular environment on fibroblast activation in layered hydrogels. **AIChE Journal**, v. 65, n. 12, p. 16837, 2019.

SUHAIL, Muhammad et al. Xanthan-Gum/Pluronic-F-127-based-drug-loaded polymeric hydrogels synthesized by free radical polymerization technique for management of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Gels**, v. 9, n. 8, p. 640, 2023.

TALLURI, Dhanvanth J. S. et al. Ink rheology regulates stability of bioprinted strands. **Journal of Biomechanical Engineering**, v. 144, n. 7, p. 074503, 2022.

TURNBULL, Gareth et al. 3D biofabrication for soft tissue and cartilage engineering. **Medical Engineering & Physics**, v. 82, p. 13–39, 2020.

VOLOVA, Larisa T. et al. 3D bioprinting of hyaline articular cartilage: biopolymers, hydrogels, and bioinks. **Polymers**, v. 15, n. 12, p. 2695, 2023.

WILLIAMS, David et al. A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3D bioprinting. **Bioprinting**, v. 9, p. 19–36, 2018.

WILLSON, Kelsey; ATALA, Anthony; YOO, James J. Bioprinting Au natural: the biologics of bioinks. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1593, 2021.

XIE, Mengbo et al. Application of hydrogels as three-dimensional bioprinting ink for tissue engineering. **Gels**, v. 9, n. 2, p. 88, 2023.

YANG, Yang et al. Recombinant human collagen-based bioinks for the 3D bioprinting of full-thickness human skin equivalent. **International Journal of Bioprinting**, v. 8, n. 4, p. 611, 2022.

ZHANG, Huihui et al. Strategies for improving the 3D printability of decellularized extracellular matrix bioink. **Theranostics**, v. 13, n. 8, p. 2562–2587, 2023.