

**CAETANO PEDRO EVANGELISTA RIBEIRO**

**Estabelecimento de um processo biotecnológico com emprego de  
manufatura aditiva para produção de biocurativos poliméricos associados  
a plasma rico em plaquetas (PRP) definidos morfológicamente a partir de  
escaneamento de feridas cutâneas virtuais**

ASSIS

2022

**CAETANO PEDRO EVANGELISTA RIBEIRO**

**Estabelecimento de um processo biotecnológico com emprego de manufatura aditiva para produção de biocurativos poliméricos associados a plasma rico em plaquetas (PRP) definidos morfológicamente a partir de escaneamento de feridas cutâneas virtuais**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador(a): Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

ASSIS

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ana Cláudia Inocente Garcia - CRB 8/6887

R484e Ribeiro, Caetano Pedro Evangelista  
Estabelecimento de um processo biotecnológico com  
emprego de manufatura aditiva para produção de  
biocurativos poliméricos associados a plasma rico em  
plaquetas (PRP) definidos morfologicamente a partir de  
escaneamento de feridas cutâneas virtuais / Caetano  
Pedro Evangelista Ribeiro. Assis, 2022.  
154 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual  
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis  
Orientador: Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

1. Biociências. 2. Biopolímeros. 3. Engenharia de  
tecidos. 4. Modelagem digital 3D. 5. Scaffold -  
Preservação. I. Título.

CDD 660



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Câmpus de Assis**



### **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Estabelecimento de um processo biotecnológico com emprego de manufatura aditiva para produção de biocurativos poliméricos associados a plasma rico em plaquetas (PRP) definidos morfológicamente a partir de escaneamento de feridas cutâneas virtuais

**AUTOR: CAETANO PEDRO EVANGELISTA RIBEIRO**

**ORIENTADOR: JOÃO TADEU RIBEIRO PAES**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em **BIOCIÊNCIAS**, área: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. **JOÃO TADEU RIBEIRO PAES** (Participação Virtual)  
Departamento de Biotecnologia / UNESP/FCL-Assis

Profa. Dra. **JANAINA DE ANDRÉA DERNOWSEK** (Participação Virtual)  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) / USP/CEBIO (Centro de Biotecnologia)-São Paulo

Prof. Dr. **JORGE VICENTE LOPES DA SILVA** (Participação Virtual)  
Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer / Campinas

Assis, 14 de dezembro de 2021

Dedico este trabalho à toda minha família e à sabedoria do tempo, por ensinarem-me o poder da resiliência e a capacidade de crescer e evoluir perante dificuldades e transformar desafios em estímulos e soluções.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter me suportado até aqui, seja nos momentos de alegria ou nas horas em que a vida me permitiu aprender, nas dúvidas, a certeza de vencer mais uma etapa em minha caminhada.

Aos meus amados pais, Silvia e Geraldo, razões de minha vida, fontes de minha gratidão infinita, minhas maiores inspirações e exemplos de garra e determinação, por toda a paciência, suporte, compreensão e amor incondicional.

Ao meu querido irmão, Luiz Otávio, parceiro de todas as horas, por todos os momentos de encorajamento e aprendizado, conselhos e palavras de motivação.

Aos meus eternos e amados avós Judith (*in memoriam*), Paulo (*in memoriam*), Pedro (*in memoriam*) e Odete (*in memoriam*), exemplos inesquecíveis de humanidade e amor, por terem me incentivado, desde os meus primeiros passos, a buscar meus sonhos com humildade, vontade e fé.

Ao meu querido orientador, professor João Tadeu Ribeiro Paes, por toda a confiança em mim depositada nas aventuras por novas ideias e por toda a sabedoria inesgotável desde os tempos de graduação.

Aos caros mestres, Dra. Lucineia dos Santos, Dr. Murilo Racy Soares, Dra. Francislaine Aparecida dos Reis Lívero, Dra. Janaina Dernowsek e Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva pelas valiosas sugestões e melhoramentos, de fundamental importância para que este trabalho pudesse tomar forma.

A todos os estimados colegas de GenTe Cel. Em especial à Laís, companheira de experimentos e de produtivas discussões, à Maria e ao Carlos, pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e pela gentileza em disponibilizarem o equipamento, tempo e suporte que tornaram possível a finalização dos experimentos.

Aos companheiros diários da Unifío, João, Fabiano e Rafael, por todo o suporte, parceria fraterna e momentos de descontração. Em especial, ao grande amigo Jakson, pelo incentivo, torcida e exemplo de profissionalismo.

A todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta jornada pudesse tornar-se ainda mais única e especial.

*“Olhe para as estrelas e não para os seus pés. Tente entender o que você vê e imagine o que faz o Universo existir. Seja curioso.”*

*Stephen Hawking*

RIBEIRO, Caetano Pedro Evangelista. **Estabelecimento de um processo biotecnológico com emprego de manufatura aditiva para produção de biocurativos poliméricos associados a Plasma Rico em Plaquetas (PRP) definidos morfologicamente a partir de escaneamento de feridas cutâneas virtuais**. 2021. 154 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2021.

## RESUMO

A manufatura aditiva é um processo que tem gerado avanços em pesquisa básica e aplicada, ampliando a gama de possibilidades e acelerando a translação de modelos teóricos de materiais e biomateriais que possam ser empregados em áreas diversas da engenharia e da medicina humana, particularmente, na engenharia tecidual e medicina regenerativa (TERM). No âmbito da medicina regenerativa e da engenharia tecidual, estudos recentes empregando o plasma rico em plaquetas (PRP) têm demonstrado grande eficácia terapêutica no tratamento de úlceras cutâneas de difícil cicatrização, com ampla capacidade de estimulação do processo regenerativo tecidual por meio da liberação de fatores quimiotáticos. O uso do PRP autólogo, consolidado como um importante biomaterial, em processos de manufatura aditiva (impressão 3D), imprime grandes avanços no contexto da medicina regenerativa. Nesse sentido, a busca por materiais biodegradáveis, estáveis e versáteis tem encontrado nos polímeros de origem natural, como a gelatina e o alginato, propriedades físico-químicas atraentes para a construção de matrizes (*scaffolds*) que forneçam suporte e preservação de aspectos físico-químicos do PRP e proporcionem um ambiente favorável para migração celular durante os processos de regeneração tecidual. Deste modo, a perspectiva de impressão de um biocurativo, composto de um gel polimérico de alginato/gelatina associado ao PRP, obtido a partir de modelos digitalizados de úlceras cutâneas escaneadas por dispositivos portáteis, constitui uma alternativa potencialmente promissora em termos de engenharia de tecidos e medicina regenerativa, podendo fundamentar um bioprocessos reprodutível e de grande viabilidade para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas em dermatologia. Neste cenário propõe-se no presente estudo, um bioprocessos de fácil operação e funcionalidade que permita a elaboração de curativos de baixo custo e de



mínimo risco imunológico, tratando-se de uma associação de polímeros inertes e biocompatíveis a um material biológico autólogo, gerando um produto exequível e de potencial incorporação à rotina terapêutica de clínicas e hospitais privados e ao Sistema Único de Saúde (SUS).

Palavras-chave: Escaneamento 3D, Modelagem Digital, Impressão 3D, Biofabricação, *Scaffold*, Curativo Biológico, Biomateriais, Manufatura Aditiva, Medicina Regenerativa, TERM

RIBEIRO, Caetano Pedro Evangelista. **Establishment of a biotechnological process with the use of additive manufacturing for the production of morphologically defined polymeric biological wound dressings associated with platelet-rich plasma (PRP) from the virtual skin wounds scanning.** 2021. 154 f. Dissertação (Mestrado in Biociências) – São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2021.

## **ABSTRACT**

Additive manufacturing is a process that has generated advances in basic and applied research, expanding the range of possibilities and accelerating the translation of theoretical models of materials and biomaterials that can be used in different areas of engineering and human medicine, particularly in tissue engineering and regenerative medicine (TERM). In this field, recent studies using platelet-rich plasma (PRP) have shown great therapeutic efficacy in the treatment of difficult-to-heal skin ulcers, with ample capacity to stimulate the tissue regenerative process through the release of chemotactic factors. The use of autologous PRP, consolidated as an important biomaterial in additive manufacturing processes (3D printing), promotes great advances in the context of regenerative medicine. In this sense, the search for biodegradable, stable and versatile materials, has found in natural polymers, such as gelatin and alginate, attractive physicochemical properties for the construction of matrices (scaffolds) that provide support and preservation of physicochemical aspects of PRP and a favorable environment for cell migration during tissue regeneration processes. Thus, the prospect of a biological wound dressing printing process, composed of a polymeric alginate/gelatin gel associated with PRP, obtained from digital models of skin ulcers scanned by portable devices, constitutes a potentially promising alternative in terms of tissue engineering and regenerative medicine, being able to support a reproducible and highly viable bioprocess for the establishment of new therapeutic approaches in dermatology. In this scenario, this study proposes an easy-to-operate and functional bioprocess that allows the development of low-cost and minimal immunological risk wound dressings, associating inert and biocompatible polymers with an autologous biological material, generating a feasible product with potential incorporation

into the therapeutic routine of private clinics and hospitals and Sistema Único de Saúde (SUS).

Keywords: 3D Scanning, Digital Modeling, 3D Printing, Biofabrication, Scaffold, Biological Wound Dressing, Biomaterials, Additive Manufacturing, Regenerative Medicine, TERM

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Etapas de regeneração tecidual em escala celular em feridas cutâneas de etiologia normal e diabética .....	33
Figura 2 – Processamento do sangue total para obtenção do plasma rico em plaquetas a partir da centrifugação diferencial em duas etapas .....	38
Figura 3 – Fisiologia dos fatores de crescimento derivados de plaquetas e fontes diversas .....	39
Figura 4 – Critérios de classificação dos biomateriais, vantagens de utilização terapêutica e vias de caracterização de um biocurativo ideal .....	45
Figura 5 – Estrutura química dos blocos constituintes predominantes nas formatações dos alginatos de origem algal e bacteriana .....	52
Figura 6 – Representação da estrutura química do alginato pelo mecanismo de gelificação ionotrópica na presença de íons divalentes .....	53
Figura 7 – Etapas envolvidas na formação de redes poliméricas IPN e semi-IPN. A e B representam polímeros genéricos. $\alpha$ e $\beta$ representam agentes reticulantes genéricos .....	58
Figura 8 – Requisitos de printabilidade de uma biotinta para propósito biocurativo .....	62
Figura 9 – Mapeamento das etapas de obtenção e tratamento de modelos virtuais e parametrização de máquina envolvidos na bioimpressão 3D .....	66
Figura 10 – Metodologias de bioimpressão 3D mais comumente empregadas em manufatura aditiva .....	68
Figura 11 – Etapas-chave do processo de automatização de impressão 3D de um biocurativo de alginato-gelatina/PRP .....	72
Figura 12 – Metodologia direta de contagem de plaquetas por Rees-Ecker ....	74
Figura 13 – Metodologia direta de contagem de leucócitos por Türk .....	75
Figura 14 – Impressora tridimensional ZMorph 2.0 VX, utilizada nos testes experimentais envolvendo impressão de <i>scaffolds</i> poliméricos .....	81
Figura 15 – Conjunto de extrusão (seringa hipodérmica, motor e êmbolo) da bioimpressora. Teste de impressão dos discos de hidrogel Alg-Gel em diferentes formatações .....	81

Figura 16 – Análise qualitativa da presença de contaminantes em hidrogéis esterilizados em UV em diferentes intervalos de tempo.....	85
Figura 17 – Impressora extrusora utilizada na construção dos biocurativos personalizados e sistema de extrusão com seringa e agulha .....	88
Figura 18 – Etapas de obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) a partir de dupla centrifugação do sangue total.....	89
Figura 19 – Morfologia macroscópica de hidrogéis Alg-gel secos após 36, 48, 72 e 96 horas .....	91
Figura 20 – Perfil comparativo dos valores de pH dos hidrogéis preparados com água deionizada pH 5,7 e tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2.....	92
Figura 21 – Degradação dos hidrogéis de alginato-gelatina em função da perda de massa para filmes secos durante 120 minutos e hidrogéis de quatro camadas impressos desidratados ao longo de 120 horas .....	93
Figura 22 – Perfil de dilatação temporal de hidrogéis Alg-Gel padrão, com a variação de massa amostral e dilatação temporal .....	93
Figura 23 – Perfil de hidratação das amostras submetidas a lavagem em quatro etapas .....	94
Figura 24 – Projeção do modelo-base digital do hidrogel de quatro camadas utilizado para avaliação de parâmetros físico-químicos e mecânicos a partir do software de fatiamento Simplify3D, simulando extrusão da primeira camada do disco impresso, e preenchimento completo da 2ª camada, com a 3ª camada em início de deposição.....	95
Figura 25 – Disco Alg-Gel base utilizado para análises na configuração 4 camadas, 35% de densidade de preenchimento. Disco impresso pós-reticulado na configuração 4 camadas 100% densidade de preenchimento .....	96
Figura 26 – Efeito da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em quatro intervalos de tempo (0, 30, 60 e 90 minutos) após incubação de hidrogéis ( $\varnothing= 1$ cm) durante 48 horas para três meios de cultivo distintos .....	97
Figura 27 – Efeito da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em quatro intervalos de tempo após incubação de hidrogéis ( $\varnothing= 4$ cm) durante 48 horas em Ágar Sangue (AS) .....	98
Figura 28 – Modelos de feridas virtuais da coxa de manequins de simulação de traumas. Região lateral da coxa com laceração profunda; Seção anterior da coxa com úlcera de pressão.....	99

Figura 29 – Modelos de ferida profunda e superficial e construção de dispersão de pontos de similaridade em software de fotogrametria .....	99
Figura 30 – Geração de modelos por fotogrametria e parametrização de texturas em ferida profunda e superficial .....	100
Figura 31 – Construção do modelo virtual de biocurativo para simulação de laceração profunda. Ferida reconstruída em texturas e em malha triangular; Vista superior do preenchimento anatômico com cobertura ajustada virtualmente e em formato STL; Vista lateral do biocurativo .....	101
Figura 32 – Construção do modelo virtual de biocurativo para simulação de escara superficial. Ferida reconstruída em texturas e representada em malha triangular com suporte; Vista superior do preenchimento anatômico com cobertura ajustada virtualmente .....	102
Figura 33 – Fatiamento do biocurativo de ferida profunda no PrusaSlicer. Vista lateral do modelo, fatiado na mesa de impressão e distribuição do tempo de impressão.....	104
Figura 34 – Formatação do fatiamento do biocurativo para ferida superficial no PrusaSlicer.....	104
Figura 35 – Adequação do modelo virtual de impressão de ferida profunda com creme comercial.....	105
Figura 36 – Bioimpressão do curativo para laceração. Preparo da superfície com cloreto de cálcio; Extrusão do hidrogel sobre o ferimento teórico; Reticulação da superfície por aspensão de $\text{CaCl}_2$ ; Biocurativo anatômico.....	106
Figura 37 – Bioimpressão do curativo para escaras. Superfície impressa; Adesão do biocurativo após consolidação da reticulação .....	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros hematológicos plaquetários avaliados no isolamento do PRP .....	90
Tabela 2 – Parâmetros ideais de printabilidade para extrusão dos biocurativos Alg-Gel + PRP .....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADP</b>	Adenosina Di-fosfato
<b>Alg-Gel</b>	Alginato-Gelatina
<b>AM</b>	Manufatura Aditiva ( <i>Additive Manufacturing</i> )
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância ( <i>Analysis of Variance</i> )
<b>ASTM</b>	<i>American Society for Testing Materials</i>
<b>ATP</b>	Adenosina Tri-fosfato
<b>BDNF</b>	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro ( <i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>bFGF</b>	Fator de Crescimento Fibroblástico básico ( <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> )
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Cálcio
<b>CAD</b>	Modelagem Assistida por Computador ( <i>Computer-Aided Design</i> )
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CNC</b>	Comando Numérico Computadorizado ( <i>Computer Numerical Control</i> )
<b>dECM</b>	Matriz Extracelular Descelularizada ( <i>Decellularized Extracellular Matrix</i> )
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Água Destilada
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b><math>E_{(\rho)}PRP</math></b>	Eficiência na Recuperação das Plaquetas no PRP
<b><math>E_{(\rho)}PS</math></b>	Eficiência na Recuperação do Plasma
<b>ECM</b>	Matriz Extracelular ( <i>Extracellular Matrix</i> )
<b>EGF</b>	Fator de Crescimento Epidermal ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
<b>FC</b>	Fator de Crescimento
<b><math>F_{CP}</math></b>	Fator de Concentração Plaquetária
<b>FCL</b>	Faculdade de Ciências e Letras
<b>FDM</b>	Fusão por Modelagem e Deposição ( <i>Fused Deposition Modelling</i> )
<b>FvW</b>	Fator de Von Willebrand
<b>H</b>	Hematócrito



<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IGF</b>	Fator de Crescimento semelhante à Insulina ( <i>Insulin-like Growth Factor</i> )
<b>IPN</b>	Rede Polimérica Interpenetrante
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>MIT</b>	<i>Massachussets Institute of Technology</i>
<b>MRI</b>	Ressonância Magnética ( <i>Magnetic Resonance Imaging</i> )
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucleico mensageiro (RNA mensageiro)
<b>MSC</b>	Células Estromais Mesenquimais ( <i>Mesenchymal Stromal Cells</i> )
<b><math>N_{(pt)PRP}</math></b>	Concentração Plaquetária no PRP
<b><math>N_{(pt)ST}</math></b>	Concentração Plaquetária no Sangue Total
<b><math>N_L</math></b>	Concentração Leucocitária
<b><math>N_{PL}</math></b>	Concentração Plaquetária
<b>ONU</b>	Organização das Nações Unidas
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
<b>PDGF</b>	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta ( <i>Platelet-derived Growth Factor</i> )
<b>PEC</b>	Complexo Polieletrólito ( <i>Polyelectrolyte Complex</i> )
<b>pH</b>	Potencial Hidrogênio-iônico
<b>PMP</b>	Plasma Médio em Plaquetas
<b>PPP</b>	Plasma Pobre em Plaquetas
<b>PRP</b>	Plasma Rico em Plaquetas ( <i>Platelet-Rich Plasma</i> )
<b>PS</b>	Plasma Sobrenadante
<b>RM</b>	Medicina Regenerativa ( <i>Regenerative Medicine</i> )
<b>ROS</b>	Espécies Reativas de Oxigênio ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>SA</b>	Alginato de Sódio ( <i>Sodium Alginate</i> )
<b>SfM</b>	<i>Structure from Motion</i>
<b>SIPN</b>	Rede Polimérica Semi-interpenetrante
<b>ST</b>	Sangue Total
<b>STL</b>	Estereolitografia ( <i>Stereolithography</i> )

<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TE</b>	Engenharia de Tecidos ( <i>Tissue Engineering</i> )
<b>TERM</b>	Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos ( <i>Tissue Engineering and Regenerative Medicine</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de Crescimento de Transformação beta ( <i>Transforming Growth Factor beta</i> )
<b>UA</b>	Úlcera Arterial
<b>UNESP</b>	Universidade Estadual Paulista
<b>UPP</b>	Úlcera por Pressão
<b>UV</b>	Úlcera Venosa
<b><math>V_{(p)PRP}</math></b>	Volume de Plasma Rico em Plaquetas
<b><math>V_{(p)PS}</math></b>	Volume de Plasma no Sobrenadante
<b><math>V_{(p)ST}</math></b>	Volume de Plasma no Sangue Total
<b>VEGF</b>	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
<b><math>V_{ST}</math></b>	Volume de Sangue Total

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos .....	27
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>28</b>
3.1 Medicina Regenerativa e Engenharia Tecidual .....	28
3.2 Feridas Cutâneas .....	29
3.2.1 Tipos de Feridas .....	29
3.2.2 Feridas Crônicas.....	30
3.2.3 Classificação das Feridas Crônicas .....	31
3.2.4 Regeneração Tecidual.....	32
3.3 Plaquetas.....	35
3.3.1 Origem Biológica.....	35
3.3.2 Aspectos Fisiológicos.....	36
3.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	37
3.4.1 Mecanismos de Obtenção .....	37
3.4.2 Papel Biológico na Medicina Autóloga .....	38
3.5 Biocurativos .....	40
3.5.1 Histórico e Evolução dos Curativos Biológicos .....	40
3.5.2 Panorama Socioeconômico Atual e Biocurativos.....	42
3.5.3 Requisitos de um Biocurativo Ideal .....	43
3.6 Biomateriais.....	44
3.6.1 Conceitos e Aspectos Gerais.....	44
3.6.2 Potencial Terapêutico .....	46

3.6.3	Biopolímeros de Interesse Médico .....	47
3.7	Gelatina .....	49
3.7.1	Aspectos Físico-químicos .....	49
3.7.2	Papel Biológico na Medicina Regenerativa.....	50
3.8	Alginato.....	51
3.8.1	Origem Biológica e Aplicabilidade Comercial.....	51
3.8.2	Propriedades Físico-químicas.....	52
3.8.3	Curativos Biológicos de Alginato.....	54
3.8.4	Alginato e Engenharia de Tecidos .....	55
3.9	Blendas Poliméricas .....	57
3.9.1	Vantagens e Aplicabilidade.....	57
3.9.2	Processos de Obtenção.....	58
3.9.3	Blendas de Alginato-Gelatina (Alg-Gel) .....	59
3.10	Hidrogéis e Biotintas.....	60
3.10.1	Aspectos Gerais.....	60
3.10.2	Printabilidade de uma Biotinta .....	61
3.10.3	<i>Scaffolds</i> biológicos .....	63
3.11	Biomanufatura 3D .....	64
3.11.1	Histórico .....	64
3.11.2	Princípio da impressão 3D .....	65
3.11.3	Bioimpressão 3D.....	66
3.11.4	Técnicas de bioimpressão 3D.....	67
3.11.5	Construção de <i>scaffolds</i> biológicos por extrusão .....	69
3.11.6	Perspectivas clínicas no tratamento de feridas e novas abordagens terapêuticas .....	70
<b>4.</b>	<b>DESENHO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>

5.1	Isolamento e Padronização do Plasma Rico em Plaquetas .....	73
5.1.1	Obtenção de sangue total .....	73
5.1.2	Obtenção do PRP .....	73
5.1.3	Avaliação quantitativa dos componentes sanguíneos .....	74
5.2	Obtenção do biogel de alginato-gelatina/PRP .....	77
5.2.1	Materiais de preparo da blenda polimérica .....	77
5.2.2	Preparo do hidrogel .....	77
5.2.3	Adequação de PRP como adjuvante biológico .....	78
5.3	Caracterização Reológica do hidrogel .....	78
5.3.1	Densidade.....	78
5.3.2	Viscosidade.....	79
5.4	Adequação de Parâmetros de Impressão .....	79
5.4.1	Definição de Modelo-base de estudo.....	79
5.4.2	Definição dos parâmetros de máquina .....	80
5.4.3	Impressão do modelo de estudo.....	80
5.4.4	Pós-processamento do hidrogel .....	81
5.5	Análise físico-química do biomaterial .....	82
5.5.1	Aspecto Visual e Manuseabilidade .....	82
5.5.2	Degradação do Hidrogel .....	82
5.5.3	Capacidade de hidratação dos discos de hidrogel.....	83
5.6	Avaliação Antimicrobiana dos Hidrogéis.....	84
5.7	Automatização do processo de obtenção do biocurativo.....	86
5.7.1	Modelagem digital por fotogrametria (SfM) .....	86
5.7.2	Tratamento do modelo de biocurativo.....	86
5.7.3	Bioimpressão do modelo.....	87
5.8	Análise Estatística .....	88
5.9	Aspectos éticos.....	88

<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>89</b>
6.1 Avaliação dos Componentes do Sangue Total e PRP.....	89
6.2 Caracterização do Hidrogel .....	90
6.2.1 Propriedades Morfológicas e Organolépticas .....	90
6.2.2 Propriedades Químicas do Hidrogel .....	91
6.2.3 Parâmetros Físicos de Umidade.....	92
6.3 Caracterização Reológica do Hidrogel .....	94
6.4 Printabilidade do material padronizado.....	95
6.5 Avaliação de integridade Biológica nos Filmes Poliméricos .....	96
6.6 Sistema de Escaneamento por Reconstrução de Imagens .....	98
6.6.1 Reconstrução virtual das feridas.....	98
6.6.2 Construção virtual do biocurativo.....	100
6.6.3 Bioimpressão do biocurativo anatômico .....	104
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>107</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>117</b>
<b>9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>118</b>
<b>10. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>119</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>153</b>
11.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	153

## 1. INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa (RM) representa uma nova área de conhecimento que tem despertado grande interesse, não só de diferentes grupos de pesquisa das ciências biomédicas e bioengenharia, mas também das indústrias farmacêuticas e de dispositivos (*devices*) médicos. Todo este interesse é decorrente do grande potencial de aplicabilidade da RM em terapêutica humana e veterinária. Conceitualmente, a RM é um campo de saber interdisciplinar que resulta da aplicação e interação de diferentes áreas do conhecimento buscando manter, melhorar, reparar, regenerar ou substituir tecidos ou órgãos acometidos por diferentes patologias. Segundo Dieckmann et al (2010), a RM pode ser definida como o “reparo, substituição ou regeneração de células, tecidos e órgãos que restauram funções comprometidas decorrentes de defeitos congênitos, doenças, traumas e envelhecimento”.

A interação do conjunto de conhecimentos e técnicas específicas da medicina regenerativa (RM) e engenharia de tecidos (TE), referida atualmente pelo acrônimo TERM (Fisher & Mauck, 2013), tem permitido ampliar e otimizar o desenvolvimento de materiais sintéticos ou biológicos, denominados de biomateriais, os quais podem, ainda, atuar como arcabouços (*scaffolds*) para inserção de células ou diferentes tipos de moléculas, como citocinas, fatores de diferenciação e antibióticos, que podem contribuir para reparo e/ou regeneração de tecidos e órgãos com alterações morfofisiológicas.

No âmbito da TERM, os biomateriais podem agir como matriz de liberação de biomoléculas através de estímulos fisiológicos, tais como variações de temperatura, pH e força iônica do meio (Gimble et al., 2007). A associação a fatores de crescimento (FC) constitui uma importante ferramenta para reparo tecidual, regeneração ou restabelecimento de funções vitais normais de um tecido ou órgão (Oliveira et al., 2010). Como moléculas bioativas intimamente relacionadas à emissão de sinais para comunicação intercelular e estímulo do recrutamento de células inflamatórias no desencadeamento de respostas imunes, os fatores de crescimento são liberados a partir do processo de degranulação de plaquetas durante o desencadeamento do processo inflamatório e estão associados à migração, diferenciação e apoptose celular, em uma cascata que visa garantir a

homeostasia do organismo (Picard et al., 2015; Pinto & Pizani, 2015; Anitua et al., 2020; Stessuk, 2020; Oneto & Etulain, 2021).

Utilizado amplamente desde o início da década de 90 em estudos de cicatrização tecidual e regeneração do tecido ósseo, o plasma rico em plaquetas (PRP) tem se destacado como extensa fonte de biomoléculas de funções primordiais na diferenciação e regeneração de tecidos (Perez, 2013, Marques et al., 2015, Stessuk et al, 2020). Como uma pequena fração de plasma com concentração autóloga plaquetária maior do que a encontrada em níveis basais (Marx et al., 1998; Vendramin et al., 2009; Amable, et al., 2013), o PRP desempenha uma importância crucial no processo de regeneração tecidual, uma vez que a liberação de moléculas bioativas promove uma série de atividades regulatórias, que envolvem quimiotaxia, síntese de matriz extracelular e citodiferenciação, ativando a sinalização de vias que promovem a regeneração de tecidos lesados, maximizando o reparo de danos em lesões teciduais (Marques et al., 2015) e otimizando o processo regenerativo por estímulo da vascularização e hemostasia (neoangiogênese), reduzindo possíveis complicações associadas à lesão (Kontopodis et al., 2015; Stessuk, 2020; Borrione et al., 2021; Lv et al., 2021).

Entre os biomateriais mais comumente utilizados em procedimentos clínicos encontram-se os polímeros, que apresentam maior maleabilidade, facilidade de obtenção e processamento em formas variadas (biofilmes, suturas, partículas), acessibilidade de custo e disponibilidade de materiais com propriedades físico-mecânicas requeridas em usos específicos (Wong & Bronzino, 2012; Pires et al., 2015).

No contexto do mercado crescente de aplicação biológica dos polímeros, os polissacarídeos apresentam-se como fonte atrativa em função de suas propriedades mecânicas, alta disponibilidade e baixo custo, polaridade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e multifuncionalidade, incluindo aplicações como constituintes de agentes espessantes, emulsificantes e hidratantes, além da capacidade de formarem géis sob parâmetros termodinâmicos bem definidos, de fundamental relevância alimentícia, cosmética e, primordialmente, farmacêutica e médica, credenciando-os como bons candidatos em metodologias de produção de biomateriais de interesse terapêutico (Bueno et al., 2015; Zhu et al., 2019; Hu & Xu, 2020; Murugan et al., 2021). Dentre os polissacarídeos que têm atraído a busca de pesquisadores na elucidação de atividades biológicas e na constituição de



biomateriais de potencial terapêutico, destaca-se o alginato, um polímero natural biocompatível e de alta pureza presente na parede celular bacteriana de *Azotobacter* e em uma ampla gama de algas marinhas marrons (Moradali et al., 2018).

No contexto da constituição de hidrogéis, a manufatura aditiva, também denominada impressão tridimensional (3D), tem proporcionado grandes inovações técnicas e avanços que possibilitaram a impressão de materiais biocompatíveis, incluindo componentes de suporte, como é o caso dos *scaffolds*. Como tecnologia que emprega componentes vivos para construção de materiais camada a camada, a bioimpressão 3D tem sido aplicada em abordagens de tecidos e órgãos para a realização de transplantes, envolvendo complexidades associadas à seleção de materiais, tipos de células aderentes, bem como a agregação de fatores de crescimento e diferenciação, levando-se em conta a sensibilidade das células na construção de tecidos (Murphy & Atala, 2014; Pina et al., 2019; Ghosh et al., 2021).

A bioimpressão 3D à base de extrusão é uma ferramenta universal para deposição e construção de um amplo espectro de biomateriais, oferecendo alta flexibilidade e grau de reprodutibilidade entre *scaffolds* bioimpressos quando empregados materiais adequados, essencialmente polímeros constituintes de géis. O sucesso da técnica depende de parâmetros estruturais, como o diâmetro da agulha de distribuição para deposição do material, viscosidade do biopolímero, velocidade de impressão e pressão de extrusão, oferecendo vantagem na capacidade de formatação de estruturas porosas e rapidez na construção de suportes de propriedades biomecânicas aprimoradas, que não podem ser equivalentemente alcançadas com uso de *laser* ou gotas (Hospodiuk et al., 2017).

A biocompatibilidade e semelhança de *scaffolds* poliméricos com a matriz extracelular (ECM), fatores primordiais para a aplicação terapêutica, têm encontrado, nas blendas de alginato e gelatina, um hidrogel que constitui um forte candidato para aplicações em bioimpressão (Aljohani et al., 2018; Moraes et al., 2020). Estudos demonstraram a eficácia do emprego de membranas de alginato na aceleração do processo de cicatrização em feridas cutâneas experimentais, com modulação da fase inflamatória, estímulo da fibroplasia e síntese de colágeno em modelos murinos e porcinos, com restauração das características dermo-epidérmicas do tecido nativo (Caetano et al., 2015; Albanna et al., 2019).

Concomitantemente, o emprego do PRP em formulações oferece risco mínimo de reações imunológicas ou contaminações virais, combinadas a um

ambiente altamente concentrado em fatores de crescimento (Sadeghi-Ataabadi et al., 2017; Stessuk, 2020). Nestas abordagens, a combinação do PRP como componente bioativo a um suporte polimérico caracteriza uma formulação de biotinta, definida pela presença de células, biomateriais e substâncias biológicas adicionais que sustenta a formação de tecidos e propicia um ambiente adequado à migração, proliferação e diferenciação celular (Kacarevic et al., 2018; Skardal et al., 2018; Nikolova et al., 2019; Aiman et al., 2021; Subramanian et al., 2021).

Embora progressos notáveis tenham sido alcançados no campo da bioimpressão 3D nos últimos anos, faz-se necessário o estabelecimento de processos metodológicos padronizados, de forma que sejam obtidos produtos mais eficientes e robustos, em nível de bancada, para promover a transição da pesquisa básica para a farmacêutica e aplicações clínicas (“*from bench to bedside*”). Do mesmo modo, apesar de inúmeros estudos correlatos na literatura empregarem hidrogéis de alginato em associação com diversos tipos de outros biomateriais, células e biomoléculas, não foram encontrados relatos prévios na literatura quanto à projeção virtual de um curativo personalizável para uso terapêutico de alginato em associação ao PRP baseado no escaneamento a partir de uma ferida virtual com diferentes formatos em membros inferiores. Neste sentido, tudo o que sabemos é que há um único relato quanto à projeção virtual de feridas utilizando *scaffolds* biológicos de alginato e colágeno, realizado por pesquisadores da Wake Forest University, envolvendo decelularização e recelularização de matriz polimérica (Albanna et al., 2019).

Tendo como base as premissas, a impressão de um biocurativo, composto de um biogel polimérico de alginato e gelatina associado ao plasma rico em plaquetas, modelado por escaneamento de uma lesão virtual poderá, a curto prazo, fundamentar o estabelecimento de um bioprocesso como uma nova alternativa terapêutica viável e reproduzível para regeneração de feridas cutâneas por meio de um processo de bioimpressão 3D *in situ*.

A fim de verificar esta hipótese buscou-se, com esta proposta de caráter inédito, inovador e incremental, constituir as bases metodológicas para produção automatizada de uma membrana composta por uma matriz de alginato/gelatina, utilizando o PRP como fonte de fatores de crescimento para estimulação do processo regenerativo, aliando os avanços recentes na bioimpressão 3D e introduzindo a inovação das técnicas de modelagem de lesões virtuais por meio do

escaneamento de feridas cutâneas, possibilitando a aplicação de um tratamento baseado em um produto com potencial biocurativo acessível, de caráter autólogo e personalizado para cada ferida, com base no desenvolvimento e padronização prévia do produto a partir da reconstrução de feridas virtuais por fotogrametria, técnica baseada na reprodução de uma estrutura tridimensional a partir da combinação de fotografias em movimento (*SfM* ou *Structure from Motion*), alternativa substancialmente mais acessível frente aos equipamentos de escaneamento hoje disponíveis no mercado.

Cabe destacar, portanto, o que se convencionou denominar neste estudo como “feridas virtuais” corresponde a desenhos de feridas e úlceras projetadas em membros inferiores ou braço de modelos de bonecos anatômicos de enfermagem. Este procedimento representa uma prova de conceito que utiliza simulações de feridas em indivíduos saudáveis – sem feridas reais, portanto, feridas virtuais.

Com base neste escopo, empregando um modelo-base obtido em impressão 3D por extrusão, foram avaliadas diferentes características físico-químicas e biológicas na composição e estabilidade do biomaterial, a partir da análise macroscópica do material, hidratação e degradação temporal e ensaio de esterilidade dos *scaffolds* poliméricos por exposição à luz ultravioleta. Estes dados visaram fornecer os parâmetros necessários para definição das proporções de componentes constituintes do gel, bem como na implementação da manufatura aditiva e viabilização do processo de obtenção do biomaterial como curativo biológico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Propor um bioprocesso personalizado de manufatura aditiva de hidrogéis alginato-gelatina associados a Plasma Rico em Plaquetas (PRP) como uma nova alternativa para a produção de biocurativos definidos morfologicamente a partir do escaneamento de feridas cutâneas

### **2.2 Objetivos específicos**

- Adequar uma metodologia de obtenção de *scaffold* de composição polimérica de alginato-gelatina;
- Avaliar a associação de PRP na composição de uma biomembrana polimérica por análise dos parâmetros físico-químicos e capacidade de gelificação do biomaterial;
- Padronizar uma metodologia de escaneamento de úlceras cutâneas virtuais em modelos anatômicas
- Padronizar a aplicação de biomembrana de alginato-gelatina/PRP como nova alternativa terapêutica a partir do escaneamento de úlceras em modelos anatômicos (modelos virtuais de úlceras humanas)
- Automatizar a produção de uma biomembrana por impressão tridimensional por extrusão de gel polimérico

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Medicina regenerativa e engenharia tecidual

O conceito de engenharia de tecidos (TE) foi inicialmente proposto, no clássico artigo de Langer e Vacanti, publicado em 1993, como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida no desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar, manter ou melhorar a função de tecidos (Bellini et al., 2012). Concomitantemente, a medicina regenerativa (RM) representa uma nova área de conhecimento que tem despertado grande interesse, não só de diferentes grupos de pesquisa das ciências biomédicas e bioengenharia, mas também das indústrias farmacêuticas e de dispositivos (*devices*) médicos. Todo este interesse é decorrente do grande potencial de aplicabilidade da RM em terapêutica humana e veterinária.

Segundo Katari et al. (2015), a TE corresponde a um subcampo da RM, possuindo um escopo mais restrito e definido estritamente como a manufatura de tecidos do corpo *ex vivo*, por semeadura de células sobre e/ou no interior de uma matriz de suporte. Deste modo, a ênfase da Engenharia de Tecidos direciona-se aos aspectos de manufatura de materiais envolvidos na substituição tecidual, enquanto a Medicina Regenerativa concorre com o aspecto celular da substituição de tecidos, essencialmente na formação endógena.

A relação do conjunto de conhecimentos convergentes dos avanços nas áreas de terapia celular, biologia molecular, engenharia tecidual e de materiais geraram uma interface oriunda da confluência entre os objetivos da medicina regenerativa e engenharia tecidual, estabelecendo uma nova terminologia, a partir dos acrônimos TE e RM, a ETMR ou TERM - *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Fisher & Mauck, 2013; Salgado et al., 2013), resultante da intersecção de ambas as áreas na busca de metodologias avançadas para resolução de problemas terapêuticos.

Como amplo campo de pesquisa em terapia clínica e de grande potencialidade terapêutica em medicina humana e veterinária, a TERM compreende diferentes abordagens, que visam regenerar ou substituir tecidos e órgãos lesados em tipos variados de disfunções de ordem aguda ou crônico-degenerativa promovendo uma combinação efetiva de sinais bioquímicos, condições físico-

mecânicas e celulares (Sharma et al., 2019; Lanza et al., 2020; Chaudhari et al., 2021).

Estudos envolvendo o uso de materiais sintéticos e biológicos, denominados biomateriais, e interação com células e fatores de crescimento liberados para estimulação do processo regenerativo, sobretudo em aplicações envolvendo o reestabelecimento de tecido epitelial em feridas cutâneas, onde a construção de suportes (*scaffolds*) para adesão e inserção de células, antibióticos e fatores bioativos que contribuem para a reparação e regeneração de tecidos e órgãos com alterações morfológicas e/ou funcionais, têm demonstrado avanços no reconhecimento da eficácia terapêutica e segurança desta associação no contexto da engenharia tecidual (Xue et al., 2018; Talikowska et al., 2019; Chen et al., 2020; Golchin et al., 2021).

## **3.2 Feridas cutâneas**

### **3.2.1 Tipos de feridas**

Fundamental no desempenho de funções primordiais no organismo, a pele, em seu estágio normal, é descrita como lisa, íntegra, elástica, sem brilho ou sinais de lesões (Sorg et al., 2017). Paralelamente, é o maior órgão do corpo humano e o mais suscetível e afetado por injúrias. No aspecto social, a prevalência de lesões cutâneas pode conduzir portadores a traumas psicológicos e isolamento social, além da limitação de atividades cotidianas.

Causadas por agentes de natureza química, física ou biológica, as feridas caracterizam-se pela ruptura estrutural e fisiológica do tegumento, membrana mucosa ou outra parte do corpo, em graus variados de profundidade e extensão. Feridas superficiais estão restritas a epiderme, derme e hipoderme, enquanto as feridas profundas alcançam músculos, fáscias, articulações, ligamentos, tendões, vasos sanguíneos e órgãos cavitários (Malagutti & Kakihara, 2014; Sorg et al., 2017).

A classificação das feridas quanto à sua etiologia abrange as lesões patológicas, associadas a fatores endógenos ou lesões secundárias; iatrogênicas, quando resultam de tratamentos ou procedimentos médicos; cirúrgicas ou intencionais, provocadas por necessidade terapêutica; feridas acidentais ou

traumáticas; e feridas de causa externa, onde incluem-se as queimaduras e úlceras por pressão (Sorg et al., 2017).

Em relação à evolução do tratamento, são compreendidas em feridas agudas, quando possuem uma resposta eficaz de cicatrização e recomposição tecidual sem complicações, e as feridas crônicas, de longa duração e frequentes reincidências (Geovani, 2014). Para casos de ferimentos que abrangem a espessura total da pele, a reepitelização completa leva um longo tempo (Varaprasad et al., 2020).

A recuperação frente a um acometimento de natureza crônica encontra nos quadros patológicos, como diabetes *mellitus*, insuficiência crônica venosa, arterial e imunológica, os maiores desafios na administração de feridas, sendo o objeto primordial e de constante investigação pelas abordagens terapêuticas da Medicina Regenerativa (Varaprasad et al., 2020).

### **3.2.2 Feridas crônicas**

A ocorrência de feridas crônicas resulta de uma gama de fatores que acarreta o comprometimento das condições normais de reconstrução e regeneração tecidual, entre os quais pode-se citar as condições patológicas, idade avançada ou deficiência nutricional (Liu et al., 2018). Como decorrência, a gravidade dos impactos socioeconômicos, em escala de saúde pública mundial, está relacionada ao sofrimento dos portadores e familiares, associado a dores, estresse psicológico e prejuízo em qualidade de vida, ao passo que esta condição requer maior dependência de serviços de saúde, ampliando os custos de tratamento (Karimkhani et al., 2017; Cabral et al., 2018). Ademais, portadores de feridas crônicas são afligidos pela aceitação da própria imagem perante as interações sociais, limitando-as ou privando-as pelo estigma associado à ruptura da pele, associada com frequência à liberação de odores e secreções (Almeida et al., 2013; Salomé et al., 2016; Docking et al., 2018).

Feridas crônicas que não cicatrizam em período superior a 3 meses e são incapazes de restaurar a integridade anatômica e funcional através de um processo de reparo ordenado são denominadas feridas refratárias. Nestes casos, o tratamento é oneroso devido à etiologia dificultada e duração prolongada, direcionando-se ao

encurtamento deste intervalo e redução de estresse gerado ao paciente (Liao et al., 2020).

### **3.2.3 Classificação das feridas crônicas**

Dentre as feridas crônicas que apresentam maior relevância na prática clínica, encontram-se as úlceras por pressão, úlceras venosas, úlceras arteriais e pé diabético (Stessuk et al., 2016; Sorg et al., 2017).

As úlceras por pressão (UPP) originam-se da compressão prolongada ou pressão relacionada à fricção ou cisalhamento de pele e tecidos circundantes sobre proeminências ósseas. É comum em pacientes acamados e possui maior incidência em idosos como consequência da redução de espessura da pele e das fibras elásticas, além do enrijecimento do colágeno. A diminuição de tecido adiposo subcutâneo e da irrigação por capilares da derme dificultam o fornecimento de sangue e levam à desidratação que predispõe o surgimento de úlceras desta magnitude (Souza et al., 2017).

As úlceras venosas (UV) são oriundas de distúrbios fisiopatológicos, como hipertensão venosa, varizes secundárias e edemas que, após traumatismo, aparecem como complicações tardias resultantes de insuficiência venosa (Serrano et al., 2017). Caracterizam-se anatomicamente pela perda de tecido superficial de forma irregular, que podem evoluir para lesões profundas delimitadas com bordas bem definidas, de exsudato amarelo e presença de eczemas, edema, hiperpigmentação, lipodermatoesclerose e eritema nas regiões próximas à ferida (Malagutti & Kakihara, 2014).

Úlceras arteriais (UA) são provenientes do impedimento parcial ou total do fornecimento sanguíneo arterial por consequência de inflamação e degeneração de vasos saturados por ateromas (placas de colesterol de baixa densidade), células e tecidos degradados. Decorrem de traumatismos em áreas de proeminências ósseas onde o leito da ferida é demarcado pelo tecido necrosado. Diferentemente das UV, as UA provocam dor em membros em estado de repouso, intensificando-se na distensão ou elevação do membro. O acometimento em pessoas acima de 45 anos é mais frequente, com prognóstico de evolução para isquemia e agravamento da patologia (Salomé et al., 2016).



Resultante de complicações do diabetes *mellitus*, o pé diabético é um tipo de úlcera associada a predisposições a infecções e deformidades resultantes de dificuldades biomecânicas que resultam em micro e macrovasculopatias e neuropatias. Cerca de 25% dos portadores que foram acometidos pela patologia desenvolvem feridas crônicas que podem levar a amputações de membros inferiores em 70-84% dos casos de maior severidade, caso não tratadas de maneira adequada e com acompanhamento clínico. Nestes casos em que o quadro patológico é intensificado, o comprometimento tecidual estende-se a estratos mais profundos ou irradia pelos membros inferiores (Massee et al., 2016; Scain et al., 2018; Souza et al., 2017).

Em face destas variações de cronicidade de feridas, os tratamentos oferecem alternativas paliativas aos pacientes onde, na maioria das vezes, o objetivo centra-se em oferecer amparo, dignidade, conforto, alívio de sofrimento e melhora da estima e qualidade de vida (Woo et al., 2015; Koehler et al., 2018). Desta forma, a necessidade constante pela busca de alternativas terapêuticas inovadoras que promovam o processo regenerativo com eficácia e qualidade à medida que previnem a ocorrência de recidivas e complicações mostram-se primordiais aos sistemas de saúde, sobretudo na esfera pública.

### **3.2.4 Regeneração tecidual**

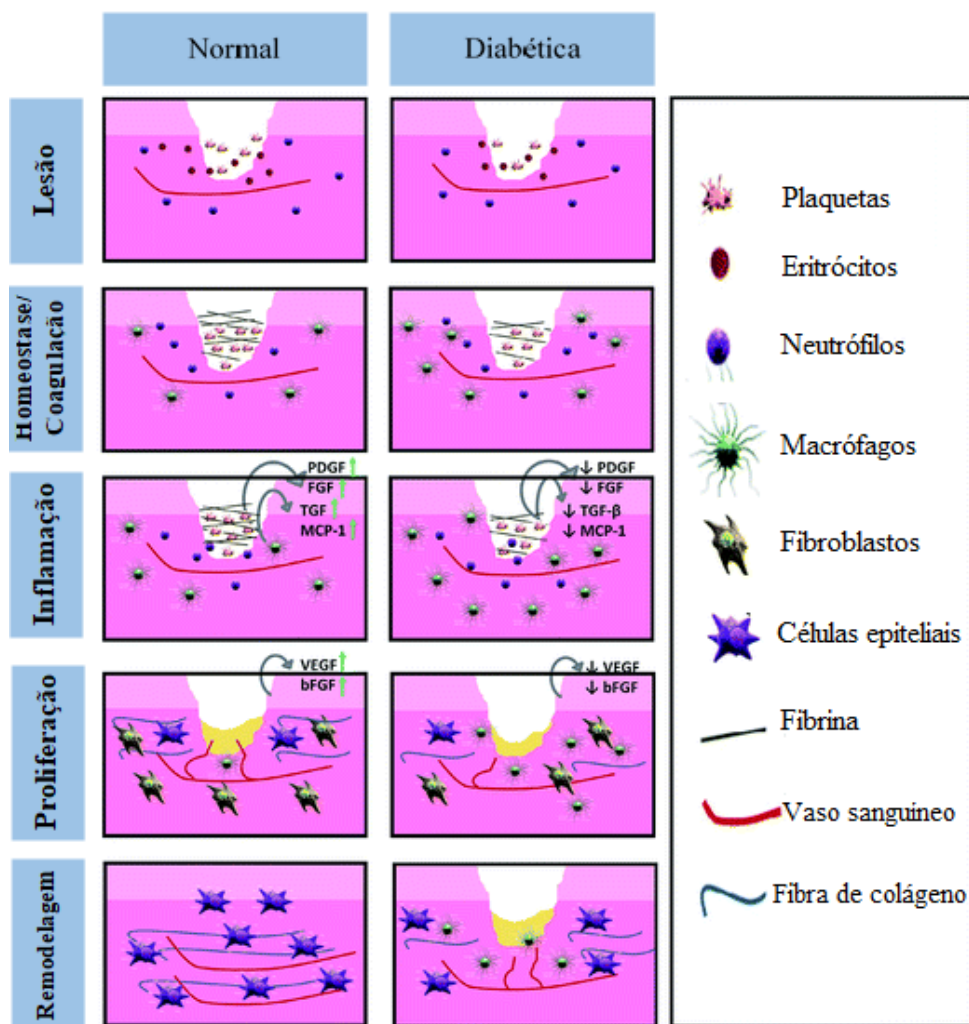
Em condições normais, o organismo é capaz de restaurar a integridade da pele após uma lesão com mínima cicatrização, por meio de um processo interativo e dinâmico (Liu et al., 2018). Este processo resulta na recomposição da barreira de proteção oferecida pela pele, destruição e remoção de patógenos invasores, desbridamento, neovascularização e restauração do local lesionado, de forma que este assemelhe-se ao tecido não lesionado (Daunton et al., 2012).

O processo de reconstituição tecidual de uma ferida em estado agudo, conhecida como cicatrização, é compreendida em quatro fases bem definidas. Sinteticamente, a fase de hemostase é caracterizada pela formação de coágulo de fibrina visando a interrupção de sangramentos, agregação e adesão plaquetária, liberação de agentes vasoativos para coagulação e quimiocinas para atração de células inflamatórias; A inflamação compreende a resposta imune corporal, com atração inicial de neutrófilos para eliminação de antígeno do leito da ferida e,

posteriormente, entrada de macrófagos para controlar processos de reparo e atuar no desbridamento; A proliferação celular e deposição de matriz, representada pela formação de tecido de granulação, novos vasos sanguíneos e nova camada epitelial; E a remodelagem, com reorganização da matriz extracelular a um ponto mais próximo do tecido saudável, recomposição do colágeno e formação de cicatriz (Rehm & Moradali, 2018).

A cicatrização é concluída com restauração de até 80% da resistência à tração no local afetado (Daunton et al., 2012). As diferenças entre os processos regenerativos de feridas normais e crônicas, como no caso do diabetes, estão representadas na Figura 1.

**FIGURA 1.** Etapas de regeneração tecidual em escala celular em feridas cutâneas de etiologia normal e diabética. Adaptado de LIU et al. (2018)



Em um contexto microfisiológico, o estágio inflamatório tem início após agregação e degranulação plaquetária, com liberação de serotonina e histamina, moléculas bioativas que promovem amplificação da permeabilidade endotelial capilar e atraem células inflamatórias para o local lesionado. Macrófagos, neutrófilos e outros leucócitos atuam na fagocitose do material oriundo de lise celular (Bennett & Schultz, 1993; Schultz et al., 2003; Marques et al., 2015). Ao fim desta etapa, há um número reduzido de células anti-inflamatórias e síntese de colágeno, elastina e demais componentes da matriz celular pelos fibroblastos, marcando o início da cicatrização (Sánchez et al., 2012; Santos, 2017). Células epiteliais residuais ou migradas para a área lesionada multiplicam-se e formam cicatrizes em estágio inicial, que são remodeladas por meio de um balanço entre degradação por proteases e produção de matriz extracelular, além de redução de fibroblastos e capilares por mecanismo apoptótico (Stessuk et al., 2020).

A formação do novo tecido ocorre em período de 2 a 10 dias após lesão, com reconstituição vascular por meio de neoangiogênese, processo de composição de novos vasos que atuarão na oxigenação e fornecimento de nutrientes ao local atingido por lesão. A fase proliferativa caracteriza-se pela formação do tecido de granulação, composto por fibroblastos, capilares, macrófagos, ácido hialurônico, fibronectina e colágeno, além de intensa ação de fibroblastos por estímulo de citocinas, resultando na deposição de matriz extracelular, de natureza colágena e com presença de elastina e mucopolissacarídeos.

A liberação de concentrações elevadas de fatores de crescimento é promovida por plaquetas e leucócitos e amplificada por macrófagos, estimulando aumento da concentração celular de tipos específicos, migração de fibroblastos, angiogênese e fibroplasia, que compreende a produção de colágeno (Stessuk et al., 2020). Os fatores de crescimento (FC) constituem-se de moléculas biologicamente ativas, categorizadas no grupo das citocinas, relacionadas à emissão de sinais para comunicação intercelular e estímulo do recrutamento de células inflamatórias no desencadeamento de respostas imunes, na migração, diferenciação e apoptose, a partir da associação a receptores da membrana celular, transdução de sinal por ativação de genes e propagação para o meio intracelular (Fernández-Delgado et al., 2012; Centeno et al., 2013; Picard et al., 2015; Pinto & Pizani, 2015). Dentre os fatores de crescimento que influenciam diretamente a reparação tecidual encontram-

se o PDGF (indução de síntese de colágeno tipo I), TGF- $\beta$ , EGF, BDNF, bFGF e IGF (Singer & Clark, 1999; Bhanot & Alex, 2002; Stessuk, 2016).

Como fonte multimolecular natural de citocinas de origem autóloga, as plaquetas apresentam-se como potencial promissor em aplicações da medicina regenerativa, dada a complexidade dos processos envolvidos e disponibilidade de moléculas críticas envolvidas nos mecanismos de reparo tecidual (Santos, 2017). Somado a elas, a proposição de novas vertentes de curativos que promovam a interação com a ferida e a liberação destas moléculas bioativas que mantêm condições favoráveis à homeostase da pele têm sido o alvo de tratamentos precoces significativamente eficazes que visam reduzir o tempo de fechamento da lesão e a formação de cicatrizes hipertróficas danosas ao tecido, promovendo maior qualidade de vida aos pacientes acometidos por tais tipos de lesões (Albanna et al., 2019; Varaprasad et al., 2020).

### **3.3 Plaquetas**

#### **3.3.1 Origem biológica**

As plaquetas ou trombócitos são pequenos fragmentos citoplasmáticos anucleados de morfologia discoide simples, diâmetro aproximado variável entre 2 e 4  $\mu\text{m}$  e complexa estrutura de organelas e grânulos de liberação orquestrada de moléculas bioativas atuantes no estímulo do processo cicatricial (Kickler, 2006; Monteiro, 2013; Marques et al., 2015; Teixeira et al., 2018).

A região periférica plaquetária é formada por um sistema membranoso, onde a camada externa contém receptores de intermediação das reações de adesão e ativação plaquetária. O conjunto de membranas constitui as paredes dos canais que promovem a interface da superfície com o sistema canicular aberto, efetuando a liberação do denso conteúdo citoplasmático granular no contato com a membrana das plaquetas (Everts, 2006). A matriz citoplasmática compõe-se de estruturas contráteis para alteração morfológica, motilidade interna e secreção (Perez, 2013).

A formação das plaquetas deriva do processo de fragmentação citoplasmática dos megacariócitos oriundos da medula óssea, onde células-tronco hematopoiéticas proliferam-se e diferenciam-se, originando os precursores das células circulantes do sangue. As células progenitoras mieloides, das quais os

megacariócitos são provenientes, diferenciam-se e sofrem maturação, com aumento de volume do conteúdo citoplasmático de ribossomos, peroxidase plaquetária e grânulos por estímulo da presença de citocinas, como a trombopoetina. Uma vez maduros, os megacariócitos formam projeções protoplaquetárias em vasos sinusoides, das quais originam-se as plaquetas circulantes (Teixeira et al., 2018).

### 3.3.2 Aspectos fisiológicos

O conteúdo do citoplasma plaquetário apresenta mitocôndrias, lisossomos, mRNA e elevada concentração de grânulos, caracterizados em grânulos alfa e grânulos densos, de atividade autócrina e parácrina, como a quimiotaxia, estímulo da proliferação e diferenciação celular, bem como regulação da angiogênese, fundamentais na cascata regenerativa tecidual (Castro et al., 2006; Marques et al., 2015; Conceição et al., 2017). Os grânulos-alfa apresentam diversas proteínas adesivas (fibrinogênio e fibronectina), enzimas, fatores de coagulação e de crescimento, moléculas bioativas como o fator de von Willebrand (FvW). Concomitantemente, os grânulos densos agregam moléculas energéticas, como adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP), além de cálcio e serotonina (Stessuk, 2016; Castro et al., 2006; Everts et al., 2006).

Na corrente sanguínea, em condições fisiológicas normais, as plaquetas circulam sem aderirem ao endotélio, em uma concentração média compreendida entre  $1,5$  e  $4,0 \times 10^5$  plaquetas/mm<sup>3</sup> e meia-vida *in vivo* de sete a dez dias (Perez, 2013; Stessuk, 2016). A ocorrência de danos teciduais promove o recrutamento de plaquetas para o local da lesão, aderindo ao colágeno subendotelial por contato dos ligantes da membrana plaquetária ao fator de von Willebrand. Este contato promove adesão ao endotélio sanguíneo e ativação plaquetária, seguindo-se a mobilização de mais plaquetas circulantes (Teixeira et al., 2018). Iniciada a cascata de coagulação, ocorre liberação de citocinas e fatores homeostáticos e de crescimento, constituindo um coágulo rico em plaquetas por ativação da cascata da trombina, quebra da molécula de fibrinogênio e formação de uma rede de fibrina. Esta sequência de eventos origina o tampão hemostático, que inicia o mecanismo de reparo da lesão endotelial (Everts et al., 2006; Dhillon et al., 2012; Marques et al., 2015; Perez, 2013; Teixeira et al., 2018).

### **3.4 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)**

#### **3.4.1 Mecanismos de obtenção**

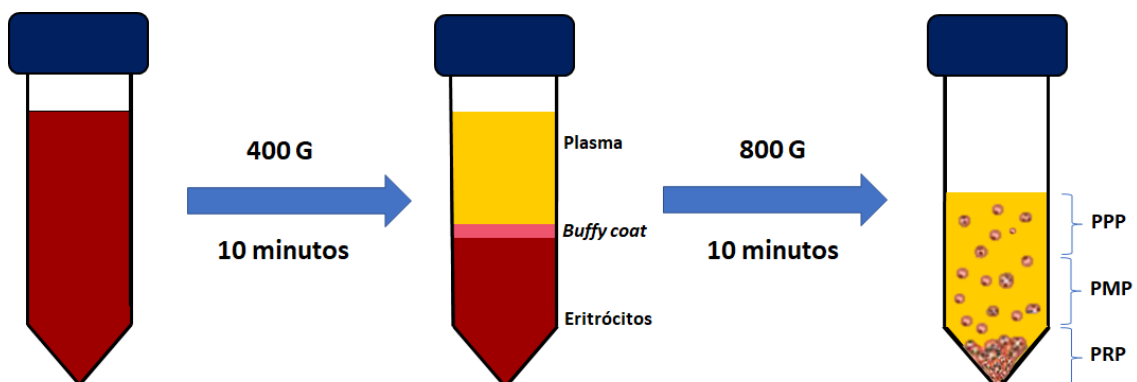
Nas últimas décadas, sobretudo no início da década de 90 em estudos de cicatrização tecidual e regeneração do tecido ósseo, o Plasma Rico em Plaquetas (PRP), no contexto da medicina regenerativa autóloga, tem se destacado como extensa fonte de biomoléculas de funções primordiais na diferenciação e regeneração de tecidos (Perez, 2013; Marques et al., 2015; Oneto & Etulain, 2021). Obtido por técnica não invasiva, não-cirúrgica e segura, têm fornecido resultados promissores no tratamento de diferentes patologias, tais como lesões agudas e crônicas no tecido ósseo e cartilaginoso, além de úlceras cutâneas e diabéticas (Abdullah et al., 2019; Gentile et al., 2020; Xu et al., 2020; Dos Santos et al., 2021).

O emprego terapêutico clínico do PRP é fundamentado na capacidade de estimulação da produção e aumento na secreção de proteínas, liberação de fatores de crescimento e citocinas que maximizam o reparo de danos em lesões teciduais (Marques et al., 2015). Frações plaquetárias enriquecidas otimizam o processo cicatricial, estimulando vascularização e hemostasia e reduzindo possíveis complicações associadas à lesão (Vendramin et al., 2006; Kontopodis et al., 2015; Stessuk, 2016). A versatilidade dos processos envolvidos nas preparações, aliada à biossegurança e potencialidades terapêuticas, credenciam o PRP como eficiente recurso de aplicação em medicina regenerativa e têm estimulado recentes pesquisas associadas ao entendimento de vias moleculares e mecanismos de ação a nível celular decorrentes de seu uso (Sánchez et al., 2012; Cho et al., 2019).

Define-se o PRP como uma pequena fração de plasma com concentração autóloga plaquetária maior do que a encontrada em níveis basais, obtida por meio de dispositivos comerciais encontrados na forma de kits ou protocolos que envolvem diferentes parâmetros de centrifugação, associados ao número de etapas, tempo e força centrífuga de separação dos componentes do sangue total (Marx et al., 1998; Vendramin et al., 2009; Amable, et al., 2013; Marques et al., 2015). De acordo com a metodologia, pode-se obter PRPs com concentração de plaquetas de 3 a 5 vezes superior à encontrada em valores basais (Mazzocca, 2012; Stessuk, 2016). Além da concentração plaquetária, há variação verificada na quantidade de eritrócitos e leucócitos, peculiaridades que dificultam a padronização de um produto na comparação entre modelos autólogos (Stessuk, 2016).

Os protocolos de produção do PRP empregam de uma a duas etapas de centrifugação diferencial para a separação da fração plasmática e células vermelhas (eritrócitos) do sangue não-coagulado. Por apresentarem maior densidade, os eritrócitos concentram-se na porção inferior do tubo, enquanto o plasma com plaquetas mantém-se em suspensão. Na interface entre as camadas, encontra-se uma região formada por leucócitos e plaquetas maiores, de aspecto fino e esbranquiçado, denominada zona de névoa (*buffy coat*). A camada formada pelo plasma pode ser subdividida em frações distintas em sua concentração plaquetária: a fração pobre em plaquetas (PPP), porção intermediária (PMP) e fração rica em plaquetas, da qual o PRP é proveniente (Figura 2) (Montero et al., 2015; Marques et al., 2015).

**FIGURA 2.** Processamento do sangue total para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) a partir da centrifugação diferencial em duas etapas. Adaptado de SANTOS (2017)



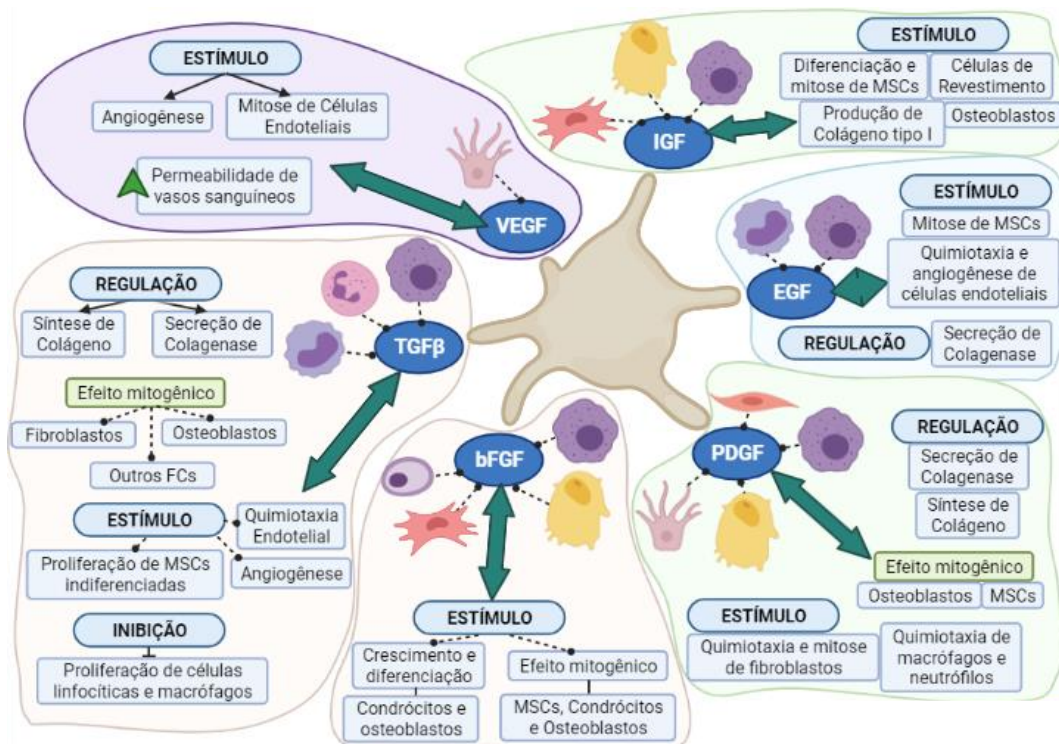
### 3.4.2 Papel biológico na medicina autóloga

A presença de concentrado de plaquetas atribui ao PRP uma importância crucial no processo de regeneração tecidual, uma vez que a liberação de moléculas bioativas promove uma série de atividades regulatórias, que envolvem quimiotaxia, síntese de matriz extracelular e citodiferenciação, ativando a sinalização de vias que promovem a cicatrização de tecidos lesados (Marques et al., 2015; Santos, 2017).

Tais funções mediadoras são conferidas pelos fatores de crescimento, dentre os quais destacam-se o fator de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Figura 3).

Estas moléculas atuam na regulação da migração celular por estímulos quimiotáticos, mitogênese, diferenciação celular, angiogênese, síntese e secreção de colágeno para restauração e remodelagem tecidual, justificando a relevância de emprego terapêutico do PRP em diferentes campos da medicina regenerativa (Barrientos et al., 2008; Marques et al., 2015; Montero et al., 2015; Pinto & Pizani, 2015).

**FIGURA 3.** Fisiologia dos fatores de crescimento derivados de plaquetas e fontes diversas. Adaptado de MARQUES et al. (2015)



Historicamente, o advento da medicina regenerativa autóloga possibilitou a aplicação terapêutica do PRP a partir da década de 1980, quando verificou-se a presença de moléculas bioativas de propriedade cicatrizante nas plaquetas, capacidade de liberação para início do processo de reparo de tecidos e vasos lesados em úlceras cutâneas, bem como os mecanismos efetores da atividade regenerativa (Knighton et al., 1986; Margolis et al., 2001; Sánchez et al., 2012). O primeiro estudo clínico descrito na literatura data de 1987, relatando o emprego de PRP autóloga como componente adjuvante benéfico, em detrimento do uso de produtos homólogos, no procedimento de transfusão em cirurgias cardíacas (Ferrari et al., 1987). A introdução do PRP em procedimentos cirúrgicos de forma mais



ampla, em cirurgias maxilofaciais como modificações autólogas de adesivos de fibrina e aplicações ortopédicas e odontológicas, iniciou-se apenas na década de 1990 (Anitua, 1999; Sánchez et al., 2012).

Em 1998, foi demonstrado que o PRP constitui uma rica fonte de fatores de crescimento, a partir do estímulo de formação de tecido ósseo em pacientes que receberam enxertos autólogos (Marx et al., 1998). Em 1999, foi realizada a descrição de um procedimento para aplicação do PRP em implantes odontológicos (Anitua, 1999). No início do milênio, o PRP foi usado pela primeira vez para tratar lesões no joelho em cirurgias artroscópicas (Sánchez et al., 2003), sendo posteriormente estendido ao tratamento de tendões (Sánchez et al., 2007), lesões musculares (Sánchez et al., 2009) e uso em condropatias (Kon et al., 2010).

O aprimoramento metodológico na obtenção do PRP tem conduzido a uma crescente ampliação de pesquisas relacionadas ao uso clínico em medicina humana e veterinária, expressivamente em lesões ósseas e cartilagem, procedimentos estéticos plásticos e reconstrutivos (Marques et al., 2015; Santos, 2017; Gilevich et al., 2021; Perego et al., 2021).

### **3.5 Biocurativos**

#### **3.5.1 Histórico e evolução dos curativos biológicos**

O registro mais antigo da utilização de materiais com propósitos curativos é datado de registros em tábuas de argila de origem mesopotâmica de 2500 a.C. Neste período, a higienização no pré-tratamento de feridas era realizada por lavagem da pele em leite ou água, antes do revestimento da região ferida com uso de mel ou resina. Relatos de substâncias hemostáticas utilizadas em uma variedade de tratamentos para hemorragia foram documentados por Galeno, cujas descobertas foram aplicadas durante o período medieval no desenvolvimento de técnicas em sutura e anatomia (Dhivya et al., 2015).

O uso de bandagens como curativo tem suas origens na Antiguidade, estabelecendo-se no século V a.C., desenvolvendo-se inicialmente como um tecido em algodão natural ou gaze não tecida formada de componentes como seda artificial ou misturas de fibras sintéticas (Jones, 2009; Subbarayappa, 2001). A gaze não tecida foi introduzida em substituição à gaze absorvente em decorrência da

liberação de fibras fragmentadas quando cortada, que podem secar e aderir ao leito da ferida, provocando traumas locais no momento da remoção (Daunton et al., 2012; Jones, 2015).

O manejo do exsudato da ferida consistiu um desafio constante ao longo da história, assim como nos dias de hoje. Paralelamente, os avanços do século XX permitiram o aprimoramento de formulações não aderentes. Durante a 1ª Guerra Mundial, com o elevado número de soldados feridos somados à falta de recursos, o problema do exsudato foi por vezes tratado com utilização de esfagno ou turfa. O problema dos curativos aderentes aos ferimentos foi primeiro reconhecido e abordado por Auguste Lumière (1862–1954), durante a Primeira Guerra Mundial, que desenvolveu um curativo de baixa aderência denominado *tule gras*, uma malha aberta de gaze para drenagem de fluidos, coberta com parafina macia e bálsamo do Peru como antisséptico (Jones, 2015). Tal configuração em multicamada passou a figurar como base para diversos avanços realizados atualmente entre os filmes semipermeáveis, onde cada camada desempenha uma função específica, na garantia de integridade mecânica ou absorção de fluidos (Jones & San Miguel, 2006; Martineau & Shek, 2006).

Durante a Segunda Guerra Mundial, prisioneiros que sofriam de queimaduras eram tratados a partir de celofane esterilizado em vapor obtido de equipamentos de transfusão de sangue. A técnica foi empregada pelo capitão Bloom MRCS, que observou uma cicatrização eficiente de queimaduras tratadas dessa forma, além de redução do nível de dor quando o filme foi aplicado, cicatrização sob uma fina camada de soro e permeabilidade do curativo à água (Bloom, 1945; Daunton et al, 2012). A maior eficácia do tratamento de feridas sob a manutenção de um ambiente úmido começou a receber notoriedade com os trabalhos de George Winter em 1962, quando constatou, a partir de modelo porcino, que células epiteliais migravam através do leito de uma ferida com maior velocidade comparando-se a um ambiente seco (Winter, 1962).

De forma geral, os avanços das técnicas antissépticas, essencialmente a administração de antibióticos, contribuíram para o controle de infecção e queda da mortalidade durante o século XIX que, atreladas à adoção de curativos oclusivos, no final do século XX, maximizaram o processo de recuperação aliando proteção e favorecimento de leitos úmidos, com contato contínuo com proteinases, agentes quimiotáticos e fatores de crescimento que, em geral, são perdidos em feridas

expostas. Como resultado fisiológico, foi observada reepitelização, síntese de colágeno e angiogênese, bem como a redução de processos infecciosos nas regiões do tecido (Dhivya et al., 2015).

O princípio da cicatrização de feridas úmidas culminou no desenvolvimento de uma nova geração de curativos com o advento dos hidrocoloides, na década de 1980 (Flanagan, 1996). Em contato com o exsudato da ferida, os hidrocoloides atuam em conjunção com polissacarídeos e outros polímeros na absorção de água e dilatação dos materiais curativos, formando um hidrogel (Daunton et al., 2012).

Desde então, uma nova onda de curativos teve início, fundamentada em uma grande variedade de fontes e matérias-primas pesquisadas e propostas, principalmente no contexto dos polímeros oriundos de fontes naturais, a exemplo dos alginatos, manufaturados em fibras, filmes e espumas para uso em cirurgias e curativos, denominados biocurativos (Pires et al., 2015).

### **3.5.2 Panorama socioeconômico atual e biocurativos**

No contexto atual dos avanços em produtos e técnicas de manejo de feridas, o aumento da expectativa de vida acompanhado do envelhecimento da população tem despertado a necessidade de acompanhamento e tratamento de úlceras crônicas para as quais as terapias mostrem-se eficazes e vinculadas a um custo baixo. A prevalência de feridas crônicas em países economicamente desenvolvidos atinge entre 1 e 2% da população, abrangendo os casos de morbidade e mortalidade e repercutindo um ônus substancial aos sistemas de saúde (Nussbaum et al., 2018; Ambrogi et al., 2020).

Desta parcela de acometidos, destacam-se idosos, pacientes adultos inabilitados ou incapazes de promoverem autocuidados, paralisados ou portadores de distúrbios de natureza mental. Ademais, características hereditário-congênitas, como a anemia falciforme, podem contribuir para a formação de feridas crônicas. Condições de imunossupressão ou autoimunes, insuficiência renal ou complicações dermatológicas relacionadas à idade ou paralisia também podem ser determinantes para estas condições (Nussbaum et al., 2018). Considerando este cenário, os curativos cumprem um papel fundamental como barreira físico-química de proteção temporária do tecido acometido, no sentido de evitar ou promover o controle de

infecções ao passo que proporciona um ambiente propício para consolidação do processo de regeneração tecidual (Chen et al., 2018).

Verificando-se a tendência crescente da expectativa de vida global, projeta-se que, até 2050, a população de idosos tende a alcançar cerca de 1,5 bilhão de pessoas, segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU), o que representaria um número superior ao dobro da população mundial concentrada nesta faixa etária (ONU, 2020). A exemplo do Brasil, que apresentou, no ano de 2019, uma expectativa de vida média da população igual a 76,6 anos, o percentual de indivíduos de idade maior ou igual a 65 anos representou 9,5% da população total (IBGE, 2020), enfatizando, portanto, a relativa demanda da população para cujos cuidados no tratamento de feridas devem ser direcionados.

### **3.5.3 Requisitos de um biocurativo ideal**

A seleção do tipo de curativo aplicado, bem como a continuidade de aplicação cotidiana está associada a fatores socioeconômicos, sobretudo o custo de manufatura, acessibilidade e capacidade de acompanhar melhores práticas. Pesquisas focadas no desenvolvimento de novos curativos direcionam-se na busca de materiais com capacidade em manter um ambiente úmido na superfície do leito da ferida, enquanto previne a maceração do tecido circundante, sendo não aderentes e antitraumáticos ao sítio da ferida e tecidos circundantes, atuantes como isolantes térmicos e permeáveis a gases, além de antibióticos e não-tóxicos (Rehm & Moradali, 2018; De Macêdo et al., 2018; Bianchera et al., 2020).

Além das características mencionadas, um biocurativo definido como ideal para aplicação em finalidade terapêutica é capaz de lidar com feridas secas assim como atuar na remoção de fluidos liberados por feridas altamente exsudativas, mantendo a superfície aquecida a uma temperatura fisiológica adequada, impedindo a entrada de patógenos, partículas e outros antígenos. A capacidade de conformação anatômica de acordo com a superfície da pele, seu dimensionamento em diferentes formatações que permitem garantir a cobertura da maioria das feridas, aliadas à sua estabilidade e manutenção da esterilidade em seu armazenamento, assim como a facilidade de descarte do produto, constituem fatores fundamentais e diferenciais na versatilidade de novas formulações (Clark, 2018; Tottoli et al., 2020).

Com o advento da Engenharia Tecidual, pesquisas direcionadas ao aprimoramento de materiais empregados em âmbito curativo têm sido empreendidas. Entretanto, o entendimento mais profundo dos mecanismos bioquímicos que permeiam a unicidade de cada tipo de ferimento e sua complexidade, bem como o reconhecimento das causas de um trauma e o controle das etapas de regeneração constituem os principais fatores envolvidos a tomada de decisões na proposição de novos produtos (Daunton et al, 2012; Negut et al., 2020).

A incorporação de nanopartículas de prata para liberação controlada e biossensores que promovem respostas a estímulos fisiológicos a partir de biomarcadores, como temperatura e acidez da pele, bem como o aprimoramento da bioatividade a partir da prospecção em componentes de natureza antioxidante e antibiótica cientificamente estabelecidos, como a papaína, constituem algumas das principais frentes de abordagem na perspectiva e futuro dos curativos inteligentes (Davies & Rippon, 2010; Daunton et al., 2012; Dumville et al., 2013).

## **3.6 Biomateriais**

### **3.6.1 Conceito e aspectos gerais**

Um dos principais desafios apresentados para a medicina regenerativa concentra-se na interação de um biomaterial com o organismo e reconhecimento de respostas fisiológicas decorrentes desta interface (Anderson et al., 2004). A conotação de biomaterial expandiu-se ao longo do tempo, de acordo com os diferentes degraus de interação com o organismo, observados à medida que os produtos e composições passaram a ser estudadas e aperfeiçoadas (Ratner & Bryant, 2004; Montoya et al., 2021).

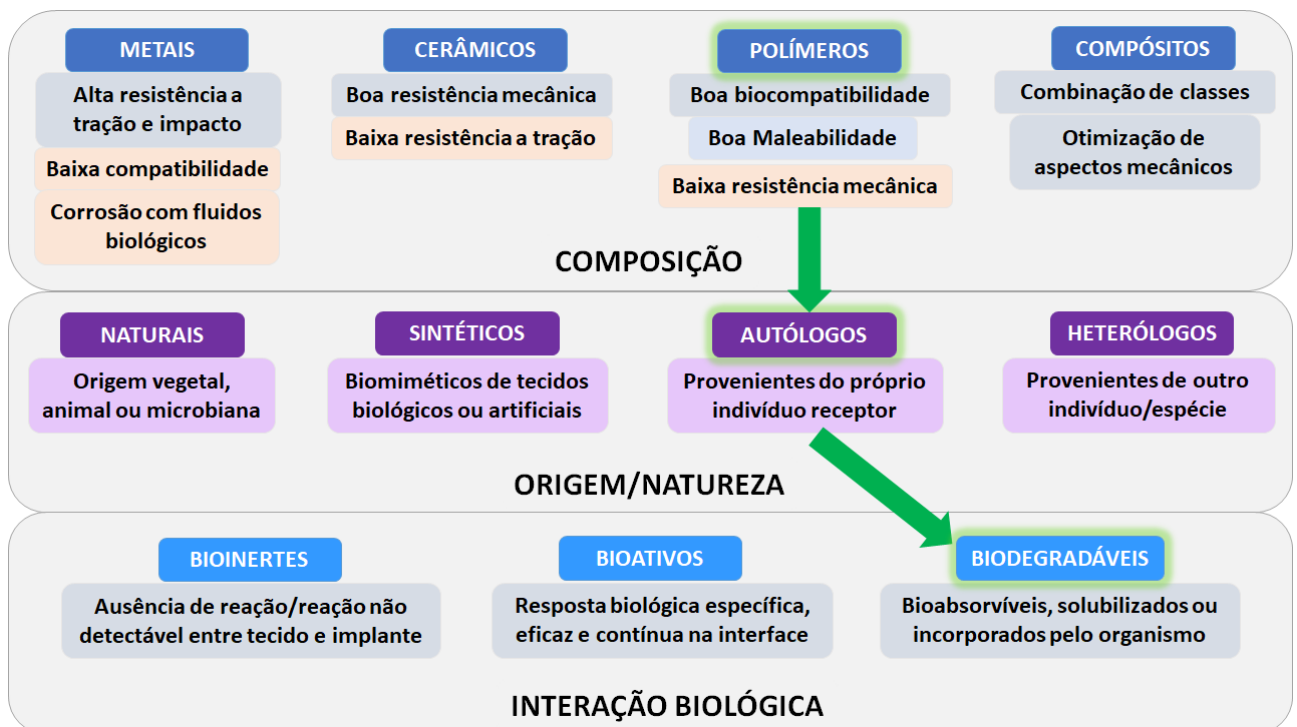
Um biomaterial pode ser definido como uma substância de origem natural ou sintética projetada para assumir uma forma que, isoladamente ou como parte de um sistema complexo, é empregada no direcionamento do curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico por meio do controle de interações com componentes dos sistemas vivos, no intuito de substituir ou tratar tecidos ou órgãos lesionados, promovendo mínima resposta imunológica (Williams, 2009).

Como garantia de aplicação clínica, um biomaterial ideal não deve provocar reações inflamatórias ao organismo do hospedeiro, ser hipoalergênico e com baixa

citotoxicidade, quimicamente estável e resistente à corrosão, além de biodegradável e de elevada capacidade de absorção e incorporação pelo organismo (Pires et al., 2015).

O diferencial dos biomateriais em relação aos demais tipos centra-se na combinação de características biológicas, propriedades químicas e aspectos físico-mecânicos que viabilizam o emprego no organismo humano, de forma versátil, precisa, controlada e biofuncional (Montoya et al., 2021). A classificação dos biomateriais é estabelecida de acordo com critérios físico-químicos (composição), fonte de obtenção (origem) e resposta fisiológica na interface material-tecido (interação biológica) (Figura 4).

**FIGURA 4.** Critérios de classificação dos biomateriais, vantagens de utilização terapêutica e vias de caracterização de um biocurativo ideal (setas verdes). Adaptado de PIRES et al. (2015).



No contexto clínico e terapêutico, a biocompatibilidade e biofuncionalidade são os requisitos mais relevantes e primordiais dos biomateriais no que diz respeito ao uso seguro e eficaz e incorporação em produtos derivados (Pires et al., 2015). Enquanto a biocompatibilidade decorre do grau de interação do biomaterial com o ambiente do organismo do ponto de vista fisiológico, atuando como resposta potencializada a um estímulo ou aplicação específica, a biofuncionalidade refere-se

ao potencial de um dispositivo terapêutico ou biomaterial em mimetizar ou promover uma função assemelhada ao tecido ou estrutura onde atua como substituinte (Willians, 1987; Boschi, 1996).

### **3.6.2 Potencial terapêutico**

No contexto da medicina regenerativa, os biomateriais podem agir como matriz de liberação de biomoléculas através de estímulos fisiológicos, tais como variações de temperatura, pH e força iônica do meio, presença de moléculas específicas, como glicose e glicoproteínas, enzimas, espécies reativas de oxigênio (ROS) ou agentes bioquímicos e patogênicos, como bactérias e vírus (Gimble et al., 2007; Montoya et al., 2021). A utilização de materiais bioativos e biorresponsivos, com atividade controlada por sinais fisiológicos, têm se mostrado uma alternativa cada vez mais presente na busca de produtos direcionados a desempenharem processos biológicos específicos (Bai, 2018).

A associação de células precursoras, como as células estromais mesenquimais, e fatores de crescimento a matrizes formadas por biomateriais constitui uma importante ferramenta para promoção de um ambiente permissivo que garanta a sobrevivência celular e conduza ao reparo tecidual, regeneração ou restabelecimento das funções vitais normais de um tecido ou órgão (Zhao et al., 2016, Dash et al., 2018; Stessuk et al., 2020; Oliveira et al., 2021).

Por meio do processo de ativação e degranulação de plaquetas, decorrentes da cicatrização, a liberação de citocinas promove a modulação da resposta regenerativa e angiogênica (Stessuk, 2016). Como fonte biodisponível, a utilização terapêutica de plasma rico em plaquetas (PRP) em diferentes campos da medicina regenerativa tem encontrado nas plaquetas um biomaterial autólogo efetivo e de potencial promissor no tratamento de úlceras crônicas, onde o processo regenerativo é dificultado (Fernández-Delgado et al., 2012; Faramarzi et al., 2018; Shen et al., 2019; Ding et al., 2021).

### 3.6.3 Biopolímeros de interesse médico

A utilização de biomateriais no tratamento de tecidos e lesões corporais tem sua gênese no emprego de ouro e madeira para construção de implantes dentários e vidro para confecção de próteses oculares. Materiais originalmente descritos para fins militares, notoriamente cerâmicos, metais e polímeros, passaram a ser introduzidos como matérias-primas em próteses, abrindo um novo horizonte de pesquisas a partir da década de 60, pautado no aprimoramento e desenvolvimento de biomateriais de melhor desempenho e eficiência (Leeuwenburgh et al., 2008). Desde então, a gama de aplicações dos biomateriais tem se expandido em diferentes áreas da farmacologia e terapia gênica (sistemas de liberação controlada), nanotecnologia e imagenologia (sistemas de diagnóstico) e, fundamentalmente, na terapia celular e engenharia tecidual (Bueno et al., 2015; Ertas et al., 2021).

Entre os biomateriais mais comumente utilizados em procedimentos clínicos encontram-se os polímeros. Comparativamente aos metais e cerâmicos, apresentam maior maleabilidade, facilidade de obtenção e processamento em formas variadas (biofilmes, suturas, partículas), acessibilidade de custo e disponibilidade de materiais com propriedades físico-mecânicas requeridas em usos específicos (Wong & Bronzino, 2007; Pires et al., 2015). Polímeros naturais são abundantes e obtidos de recursos oriundos de fontes renováveis, embora a variabilidade intrínseca do material relacionada à origem biológica, local e época de obtenção possam interferir em propriedades características do produto (Pires et al., 2015). Estudos têm demonstrado boa biocompatibilidade e segurança de polímeros biológicos, observada a geração de produtos de toxicidade baixa ou inexistente em decorrência de sua biodegradabilidade por processos enzimáticos (Asghari et al., 2017; Aguilar & San Román, 2019; Pappalardo et al., 2019; Smith et al., 2021).

A manufaturabilidade e versatilidade dos polímeros possibilita sua aplicação médica na construção de instrumentos descartáveis, adesivos, curativos, implantes, próteses, elementos encapsulantes e, mais recentemente, na confecção de matrizes de suporte de regeneração tecidual por meio de estímulo do crescimento celular (*scaffolds*) (Calori et al., 2020; Taghipour et al., 2020; Mukhtar et al., 2021). De modo geral, a variabilidade das cadeias químicas em relação ao tamanho e composição



influencia no processamento dos biopolímeros, visto que o comportamento físico-químico do material é estritamente relacionado à disposição de grupos funcionais ao longo das moléculas que o constituem. Do mesmo modo, as diferenças estruturais intrínsecas dos biopolímeros conferem atividades biológicas inerentes ao material, como a presença de frações sacarídeas e peptídicas na sinalização imunológica e suscetibilidade à biodegradação (Chantre et al., 2019; Klimek & Ginalska, 2020).

Proteínas, como a fibrina, apresentam propriedades favoráveis enquanto matérias-primas para formulação de um biomaterial, visto que a estrutura molecular permite interação com domínios específicos presentes na membrana celular, possibilitando a obtenção de produtos de características adaptáveis (Aldana et al., 2021; Montero et al., 2021). Estudos recentes demonstraram a potencialidade de uso da fibrina como aditivo no preparo de concentrado plaquetário, com estímulo quimiotáxico para ativação de células vasculares e perivasculares, promovendo reparo eficiente e cicatrização rápida em lesões cirúrgicas (Takamori et al., 2018).

No contexto do mercado crescente de aplicação dos biomateriais, os polissacarídeos e as proteínas apresentam-se como fonte atrativa em função de suas propriedades mecânicas, alta disponibilidade e baixo custo, polaridade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e multifuncionalidade, incluindo aplicações como constituintes de agentes espessantes, emulsificantes e hidratantes, além da capacidade de formarem géis sob parâmetros termodinâmicos bem definidos, de fundamental relevância alimentícia, cosmética e, primordialmente, farmacêutica e médica, credenciando-os como bons candidatos em metodologias de produção de biomateriais de interesse terapêutico (Hassan et al., 2019; George et al., 2020; Bhaskar & Nagarjuna, 2021; Schneible et al., 2021).

Dentre os polissacarídeos que têm atraído a busca de pesquisadores na elucidação de atividades biológicas e na constituição de biomateriais de potencial terapêutico, destaca-se o alginato, ao passo que a gelatina se apresenta como uma alternativa potencial viável no campo dos peptídeos, amplamente empregada na composição de estruturas de suporte para formulação de biocurativos.

## 3.7 Gelatina

### 3.7.1 Aspectos físico-químicos

A gelatina constitui-se de uma proteína solúvel oriunda da hidrólise ácida ou básica do colágeno ou por meio de desnaturação térmica da molécula, a partir da quebra da estrutura tripla hélice em um arranjo aleatório em formato de bobina (Sarker et al., 2014; Duan et al., 2018). Majoritariamente, a gelatina empregada comercialmente em formulações deriva do colágeno presente na pele e estruturas ósseas de porcos e bovinos (Ma et al., 2018).

A solubilização da gelatina em água ocorre a uma temperatura próxima a 40°C, com obtenção de um estado sol. Após o resfriamento de uma solução aquosa, o estado sol modifica-se em estado de gel termorreversível, por meio do rearranjo parcial das cadeias químicas da estrutura de bobina aleatória para uma conformação de hélice tripla do colágeno (Boanini & Bigi, 2011). A estrutura da rede e as propriedades físicas dos géis de gelatina são condicionadas principalmente pela fonte e pelas condições de extração da gelatina. De modo geral, a gelatina extraída em temperatura mais baixa é mais rígida e exibe maior rigidez na composição de um hidrogel (Bigi et al., 2004).

Amplamente utilizada em aplicações biomédicas na composição de cápsulas e microesferas para administração e entrega de medicamentos e genes, selantes para próteses vasculares, curativos e absorventes para uso cirúrgico, bem como engenharia de tecidos, a gelatina constitui uma alternativa versátil e promissora na área terapêutica devido à sua alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, bem como ao caráter bioadesivo e propriedades antibacterianas, fúngicas e virais (Ávila et al., 2012; Pires et al., 2015).

A gelatina é fonte de peptídeos que oferecem maior aderência a células e componentes funcionais (bioestabilidade), como as plaquetas, na composição de filmes utilizados como *scaffolds* em medicina regenerativa. No contexto biológico da formulação de adesivos comerciais na composição de filmes aderentes, a gelatina apresenta ação hemostática e pró-angiogênica em função da alta higroscopicidade e ativação de macrófagos em feridas com sangramentos, acelerando a regeneração tecidual e síntese de colágeno no estágio inicial do processo de cicatrização, além de atuar na interação com componentes da matriz extracelular, favorecendo a

migração e proliferação de células fibroblásticas e queratinócitos (Chen et al., 2012; Saarai et al., 2013). Testes clínicos não detectaram reações imunológicas ou alérgicas decorrente do uso tópico ou implante do biomaterial (Jayakumar et al., 2011; Pan et al., 2016).

### **3.7.2 Papel biológico na medicina regenerativa**

A potencialidade terapêutica da gelatina relaciona-se à natureza catiônica quando presente em solução, cujos hidrogéis apresentam uma rede estrutural que consiste em uma combinação de cadeia elástica, conformação em tripla hélice, e uma cadeia viscosa, composta de fragmentos de cadeias polipeptídicas desordenadas (Saarai et al., 2013). Por esta razão, no preparo de filmes ou biomembranas, sua baixa resistência mecânica compreende um limitador crítico em aplicações biomédicas (Dallan et al., 2007).

As fracas propriedades mecânicas da gelatina, que limitam suas aplicações mais amplas, podem ser superadas pelo processo de reticulação covalente com alginato. A presença de numerosos grupos funcionais laterais da molécula peptídica da gelatina formam ligações cruzadas com grupos químicos do alginato na adição de componentes conhecidos como agentes reticulantes, que cumprem o papel de aprimorar a resistência mecânica à tração e atribuir maior estabilidade térmica ao composto (Sarker et al., 2014). Ademais, a interação da rede proteica com o polissacarídeo cumpre o papel de promover maior controle da taxa de liberação de componentes, em sistemas baseados em géis e hidrogéis (Ozel et al., 2017).

Tratando-se de um polímero sensível às mudanças de temperatura, a gelatina pode ser adequada em aplicações de impressão por deposição camada a camada através da transformação sol-gel (Pan et al., 2016). Em temperatura fisiológica (37°C) é uma solução, podendo formar, reversivelmente, um gel quando resfriado (<29°C) (Chung et al., 2013). Neste caso, a mudança conformacional de bobina para hélice leva à associação de cadeias e, eventualmente, à formação de uma rede de sistema tridimensional (Fedorovich et al., 2007).

## 3.8 Alginato

### 3.8.1 Origem biológica e aplicabilidade comercial

Como um polissacarídeo natural coloidal hidrofílico e aniônico, biocompatível e de alta pureza, o alginato está presente na parede celular e espaços intercelulares de uma ampla gama de macroalgas marinhas marrons (classe Phaeophyceae), mais especificamente entre os indivíduos dos gêneros *Laminaria*, *Ecklonia*, *Macrocystis*, *Durvillea* e *Macrocystis*, com a função de promover a sustentação e coesão tecidual, e pode abranger até 40% da massa seca do organismo (Onsøyen, 1997). Paralelamente, o alginato empregado comercialmente pode ser proveniente de origem bacteriana, como produto sintetizado, na forma de mucilagem extracelular (ou polissacarídeo capsular) por espécies dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter*, diferindo do composto de origem algal em razão do maior grau de acetilação (Garcia-Cruz et al., 2008).

A composição única e as propriedades dos alginatos permitiram sua aplicação, fundamentalmente na forma de sais de sódio, amônio ou potássio, a uma ampla variedade de insumos e produtos nos setores agrícola, alimentício, têxtil, cosmético e, principalmente, farmacêutico/biomédico e biotecnológico, na forma de espessantes, estabilizadores, viscosificantes, emulsificantes, aditivos, gelificantes e formadores de filmes, e fertilizantes (Lesser, 1947; McHugh, 1987; Mancini et al., 1996). Neste contexto, produtos de alto valor agregado foram aperfeiçoados, visando entrega de fármacos (*drug-delivery*) e funcionalização de *scaffolds* para liberação controlada de drogas anticâncer, imobilização de células e enzimas, geração de matrizes de cultura celular tridimensional para avaliação de interação de fármacos em nível celular e estudos em cinética de crescimento celular (Barreto et al., 2011; Kuo & Ma, 2001; Drudy & Mooney, 2003; Lee et al., 2008).

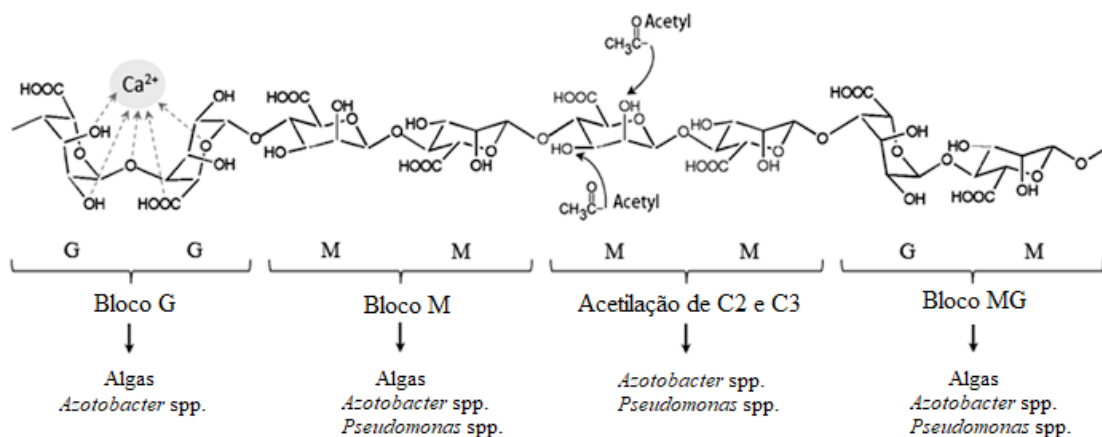
As características biológicas apresentadas pelo alginato, que incluem não-toxicidade, biocompatibilidade, não imunogenicidade e biodegradabilidade credenciaram o extensivo uso do alginato em abordagens terapêuticas, que incluem a formulação de curativos e geração de materiais aplicados à impressão e modelagem dentária (Barnett & Varley, 1987). Os avanços proporcionados pela evolução das tecnologias de processamento e fabricação de materiais aprimoraram as aplicações biomédicas do alginato por meio de modificações e ajustes dos

compostos poliméricos, incluindo a interação com outros polissacarídeos (Moradali et al., 2018). Desta forma, diferentes formas de apresentação terapêutica desenvolveram-se a partir do processamento do biopolímero, como nanopartículas, nanotubos, microesferas, microcápsulas, esponjas, espumas, fibras, elastômeros e, mais popularmente, os hidrogéis (Aderibigbe & Buyana, 2018; Li et al., 2020; Severino et al., 2019; Asadi et al., 2021; Zhan et al., 2021).

### 3.8.2 Propriedades físico-químicas

A estrutura geral do alginato consiste em uma formação em copolímero de dois resíduos derivados de ácidos urônicos, o ácido  $\beta$ -D-manurônico, compreendido como bloco M, e um epímero de ácido  $\alpha$ -L-gulurônico, denominado bloco G, conectados em uma sequência heteropolimérica, com combinação de ambas as estruturas, por meio de ligações glicosídicas (Figura 5), com peso molecular variando de 10 a 200 kDa (Valot et al., 2019). A ocorrência de resíduos M e G na estrutura polimérica varia significativamente, em número e comprimento dos blocos M, G e MG.

**FIGURA 5.** Estrutura química dos blocos constituintes predominantes nas formações dos alginatos de origem algal e bacteriana (REHM & MORADALI, 2018)

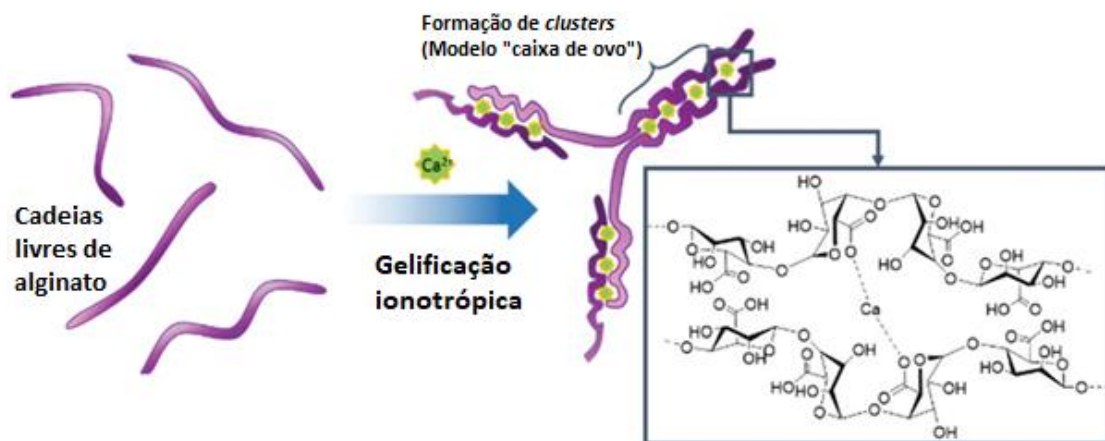


A fonte de obtenção do bioproduto é uma razão de variabilidade da massa molecular e composição das cadeias químicas (Rehm & Moradali, 2018). Da mesma forma, as propriedades físico-químicas dos alginatos estão intimamente associadas à estruturação química das cadeias. A viscoelasticidade intrínseca, dentre outras variáveis reológicas, está diretamente relacionada à frequência de distribuição dos

blocos constituintes da cadeia química, de forma que a flexibilidade do polímero diminui com maior grau de homogeneidade dos blocos, seguindo a ordem  $MG > MM > GG$  (Mørch et al., 2006).

As características físico-químicas mais marcantes dos alginatos estão relacionadas à capacidade de ligação a cátions divalentes, levando à formação de hidrogéis fortes e solúveis e estruturas poliméricas reticuladas (Allen et al., 1963). O processo de gelificação do alginato, por este motivo, é conhecido como gelificação ionotrópica (Valot et al., 2019). Fundamentado na afinidade seletiva e cooperativa a íons polivalentes, o alginato encontra sua maior potencialidade na associação a espécies metálicas, dentre as quais destacam-se o  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  e  $Pb^{2+}$  (Haug & Smidsrod, 1970). O agente reticulante mais efetivo empregado na formação de géis é o cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) (Allen et al., 1963). A estruturação entre blocos G, por decorrência deste processo, recebeu o nome de modelo “caixa de ovos” (FIGURA 6), sendo este processo dependente da concentração e constituição química do alginato, assim como a cinética de reação, relacionada à concentração dos cátions, força iônica e pH (Draget et al., 1997).

**FIGURA 6.** Representação da estruturação química do alginato pelo mecanismo de gelificação ionotrópica na presença de íons divalentes (VALOT et al., 2019)



O ajuste das propriedades físicas do alginato por associação a íons, como o cálcio, tem sido amplamente utilizado como matriz polimérica para cultivo celular para estímulo de cicatrização de ferimentos e na engenharia tecidual como suporte do processo regenerativo de células ósseas e dérmicas e na angiogênese (Bueno et al., 2015; Verma et al., 2011). O alginato de sódio (SA), por exemplo, tem a capacidade de formar um gel por meio de reticulação (ou *crosslinking*) a partir de

ligações iônicas ou covalentes sob condições brandas, permitindo ampla utilização em abordagens terapêuticas, principalmente na encapsulação de células e componentes bioativos e Engenharia de Tecidos (Lee & Mooney, 2012; Pawar & Edgar, 2012; Tan & Marra, 2010).

### **3.8.3 Curativos biológicos de alginato**

As primeiras aplicações do alginato como curativo estavam fundamentadas na formação de uma massa rígida, cujos riscos eram semelhantes aos oferecidos pela gaze de tecido e demais curativos não-aderentes/não-adesivos, principalmente no que se refere a traumas originados da remoção do curativo (Daunton et al., 2012). Em aplicações a seco, formavam um gel de estrutura fibrosa capazes de absorverem o excesso de exsudatos da ferida, auxiliando na prevenção da maceração do tecido saudável circundante (Blaine, 1947).

O mecanismo de contato com uma ferida baseia-se na ocorrência de troca iônica entre os íons cálcio do curativo e os íons sódio presentes no sangue ou no exsudato da ferida. Ao atingir um ponto de equilíbrio de troca dos íons cálcio, as fibras de alginato começam a inchar e dissolver parcialmente, formando um gel. Estudos reológicos realizados por Thomas (1992) indicaram que curativos de alginato podem atingir uma capacidade de absorção de exsudatos de 15 a 20 vezes sua própria massa e permanecerem em contato com o tecido a ser regenerado por um período de 5 a 7 dias, podendo ser trocado ao atingir sua máxima capacidade absorptiva (Clark, 2012). A reticulação do alginato otimiza esta capacidade por aumento do fluxo iônico, estimulando o potencial hemostático do curativo (Doyle et al., 1996; Varaprasad et al., 2020).

No contexto biológico, os curativos de alginato proporcionam um microambiente úmido no leito de uma ferida, promovendo o reparo de tecidos danificados, com redução potencial de odor e resistência a infecções oriundas de contaminação microbiana no leito do tecido afetado (Sweeney et al., 2012; Varaprasad et al., 2020). Devido a biocompatibilidade do alginato, pode ser aplicado a uma ampla variedade de etiologias, incluindo úlceras diabéticas, úlceras por pressão, úlceras venosas, feridas cavitárias, feridas traumáticas, feridas pós-

operatórias e queimaduras parciais (Zhang & Zhao, 2020; Moay et al., 2021; Sheir et al., 2021).

O potencial terapêutico do alginato na dermatologia notabiliza-se em função de sua versatilidade de aplicações na associação a componentes para criação de produtos médicos manufaturados que visam garantir a homeostase e liberação controlada de fármacos e citocinas no leito da ferida, otimizando o processo regenerativo (Sun & Tan, 2013; Thomas et al., 2020; Varaprasad et al., 2020; Barbu et al., 2021).

#### **3.8.4 Alginato e engenharia de tecidos**

A versatilidade enquanto biopolímero, aliada à facilidade de gelificação *in situ* e capacidade de personalização na forma de microesferas, biofilmes e *scaffolds* porosos, observadas em diversos estudos envolvendo a composição de hidrogéis, têm credenciado o alginato como uma alternativa extremamente atraente e eficaz em aplicações de terapia regenerativa e, sobretudo, no emprego de estratégias de biofabricação e engenharia tecidual (Sarker & Boccaccini, 2018; Gao et al., 2019). A conformação da rede tridimensional altamente hidratada dos hidrogéis de alginato confere elevado grau de similaridade estrutural à matriz extracelular que circunda as células de tecidos nativos, especialmente as camadas do epitélio (Drury & Mooney, 2003; Tan & Marra, 2010).

No contexto da manufatura aditiva, a principal contribuição do alginato relaciona-se com sua rápida gelificação iônica em condições de acidez e temperaturas brandas, adequadas para células vivas e biomoléculas sensíveis a alterações químicas do meio, como proteínas e ácidos nucleicos (Sarker & Boccaccini, 2018). Na forma de hidrogel, o alginato apresenta-se como um meio injetável para preenchimento tecidual, como também constitui um meio poroso e semipermeável que atua como arcabouço (*scaffold*), protegendo células e plaquetas incorporadas e garantindo o fluxo intersticial e difusão de nutrientes que mantém um microambiente ótimo e propício para a investigação de interações célula-matriz em modelos 3D e influência na proliferação, migração e diferenciação celular (Nam & Park, 2018; Neves et al., 2020)

Na constituição de materiais resistentes, especialmente para propósitos curativos, o alginato encontra em sua alta capacidade de dilatação, associada às



fracas propriedades mecânicas dos hidrogéis, quando constituídos deste polímero como componente único, seus principais fatores limitantes nas aplicações em engenharia de tecidos (Zhuang et al., 2016; Huang et al., 2017). Em formulações que englobam células, o elevado estresse mecânico exercido sobre os componentes incorporados a hidrogéis constituídos exclusivamente deste componente, impedem a migração de células ativas, reduzindo a viabilidade celular. O caráter hidrofílico do alginato promove mínima adsorção de proteínas, porém a ausência de sítios de adesão na molécula do polímero reduz a capacidade de interação celular e ancoragem de células em estruturas 3D. Desta forma, em cultivos bidimensionais e construções tridimensionais homogêneas de alginato, a organização na matriz de hidrogel tende a formar agregados celulares imersos (Smetana, 1993; Kim et al., 2010; Sarker & Boccaccini, 2018).

Tendo em vista estas implicações, diferentes abordagens têm sido conduzidas na modificação do alginato, buscando aprimoramento mecânico, atribuindo maior estabilidade química e ajuste de parâmetros funcionais, como a biodegradabilidade (Varaprasad et al., 2020). Estas premissas abrangem a funcionalização por irradiação gama ou oxidação parcial da molécula de alginato, promovendo modificação covalente (Lee & Mooney, 2012; Gasperini et al., 2014; Gao et al., 2019), ou ainda com a incorporação de aditivos de origem orgânica e inorgânica, formando materiais compósitos (Huang et al., 2017; Tonsomboon et al., 2017; Wu et al., 2018), como a introdução de ligantes de adesão para fixação de células, como o peptídeo RGD, conjugado ao alginato inerte (Rowley et al., 1999; Alsberg et al., 2001).

A projeção de um sistema biomimético fundamentado na construção de ambientes tridimensionais que alie suporte celular e promova o estímulo das propriedades funcionais celulares essenciais, incluindo a diferenciação, permanece uma tarefa desafiadora, ainda que esforços no aperfeiçoamento das composições tenham sido empreendidos (Aderibigbe & Buyana, 2018; Park et al., 2018; Yang et al., 2018). Neste sentido, o advento das blendas poliméricas tem apresentado uma fonte bastante versátil de alternativas que busquem contornar os entraves existentes na garantia da biocompatibilidade de polímeros nomeadamente consolidados no contexto do mercado atual das formulações de biocurativos.

### 3.9 Blendas Poliméricas

#### 3.9.1 Vantagens e aplicabilidade

Uma alternativa na preparação de formulações que surge como possibilidade para preencher a lacuna da funcionalidade biológica de um polímero empregado como suporte, como o alginato, é a associação de componentes como a gelatina, fibrina, colágeno e fatores de crescimento em blendas poliméricas, misturas físicas entre as soluções de dois ou mais polímeros ou copolímeros (Utracki, 2013; Erkoc et al., 2020).

Uma das principais vantagens apresentadas pelo desenvolvimento de blendas centra-se na simplificação do processo de manufatura, sem a necessidade de síntese química de um novo polímero, por tratar-se de uma associação sem haver ligação química entre os componentes poliméricos e que preza pela relevância e conservação dos aspectos físico-químicos favoráveis do material ao propósito de aplicação, reduzindo assim o custo produtivo e tempo de pesquisa (Brant, 2011).

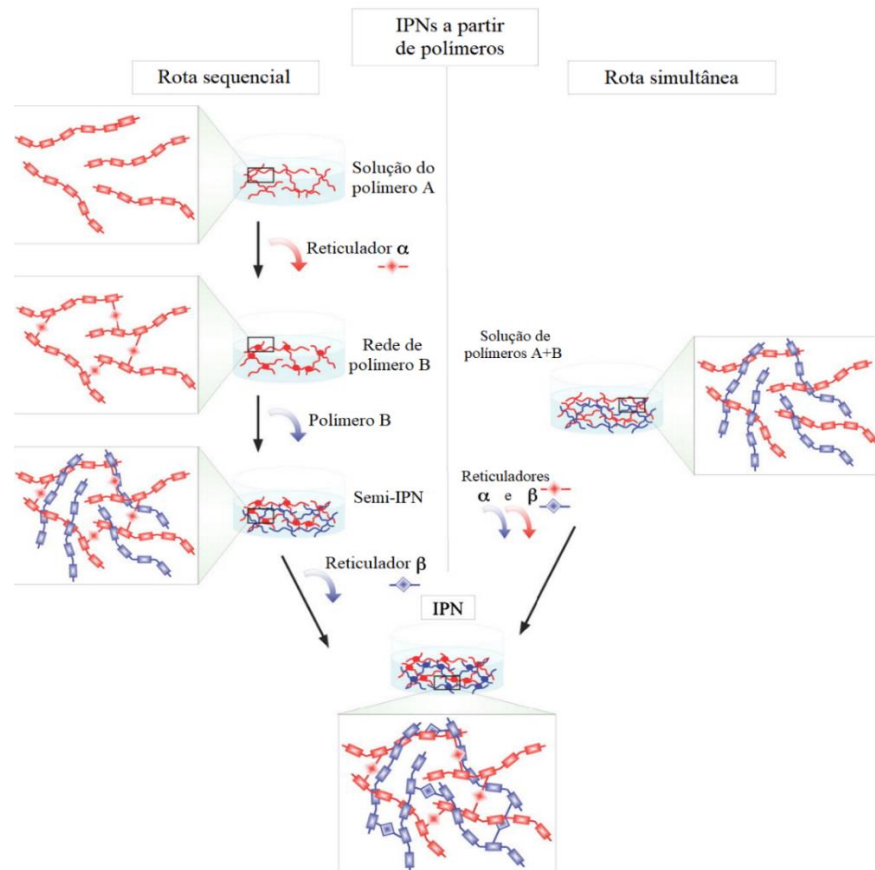
Blendas derivadas de polímeros naturais e sintéticos têm recebido notoriedade, principalmente em aplicações como biomateriais. Polímeros sintéticos dispõem de uma ampla faixa de propriedades mecânicas e técnicas de transformação e obtenção, proporcionando uma variedade de formas e maior acessibilidade, porém ao custo de menor biocompatibilidade e biodegradabilidade (Cascone, 1997). Paralelamente, os polímeros naturais dispõem de propriedades biológicas ótimas para aplicação em biomateriais, apesar das limitações mecânicas e necessidade de processamento para promover melhorias de sustentação para biomateriais de uso terapêutico (Mucha et al., 1999; Brant, 2011; Abbasian et al., 2019; Zarrintaj et al., 2020). O interesse, em especial, por blendas de polissacarídeos e proteínas, como a combinação alginato-gelatina, centra-se na capacidade de constituição de biomateriais utilizados nas áreas médica e terapêutica, principalmente os sistemas baseados em hidrogéis.

### 3.9.2 Processos de obtenção

No processo físico-químico de manufatura, as blendas poliméricas podem ser obtidas por meio de mistura mecânica dos componentes em estado fundido, dissolução simultânea seguida de evaporação do solvente (mais comum em escala laboratorial, porém mais dispendiosa e onerosa quanto ao impacto ambiental) ou por meio da formação de reticulados poliméricos interpenetrantes (IPN) ou semi-interpenetrantes (semi-IPNs).

O método mais seguramente aplicado em formulações poliméricas, mais especificamente na elaboração de géis e hidrogéis de propósito terapêutico, é a formação de redes de polímeros interpenetrantes (IPN). Nesta formatação, dois ou mais polímeros reticulados ou monômeros entrelaçam-se em escala molecular e formam uma única rede, de modo que sejam separados apenas por ação de reação química (Charkrabarty, 1998). Os mecanismos de construção das blendas estão ilustrados na Figura 7.

**FIGURA 7.** Etapas envolvidas na formação de redes poliméricas IPN e semi-IPN. A e B representam polímeros genéricos.  $\alpha$  e  $\beta$  representam agentes reticulantes genéricos (MATRICARDI et al., 2013)



Em casos nos quais dois ou mais polímeros, sejam lineares ou ramificados, dispõem-se em um entrelaçamento com interações mais fracas, usa-se o reticulante de apenas um polímero na presença imediata de outro, de forma que os componentes da blenda possam ser separados sem hidrólise ou quebra de ligação química. Blendas que apresentam tal caracterização são classificadas como reticulados poliméricos ou redes poliméricas semi-interpenetrantes (SIPN ou Semi-IPN) (Brant et al., 2011; Matricardi et al., 2013; Lohani et al., 2014; Wang et al., 2018).

### **3.9.3 Blendas Alginato-Gelatina (Alg-Gel)**

Dentre as principais opções extensivamente estudadas no campo das matrizes poliméricas baseadas em alginato, a gelatina tem sido amplamente utilizada na composição de blendas, por meio das quais as características de suporte do alginato e o fornecimento de sítios adesivos para sinalização e abordagem dos receptores de adesão celular são combinadas de forma sinérgica, fornecendo pistas bioquímicas que garantam proteção e promovam o crescimento e a diferenciação celular (An et al., 2018; Park et al., 2018; Bhaskar et al., 2021).

A combinação de polímeros que interagem com moléculas de carga oposta em blendas, também conhecidas como complexos polieletrólitos (PEC), como a gelatina e o alginato, oferece propriedades físico-químicas e biológicas reconhecidamente aprimoradas quando relacionadas a polímeros isolados (Heath & Cooper, 2017; Sionkowska, 2011; Caetano et al., 2015). No contexto físico-químico, a viscosidade de uma solução de alginato também pode ser controlada pela incorporação de gelatina e modulação da temperatura de mistura, formando um gel que retém aspectos biológicos da solução original de alginato e propiciando condições ideais para utilização em sistemas de impressão baseados em extrusão (Yan et al., 2005; Malda et al., 2013; Ji & Guvendiren, 2017).

Os efeitos da incorporação de diferentes concentrações de gelatina sobre a resistência estrutural e retenção de água em blendas com o alginato têm sido investigados em detalhes (Wang et al., 2019). Na fabricação de fibras poliméricas, por exemplo, a reticulação de ambos os polímeros é requerida, empregando íons  $\text{Ca}^{2+}$  para o alginato, ao passo que a gelatina pode ser reticulada por glutaraldeído,

glicose, riboflavina mediada por radiação ultravioleta, alginato ou amido oxidados (Harper et al., 2013; Hu et al., 2015; Yang et al., 2017).

Diversos relatos na literatura demonstram a interação da gelatina com o alginato na formulação de hidrogéis, utilizando técnicas de bioplotagem para produção de biofilmes e biocurativos poliméricos (Pan et al., 2016; Albanna et al., 2019; Varaprasad et al., 2020; Zhang & Zhao, 2020; Aldana et al., 2021). A complexação entre gelatina e alginato (caráter aniônico), por atração eletrostática, promove a formação de uma biomembrana transparente e fina, estável a alterações de pH, tendo em vista o intervalo aceitável do índice cutâneo (pH entre 5,5 e 6,5), com maior capacidade em absorver fluidos fisiológicos e associar-se a componentes bioativos, auxiliando na manutenção de um microambiente úmido e quimicamente semelhante à matriz extracelular (ECM), bem como o estímulo da reepitelização eficiente e alívio de dor ao receptor (Li & Zhang, 2005; Pires et al., 2015; Isaac et al., 2008; Stessuk, 2016).

Neste contexto, há grande interesse na utilização do complexo como *scaffold* (arcabouço) no processo de cicatrização, fornecendo suporte biológico tridimensional que estimule a migração, proliferação e organização celular (Caetano et al., 2015). A associação de matrizes poliméricas biodegradáveis de origem natural a produtos bioativos de capacidade moduladora do microambiente fisiológico para reparo de uma lesão, como proporcionada pelas preparações de PRP, oferecem uma nova perspectiva no campo da engenharia tecidual e medicina regenerativa, cuja investigação relacionada à composição, viabilidade e efeitos aditivos, mostram-se necessários ao entendimento da interação e comportamento celular na otimização do processo regenerativo.

### **3.10 Hidrogéis e Biotintas**

#### **3.10.1 Aspectos gerais**

Como formatação de materiais mais amplamente utilizada para encapsulação de agentes bioativos em função de sua alta hidrofiliabilidade e porosidade que possibilita o fluxo de nutrientes, gases e metabólitos, os hidrogéis são conhecidos por serem formações de materiais capazes de reproduzir as características da matriz extracelular nativa (biomiméticos) e possibilitarem a

encapsulação de células num meio altamente hidratado, agindo como protetores físicos do sistema imune e complexos de alto peso molecular, mecanicamente resistentes e modeláveis em diferentes aspectos biomecânicos nos processos envolvendo a biofabricação de biocurativos (Chung et al., 2013; Malda et al., 2013; Sarker et al., 2014).

A associação de polímeros em blendas para a constituição de hidrogéis justifica-se pela versatilidade desta formatação em permitir a adesão e cultivo de células de forma homogeneamente distribuída, ao passo que sua textura homogênea e flexibilidade agem na atenuação do estresse mecânico e tensão às quais as estruturas bioativas, células e tecidos adjacente estão submetidos, permitindo o fornecimento de sinais químicos de relevância biológica (Chung et al., 2013; Valot et al., 2019).

Nestes casos, as formulações constituídas por hidrogéis ou blendas aquosas multicomponentes que levam um ou mais tipos celulares e fatores biológicos em sua composição são conhecidas como biotintas (Colosi et al., 2017; Groll et al., 2019). Dentre as principais fontes de hidrogéis encontram-se os polímeros naturais, como alginato, gelatina, colágeno, quitosana, fibrina e ácido hialurônico, além de novas proposições envolvendo a ECM decelularizada (dECM), isolada de tecidos específicos de interesse, tais como adiposo, cardiovascular e renal (Pati et al. 2014; Jang et al. 2018; Ali et al. 2019).

Conciliando características físico-químicas e biocompatíveis, aliadas a capacidade de incorporação de células e compostos bioativos em uma matriz biodegradável, formando biotintas de amplo espectro, os hidrogéis compreendem a classe de representantes mais versátil e bem-sucedida entre os biocurativos (Daunton et al., 2012). Em contraponto a diversas formulações cotidianamente empregadas, as biotintas de hidrogéis possibilitam a preservação do tecido circundante ao local da lesão, facilitando o desbridamento por autólise do tecido necrosado enquanto previnem maceração em elevados níveis de exsudatos (Ji & Guvendiren, 2017; Chen et al., 2018).

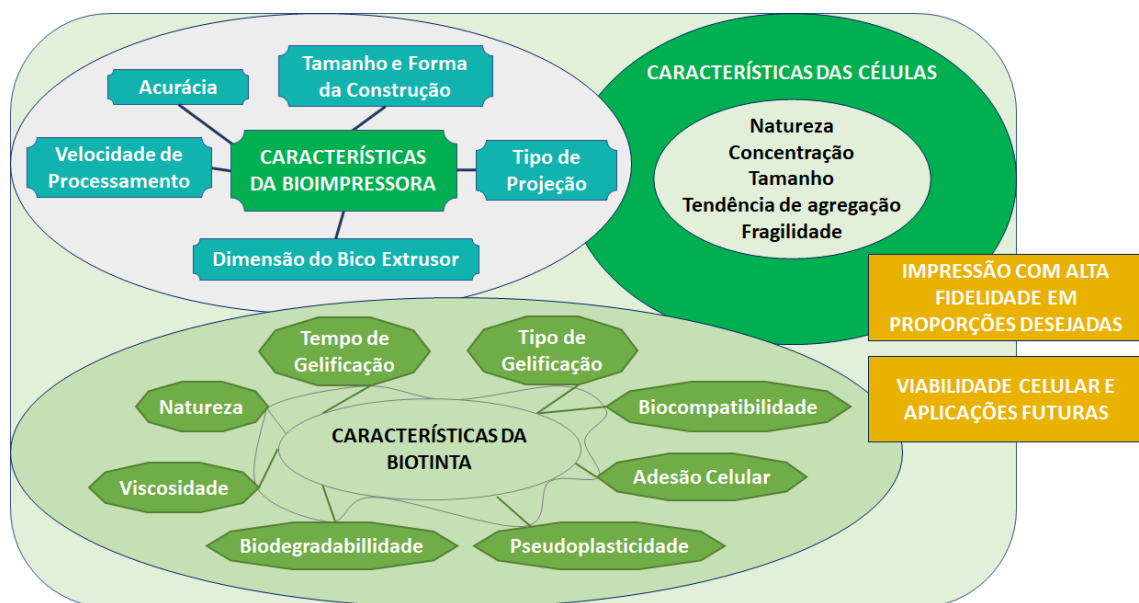
### **3.10.2 Printabilidade de uma biotinta**

No contexto da TERM, as biotintas possuem a potencialidade de adequação em estruturas tridimensionais (*scaffolds*) semelhantes a tecidos altamente

modeláveis e personalizadas de acordo com o requisito biológico (Faramarzi et al., 2018; Groll et al., 2019). Apesar da carência de estudos de base que visam definir e padronizar composições ideais de uma biotinta, progressos na modificação de hidrogéis para melhoria de bioatividade, sobrevivência celular e formação de tecido têm sido empreendidos, na busca de superar os desafios impostos pelas demandas físico-químicas de biofabricação (Malda et al., 2013).

A busca de formulações que suportem, com melhor eficiência, a adesão, migração e diferenciação celular, ou na definição de parâmetros da biotinta, tais como pH, solvente de preparo, reologia e estabilidade do hidrogel, e o ajuste de variáveis relacionadas ao equipamento a partir do qual o material será processado, como exemplo das bioimpressoras baseadas em sistemas de extrusão, onde o controle de temperatura e pressão de extrusão são fundamentais para garantir a preservação da integridade biológica celular, evitando cisalhamento, ao mesmo tempo em que possibilita a geração de estruturas mecanicamente estáveis (Malda et al., 2013; Groll et al., 2019; Valot et al., 2019; Stepanovska et al., 2021). Estes elementos que, em conjunto, atuam de forma interdependente para a consolidação de uma composição de biotinta de caráter biocurativo, determinam a printabilidade de uma biotinta (Figura 8).

**FIGURA 8.** Requisitos de printabilidade de uma biotinta para propósito biocurativo. Adaptado de VALOT et al. (2019)



### 3.10.3 *Scaffolds* biológicos

Como potencial no emprego de terapias regenerativas que buscam biomimetizar o microambiente extracelular e reconstituir a capacidade funcional de um local lesado, a utilização de *scaffolds*, suportes ou arcabouços temporários, garante estabilidade e compatibilidade tecidual, bem como viabilidade, adesão e estímulo à proliferação de células. O emprego de compostos bioativos, aliados à biodegradabilidade controlável de uma matriz estrutural porosa tridimensional, fornecem uma amplitude de possibilidades de aplicações em bioengenharia e apresentam-se como uma terapia alternativa, favorecendo a regeneração de tecido dérmico, ósseo, cartilaginoso e muscular (Malda et al., 2013; Meng et al., 2014; Nikolova et al., 2019; Crosby et al., 2020; Malekmohammadi et al., 2021).

Projetados para influenciar o ambiente físico, químico e biológico visando o estímulo da sinalização celular para o desenvolvimento de tecidos, os *scaffolds* oferecem aporte para adsorção, recrutamento e proliferação de fibroblastos e queratinócitos, bem como células precursoras, como células estromais mesenquimais (MSC) (Stessuk, 2016; Bhaskar et al., 2021). A modelagem de um *scaffold* ideal necessita levar em consideração características reprodutíveis e inerentes ao biomaterial selecionado, como porosidade e interconectividade dos poros, área de superfície, propriedades mecânicas e estruturais que sejam facilmente integradas ao tecido lesado, preservando o “desenho” e a microarquitetura previamente projetados *in silico*, ao passo que possibilitem o transporte eficiente de nutrientes e metabólitos envolvidos na regeneração vascular *in vivo* sem provocar imunogenicidade (Khan & Ahmad, 2013; Thomas, 2021).

Neste contexto, a manufatura aditiva, também denominada impressão tridimensional (3D), tem proporcionado grandes inovações técnicas e avanços em biofabricação, que possibilitaram a impressão de materiais biocompatíveis, incluindo componentes de suporte, como é o caso dos *scaffolds*. A impressão 3D de *scaffolds* tem sido aplicada na construção de modelos para o entendimento de mecanismos moleculares de detecção e diagnóstico de doenças *in vitro* e abordagens de tecidos e órgãos para a realização de transplantes, envolvendo complexidades associadas à seleção de materiais, tipos de células aderentes, bem como a agregação de fatores de crescimento e diferenciação, levando-se em conta a sensibilidade das células na construção de tecidos (Murphy & Atala, 2014; Bhaskar & Nagarjuna, 2021).



### 3.11 Biomanufatura 3D

#### 3.11.1 Histórico

Inicialmente referida como prototipagem rápida (RP), a Manufatura Aditiva (AM) compreende um conjunto de métodos e tecnologias disruptivas fundamentadas na deposição e adição de camadas de material a partir de uma forma pré-definida, geralmente estabelecida por modelagem virtual assistida (*Computer-Aided Design – CAD*) (Negi et al., 2013). Tal nomenclatura deriva da contraposição aos métodos tradicionais de usinagem, baseados em processos reducionais de um material de origem industrial (ASTM International, 2012), e é fundamentada na blenda de materiais por fusão, ligação ou solidificação de resinas líquidas, pós e soluções poliméricas, com parâmetros controláveis e interação ativa entre propriedades do material e parâmetros de processo (Abdulhameed et al., 2019).

Caracterizados pela construção em três fases principais de desenvolvimento (design do produto, manufatura e testagem), os processos de produção por AM estão intimamente relacionados ao estado físico e método de preparo dos materiais, técnica de construção das camadas, mudanças de fase, tipo de matéria-prima e requisitos de aplicação (Abdulhameed et al., 2019). A evolução dos princípios e técnicas de AM possibilitaram a associação e popularização do que hoje conhece-se por impressão 3D, especialmente devido à amplitude e profundidade das aplicações e contribuições para a Medicina Regenerativa e Translacional (Campbell et al., 2012).

O conceito de impressão 3D reporta aos anos 1970, mas os primeiros experimentos são datados de 1981, quando o inventor japonês Hideo Kodama empregou luz ultravioleta (UV) para promover o endurecimento de polímeros, criando objetos sólidos por AM, tecnologia de fotopolimerização que deu origem ao campo da estereolitografia (STL) (Savini & Savini, 2015). Tal tecnologia foi empregada por Charles Hull, em 1983, na reprodução de objetos tridimensionais em menor escala a partir da deposição por camadas utilizando impressão 3D (Shakor et al. 2019; Jiménez et al. 2019; Bhaskar et al., 2021).

Comumente empregada em tecnologias domésticas, a impressão jato de tinta (*inkjet*), desenvolvida inicialmente para aplicações domésticas pela Canon Company em 1979, foi desenvolvida e popularizada como tecnologia de impressão

3D pelo Massachusetts Institute of Technology (MIT) no início dos anos 1990 (Sekar et al., 2021). Consequentemente, a tecnologia expandiu suas potencialidades, do campo da manufatura convencional para a bioimpressão (ou biomanufatura), com a premissa de biomimetizar tecidos e órgãos humanos, a partir da modificação de impressoras 3D convencionais para emprego de células associadas a hidrogéis como biotintas para geração de produtos bioativos (Starly & Shirwaiker 2015).

Esforços pioneiros na construção de *scaffolds* sintéticos para reconstrução de bexiga humana utilizando decelularização e recelularização de células autólogas de pacientes foram empreendidos pelo Wake Forest Institute for Regenerative Medicine, amplificando as possibilidades de aplicação em biofabricação e Medicina Regenerativa (Munoz-Abraham et al. 2016).

### **3.11.2 Princípio da impressão 3D**

Os processos de AM são usualmente compreendidos de acordo com o tipo de material a ser empregado e técnica de deposição para fabricação. Impressoras 3D empregam parâmetros de coordenadas computacionais baseados em comando numérico computadorizado (CNC), e cada processo disponível atualmente no mercado possui capacidades, limitações e aplicações na construção de protótipos (Negi et al, 2013; Jang et al., 2018; Abdulhameed et al., 2019; Yap et al., 2020).

A primeira etapa comum dos processos de impressão 3D é a modelagem geométrica em software, em formato CAD, posteriormente convertido em uma malha triangular (Linguagem de Triangulação Padrão, ou STL) e pré-processado, orientado e segmentado em camadas de igual espessura por um tipo de software específico, o fatiador (ou *slicer*), por meio do qual as variáveis de construção, como número de camadas e preenchimento/infiltração do molde impresso, são definidas (Pandey et al., 2003).

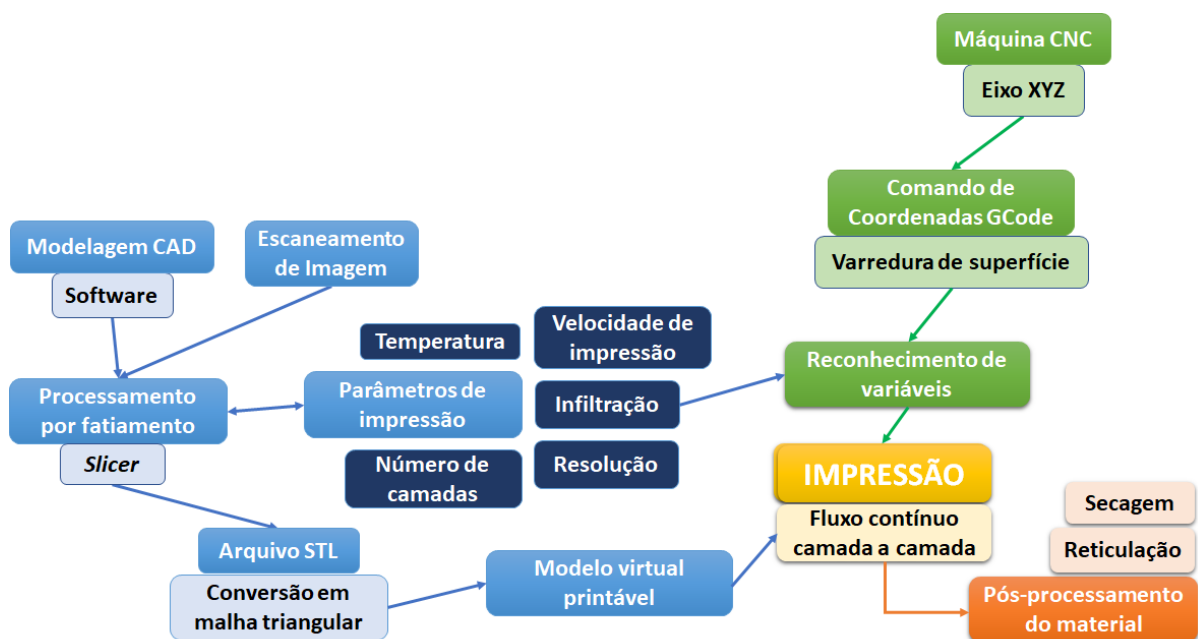
O mecanismo de impressão 3D é descrito por uma plataforma de três eixos (XYZ) que atua, a partir de coordenadas estabelecidas em um projeto de impressão em formato codificado e reconhecido pelo equipamento (*G-Code*). O pós-processamento é realizado a partir da remoção da peça física, limpeza e remoção de umidade da superfície e tratamentos para melhoria de aparência e resistência do material (Petrovic et al., 2011).

### 3.11.3 Bioimpressão 3D

A bioimpressão 3D é baseada fundamentalmente na deposição de biomaterial(is) com encapsulação ou carregamento de células e componentes biológicos em microescala para constituir estruturas micrométricas comparáveis à matriz extracelular do tecido biológico a partir de um sistema do controle do movimento de extrusores que realizam a deposição de uma solução de origem natural ou sintética, a biotinta, através de um bico de diâmetro definido, segundo a forma determinada pelo modelo ou estrutura de interesse (Zhang et al., 2015; Derakhshanfar et al., 2018).

Alterações na configuração do processo podem incluir a utilização de câmaras assépticas de fluxo laminar e modificações na cabeça de impressão para acondicionamento da biotinta em condições viáveis de temperatura ou fotocura do material para preencher requisitos reológicos específicos (Valot et al., 2019). De modo geral, o fluxograma do processo de bioimpressão 3D (Figura 9) é similar à impressão 3D convencional (Hospodiuk et al. 2017).

**FIGURA 9.** Mapeamento das etapas de obtenção e tratamento de modelos virtuais e parametrização de máquina envolvidos na bioimpressão 3D. Adaptado de KHADEMHOSEINI (2018) e ABDULHAMEED et al. (2019)



Como abordagem inovadora de construção em TERM e AM, a bioimpressão 3D surgiu como um processo tecnológico que visa biofabricar tecidos e órgãos em escala clínica em grande nível de detalhamento, a partir de deposição precisa de material e controle de distribuição dos componentes celulares da biotinta, aliados à economia de material, simplicidade de processo e ergonomia (Malda et al., 2013; Derakhshanfar et al., 2018; Valot et al., 2019).

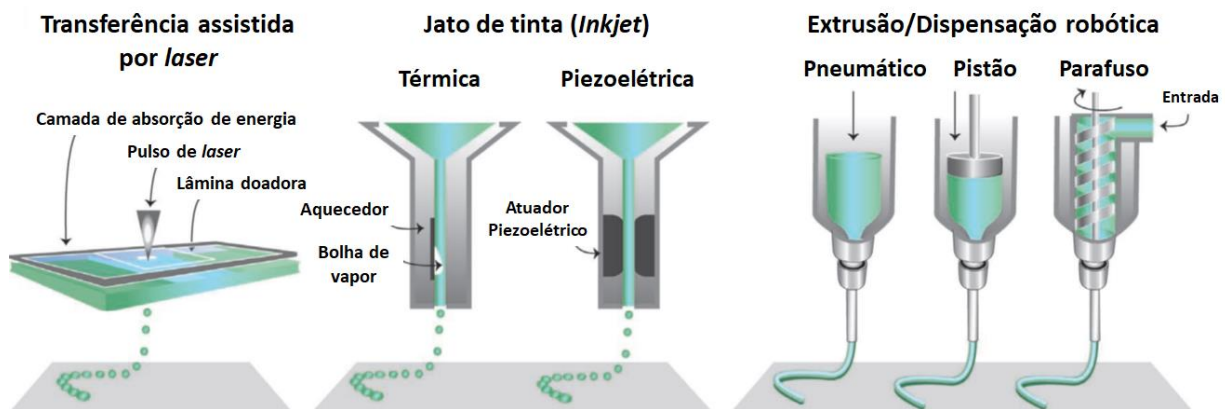
As técnicas de processamento baseadas em bioimpressão 3D iniciam-se a partir da aquisição de dados por raio-X, ressonância magnética (MRI), tomografia computadorizada, método de escaneamento para reconstrução ou por uso direto de software CAD para geração do modelo 3D, que é convertido em arquivo reconhecível por impressora (formato STL) e dividido em segmentos ou fatias horizontais em 2D com espessura, padrão de preenchimento e orientação customizáveis (Bhaskar et al., 2021).

Após seleção da biotinta de interesse de aplicação, é realizada a configuração dos parâmetros de impressão e controle do processo (Gu et al., 2020). Finalizada a impressão, o pós-processamento do biomaterial é promovido pela funcionalização, a exemplo da reticulação física, propiciando as condições para controle e distribuição de células e plaquetas nos poros do *scaffold* com objetivo de restaurar a anatomia tridimensional de tecidos e órgãos vitais, bem como replicar as complexidades fisiológicas envolvidas (Chua & Leong, 2017; Jang et al., 2018; Ngo et al., 2018).

#### **3.11.4 Técnicas de bioimpressão 3D**

A bioimpressão 3D é fundamentada em três abordagens primordiais, relacionadas do tipo de material e princípios de prototipagem: Extrusão por deposição de filamentos contínuos de biotinta, o gotejamento de pequenas gotas de material (*inkjet* ou jato de tinta) e a bioimpressão por fotocura (impressão assistida por *laser*) do material a ser solidificado camada a camada (Figura 10) (Munoz-Abraham et al. 2016; Kačarević et al. 2018; Gu et al., 2020).

**FIGURA 10.** Metodologias de bioimpressão 3D mais comumente empregadas em manufatura aditiva (MALDA et al., 2013)



A bioimpressão a partir da transferência direta induzida por *laser* utiliza uma lâmina coberta com uma camada de absorção de energia do *laser* e uma camada de biotinta contendo células. Empregando pulsos focalizados, a camada absorvente é evaporada, gerando uma alta pressão que impulsiona o biomaterial em direção a um coletor. Compatível com amplo espectro de viscosidade (1 a 300 mPa/s), pode ser aplicada a células de mamíferos sem ocorrência de cisalhamento e efeitos adversos sobre a viabilidade (Guillemot et al., 2010). Paralelamente, a fotocura do hidrogel para consolidação do material por ligação cruzada (*crosslinking*) pode provocar fototoxicidade celular e danos potenciais ao DNA, fator que torna o uso de fotoiniciadores um pré-requisito da técnica.

A bioimpressão por jato de tinta (*inkjet*) baseia-se na liberação de biotinta a partir de cabeças de impressão reguladas por mecanismos térmicos ou piezoelétricos, que produzem pulsos de pressão de vapor ou ondas acústicas que promovem a formação de gotículas de material (Iwanaga et al. 2015; Munoz-Abraham et al. 2016; Gu et al. 2020). Permite a construção de *scaffolds* com alta resolução de impressão e viabilidade celular, além da incorporação de múltiplos tipos de células de uma vez. Em decorrência das diferenças de viscosidade das biotintas, necessita ser combinada com outras abordagens para reproduzir estruturas multicelulares complexas.

A bioimpressão por extrusão de material é amplamente utilizada em função de sua versatilidade em criar estruturas utilizando múltiplos materiais ao mesmo tempo, por sua simplicidade e preço acessível. Atualmente aplicada desde biofilmes a construções de canais vasculares e chips microfluídicos, baseia-se na deposição

de uma biotinta de caráter viscoso ou viscoelástico como filamento contínuo sobre um substrato, através de um bico extrusor, seringa ou orifício, pela pressão exercida por um sistema de acionamento pneumático (ar comprimido), pistão (mecânico) ou parafuso conectado a um motor (Pati et al. 2014; Ji & Guvendiren, 2017; Jang et al., 2018).

### **3.11.5 Construção de *scaffolds* biológicos por extrusão**

A impressão 3D à base de extrusão é uma ferramenta universal para deposição e construção de um amplo espectro de biomateriais, oferecendo alta flexibilidade e grau de reprodutibilidade entre *scaffolds* bioimpressos quando empregados materiais adequados, essencialmente polímeros constituintes de géis (Valot et al., 2019). O sucesso da técnica depende de parâmetros, como o diâmetro da agulha de distribuição para deposição do material, viscosidade do biopolímero, velocidade de impressão e pressão de extrusão. Os processos de extrusão incluem técnicas que podem envolver a fusão do material por aquecimento, seguida de extrusão, como ocorrida com a modelagem por fusão e deposição (FDM), método mais comumente empregado.

Os principais desafios associados à extrusão concentram-se na menor resolução de impressão comparada a sistemas baseados em gotículas e impressão 3D a *laser*, e na formulação de uma biotinta que seja mecanicamente estável e mantenha-se biologicamente viável quanto à integridade celular durante impressão (Walker & Humphries, 2019; Sekar et al., 2021). Desta forma, o foco na busca de biomateriais candidatos a biotintas centra-se na busca de fontes com rápida gelificação na construção de estruturas 3D (Valot et al., 2019).

Ao mesmo tempo, o método oferece vantagem na capacidade de formatação de estruturas porosas e rapidez na construção de suportes de propriedades biomecânicas aprimoradas, que não podem ser equivalentemente alcançadas com uso de *laser* ou gotas (Hospodiuk et al., 2017).

### 3.11.6 Perspectivas clínicas no tratamento de feridas e novas abordagens terapêuticas

Como uma tecnologia que evoluiu da impressão 3D não biológica, empregando a construção de estruturas de aplicação biológica na forma *bottom-to-top* (da base para o topo), garantindo distribuição homogênea de células, densidade celular, vascularização e difusão de nutrientes em um substrato em microescala, a bioimpressão tem encontrado na combinação a outras técnicas, como a eletrofiação, e a mecanismos precisos de modelagem e reconhecimento de áreas e superfícies mais acessíveis para utilização terapêutica, como a fotogrametria e o escaneamento, um extenso campo de inovação em tratamentos personalizados, aliados ao desenvolvimento de novos biomateriais e formulações de biotinta, permitindo a reprodução de modelos complexos e heterogêneos com alta fidelidade anatômica (Ji & Guvendiren, 2017; Mondal et al., 2020; Bhaskar & Nagarjuna, 2021).

Especialmente em dermatologia, a busca por substitutos dérmicos e equivalentes biológicos, compostos por arcabouços de origem natural ou sintética que incluem componentes de origem celular no intuito de promover melhor cobertura e evolução do processo regenerativo, têm se apresentado como alternativa às limitações metodológicas associadas à disponibilidade de pele oriunda de doadores saudáveis no uso dos autoenxertos, popularmente conhecidos como “padrão ouro” no tratamento de feridas graves (Wainwright, 1995; Jones et al., 2002; Lesher et al., 2011; Albanna et al., 2019).

Neste contexto, as tecnologias de escaneamento 3D convencional e a fotogrametria (também conhecida como SfM ou *Structure from Motion*) têm auxiliado a contornar os entraves associados à estética dos substitutos de pele, principalmente às dimensões, topografia e profundidade variadas e personalizadas. Baseadas na reconstrução de modelos em 3D a partir de imageamento em profundidade (*scanners* portáteis) ou modelagem matemática por algoritmos de correspondências entre coleções de imagens não ordenadas obtidas a partir de diferentes pontos de vista (SfM), tais metodologias visam capturar texturas e extrair as características de uma superfície acometida por lesões epiteliais ou profundas através da geração de malhas virtuais que fornecem estratégias para delimitação de tratamentos com robustez, precisão, integridade e escalabilidade (Schönberger & Frahm, 2016).

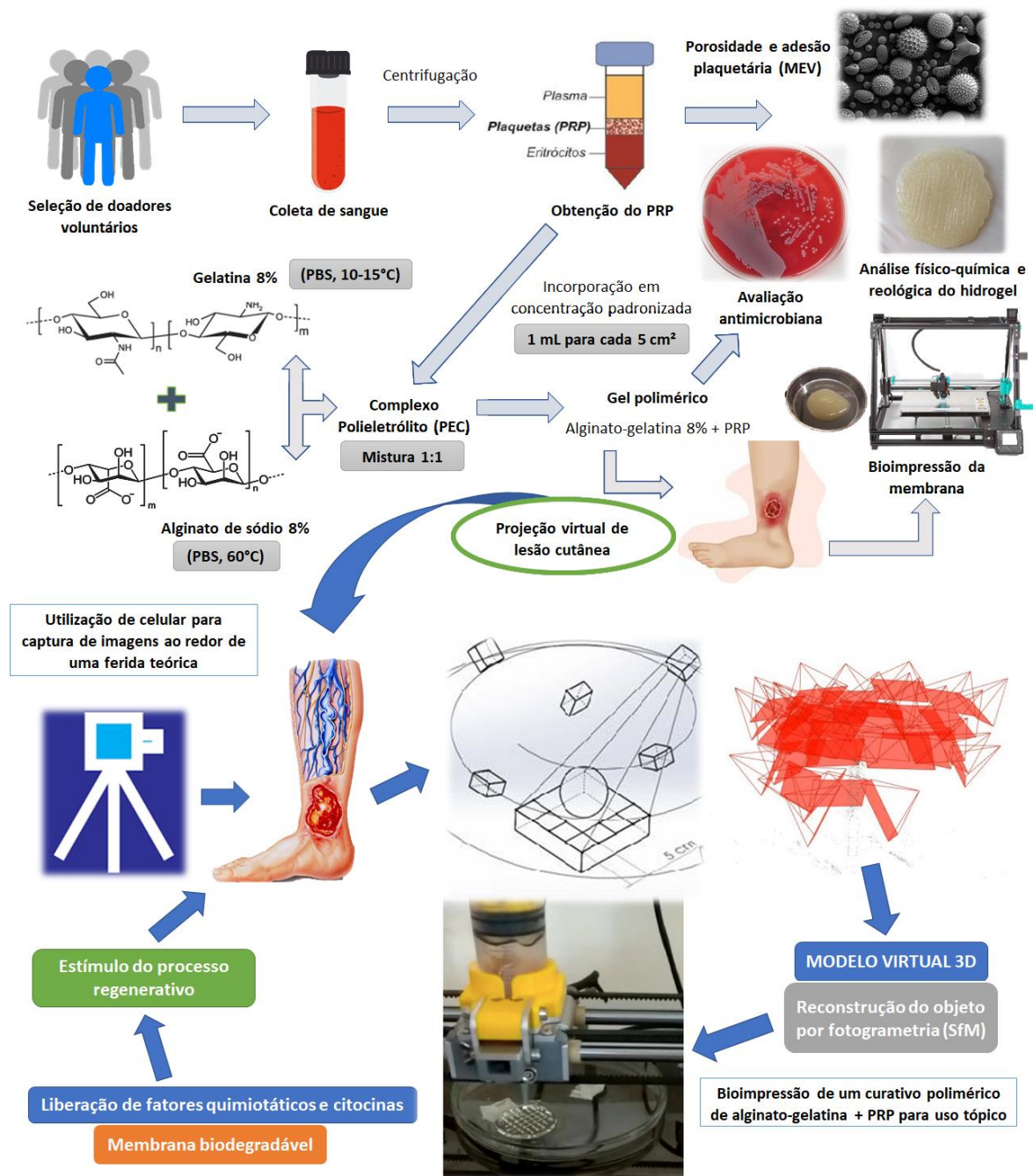
Apesar da potencialidade dos *scaffolds* poliméricos na promoção de suporte adequado para adesão celular, as matrizes construídas tridimensionalmente podem não fornecer integralmente um microambiente com características funcionais necessárias para regeneração tecidual. Neste sentido, a incorporação de nanopartículas carregadas de componentes bioativos, bem como fatores de crescimento tem se mostrado uma opção viável no aprimoramento das funcionalidades biológicas dos suportes, verificada a labilidade dos fatores à degradação e proteólise e busca de manutenção da bioatividade (Bierhalz et al., 2017; Yu et al., 2019; Singh et al., 2020; Rauf et al., 2021; Tan et al., 2021).



#### 4. DESENHO EXPERIMENTAL

O presente estudo corresponde a uma metodologia de impressão 3D tridimensional de um hidrogel polimérico de alginato-gelatina e plasma rico em plaquetas, empregado como aditivo ao *scaffold*, delineado a partir de projeção virtual de um ferimento cutâneo teórico. A Figura 11 descreve as etapas de caracterização do biomaterial e processamento em manufatura aditiva para obtenção do produto.

**FIGURA 11.** Etapas-chave do processo de automatização de impressão 3D de um biocurativo de alginato-gelatina/PRP



## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Isolamento e Padronização do Plasma Rico em Plaquetas**

#### **5.1.1 Obtenção de sangue total**

O material foi obtido a partir de doadores voluntários saudáveis, com faixa etária entre 22 e 28 anos (sorologia negativa para patologias, como HIV, Hepatite B e C, Sífilis e Chagas), por meio de punção venosa do antebraço, mediante concordância com a doação e uso do material biológico por meio de preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a concessão deste para fins de estudo. Para cada paciente participante do presente estudo, foram obtidas três alíquotas de 10 mL de material biológico. O sangue total foi acondicionado em tubos do tipo vacutainer contendo 1 mL de anticoagulante citrato de sódio a uma concentração de 3,2% (volume de 4,5 mL) (BD Bioscience, New Jersey, USA) para cada 9 mL de sangue coletado, de modo a preservar a composição plaquetária.

O sangue coletado de cada doador (n=5) foi fracionado e transferido para tubos de ensaio de vidro para a execução do protocolo de obtenção do concentrado de PRP.

#### **5.1.2 Obtenção do PRP**

O concentrado de plasma rico em plaquetas foi obtido a partir de centrifugações diferenciais das amostras, seguindo o protocolo proposto por Vendramin et al. (2009), com modificações realizadas por Marques et al. (2015), executado a partir de padronização metodológica. O sangue total acondicionado em tubos de citrato foi fracionado e transferido para tubos tipo Falcon de 15 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) centrifugado inicialmente a uma velocidade de 400 g, durante 10 minutos, para promover a separação do plasma. Posteriormente, a fração sobrenadante contendo plasma foi coletada e realizada a transferência para um tubo Falcon de 15 mL (BD, New Jersey, Estados Unidos). O plasma foi

novamente centrifugado a uma rotação de 800 g, durante 10 minutos, promovendo a concentração plaquetária.

Seguindo-se a segunda etapa de centrifugação, o volume equivalente a 2/3 da fração líquida superior do tubo foi descartada, equivalente às frações de plasma pobre em plaquetas (PPP) e média concentração de plaquetas (PMP), obtendo-se na ressuspensão do 1/3 inferior do volume a fração definida como PRP.

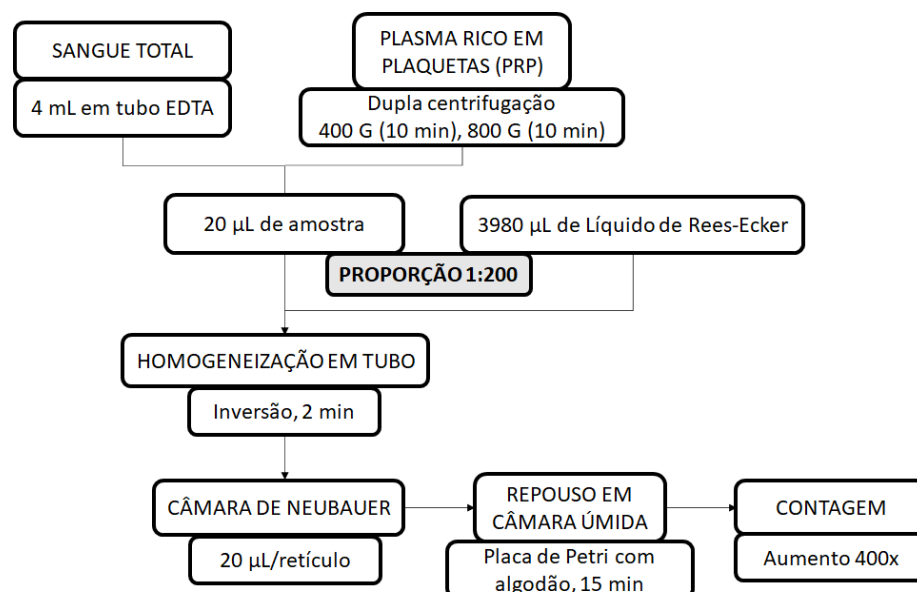
Para cada 1 mL de PRP obtido, foi empregado um volume de sangue total coletado correspondente a 10 mL, conforme descrito por Stessuk (2016).

### 5.1.3 Avaliação quantitativa dos componentes sanguíneos

A quantificação dos elementos sanguíneos para padronização do PRP foi determinada a partir de contagem de leucócitos e plaquetas em momento anterior (sangue total) e posterior à dupla centrifugação (plasma concentrado), em câmara de Neubauer.

Para avaliação da concentração de plaquetas, as amostras sanguíneas foram submetidas à quantificação inicial em microscópio óptico por meio do método direto de Rees-Ecker (Rees & Ecker, 1923) (Figura 12).

**FIGURA 12.** Metodologia direta de contagem de plaquetas por Rees-Ecker



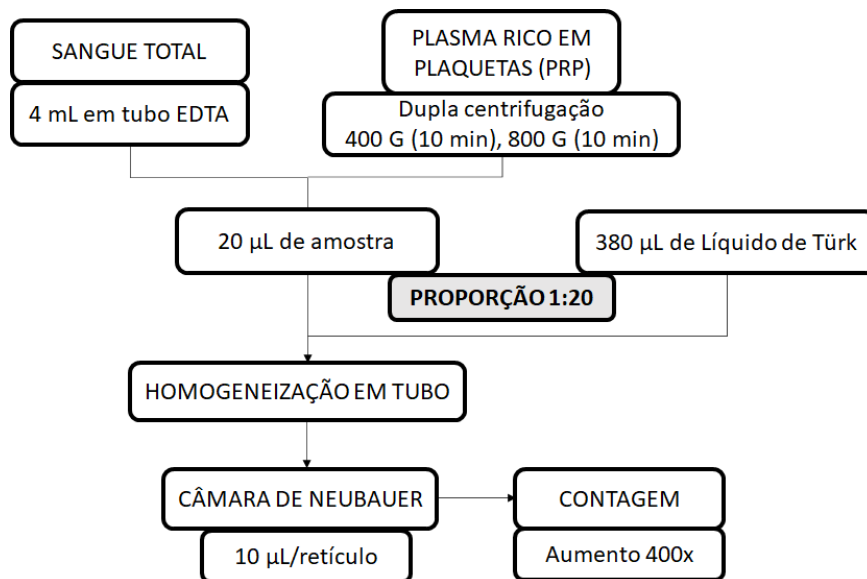
Para o método de Rees-Ecker, foi utilizado o líquido de Rees-Ecker obtido comercialmente (Êxodo Científica®, Hortolândia, SP, Brasil). Os valores de

referência para a concentração plaquetária situam-se na faixa entre  $1,5 \times 10^5$  e  $4,5 \times 10^5$  plaquetas/ $\text{mm}^3$  de sangue ou  $1,5 \times 10^8$  a  $4,5 \times 10^8$  plaquetas/mL de sangue, com contagem de elementos no retículo central da câmara. A concentração plaquetária, em  $\text{mm}^3$  de amostra (sangue total ou PRP), pelo método de Rees-Ecker, é determinada pela relação seguinte, onde  $N_{PL}$  representa o total de plaquetas contadas nos quadrados selecionados na câmara de Neubauer:

$$\text{Plaquetas}/\text{mm}^3 = N_{PL} \times 10^4 \quad (\text{I})$$

A avaliação quantitativa de leucócitos totais no sangue e após a purificação do plasma por centrifugação foi efetuada com utilização do líquido de Türk (Êxodo Científica®, Hortolândia, SP, Brasil), seguindo o fluxograma da Figura 13:

**FIGURA 13.** Metodologia direta de contagem de leucócitos por Türk



A concentração leucocitária por Türk é determinada pela equação II, onde  $N_L$  representa o total de leucócitos por  $\text{mm}^3$  de amostra (sangue total ou PRP) contados nos quadrados maiores das extremidades da câmara de Neubauer. Os valores de referência concentram-se na faixa de  $4 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  leucócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue, ou  $4 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  leucócitos/mL de sangue:

$$\text{Leucócitos}/\text{mm}^3 = N_L \times 50 \quad (\text{II})$$

De forma a verificar os efeitos da centrifugação diferencial sobre a concentração plaquetária após a separação plasmática, a eficiência na recuperação do plasma ( $E_{(pl)PS}$ ) foi mensurada, de acordo com a equação III.

$$E_{(pl)PS} = \frac{V_{(pl)PS}}{V_{(pl)ST}} \times 100 \quad (III)$$

Na equação,  $V_{(pl)PS}$  representa o volume de plasma obtido após a centrifugação, correspondente ao plasma sobrenadante (PS), enquanto  $V_{(pl)ST}$  está associado ao volume de plasma no sangue total (ST), sendo determinado de acordo com a equação IV.

$$V_{(pl)ST} = V_{ST} \times (1 - H) \quad (IV)$$

Na equação IV,  $V_{ST}$  é o volume de sangue total, no momento pré-centrifugação, e  $H$  representa o hematócrito (volume de eritrócitos).

De modo a avaliar e validar a eficácia da centrifugação na concentração plaquetária no PRP, a eficiência de recuperação das plaquetas ( $E_{(pt)PRP}$ ) foi determinada a partir da equação V.

$$E_{(pt)PRP} = \frac{N_{(pt)PRP} \times V_{(pl)PRP}}{N_{(pt)ST} \times V_{(pl)ST}} \times 100 \quad (V)$$

A variável  $N_{(pt)PRP}$  expressa a concentração de plaquetas no PRP,  $N_{(pt)ST}$  a concentração de plaquetas no sangue total, e  $V_{(pl)PRP}$  expressa o volume de PRP após a centrifugação.

O fator de concentração plaquetária ( $F_{CP}$ ) foi determinado a partir da relação entre a concentração de plaquetas no PRP e a concentração plaquetária no sangue total, definida pela equação VI.

$$F_{CP} = \frac{N_{(pt)PRP}}{N_{(pt)ST}} \times 100 \quad (VI)$$

## 5.2 Obtenção do biogel de alginato-gelatina/PRP

### 5.2.1 Materiais de preparo da blenda polimérica

A obtenção do *scaffold* polimérico composto de alginato-gelatina foi realizada conforme metodologia desenvolvida no Laboratório de Genética e Terapia Celular. A gelatina utilizada na preparação foi obtida comercialmente (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), assim como o alginato de sódio de formulação de baixa viscosidade (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

Para preparo do gel, foi utilizado tampão fosfato (PBS), pH 7,2 (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), previamente esterilizado em autoclave com fator de diluição 1:10, de modo a controlar o pH do gel a um valor próximo ao encontrado na superfície da pele (entre 5,5 e 6,5).

### 5.2.2 Preparo do hidrogel

De acordo com testes de padronização previamente estabelecidos no Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel) baseando-se na metodologia de Saarai et al. (2013), o gel utilizado na modelagem do *scaffold* biológico consistiu em uma mistura de gelatina e alginato de sódio em tampão PBS. A gelatina foi devidamente pesada e solubilizada em PBS resfriado previamente em temperatura entre 10-15°, em proporção de 8% m/v, sendo posteriormente aquecida na mistura com o alginato. O alginato de sódio foi pesado separadamente e dissolvido vagarosamente a uma proporção de 8% m/v em PBS, aquecido a uma temperatura de 50°C, mantendo-se a agitação constante para homogeneização. Para dissolução dos componentes e composição da blenda polimérica para obtenção do hidrogel, a gelatina foi adicionada vagarosamente à solução de alginato na proporção de 1:1.

Desta forma, para o preparo de 10 mL de amostra, 0,4 g de cada componente foi solubilizado, separadamente, em 5 mL de PBS, de forma que a diluição resultante da matriz de hidrogel polimérico para bioimpressão constituísse uma concentração de 4% m/v de cada componente na mistura, compreendendo uma blenda Alg-Gel na proporção total de 8% m/v em conteúdo polimérico na mistura dos componentes.

Para verificação da variação de acidez do hidrogel, foi realizado o monitoramento do pH das amostras preparadas, em triplicata, ao longo do período de resfriamento, comparando-se o preparo das blendas poliméricas em tampão PBS (pH 7,2) e água deionizada (pH 5,7), utilizando pHmetro digital PG 1800 (Gehaka, São Paulo, Brasil).

### 5.2.3 Adequação do PRP como adjuvante biológico

Após resfriamento da blenda de hidrogel até a temperatura fisiológica (37°C), o PRP isolado foi adicionado adequando-se a padronização estabelecida previamente por Stessuk (2016), empregando-se 1 mL de PRP para cada 5 cm<sup>2</sup> de área de lesão da pele. Desta forma, para o molde de análise foi utilizada a proporção de 1 mL de PRP para cada 5 cm<sup>3</sup> de disco impresso considerado para impressão, volume que proporcionou maior disponibilidade de fatores de crescimento, otimização dos parâmetros reológicos, como tempo de formação e consolidação do gel, e variáveis de biocompatibilidade definidas, como estabilidade, adesão e prevalência das plaquetas ao *scaffold*.

## 5.3 Caracterização reológica do hidrogel

### 5.3.1 Densidade

O hidrogel de alginato-gelatina (Alg-Gel) foi avaliado, quanto a densidade absoluta do material, em picnômetro de vidro Gay-Lussac de 50 mL, levando-se em consideração a calibração do equipamento a temperatura de 20°C. O material fresco, recém preparado conforme as diluições dos componentes seguindo as proporções anteriormente descritas, foi resfriado até a faixa de 20-25°C e depositado em recipiente até seu transbordamento. A avaliação foi realizada em triplicata.

A densidade do material ( $\rho$ ), em kg/m<sup>3</sup>, foi avaliada a partir da diferença de massa do conjunto ( $M_2$ ) e a massa do picnômetro vazio ( $M_1$ ), relacionada com o volume do sistema na temperatura de calibração, conforme equação VII.

$$\rho = \frac{M_2 - M_1}{V_{20^\circ C}} \quad (\text{VII})$$

### 5.3.2 Viscosidade

A viscosimetria do material foi realizada em viscosímetro do tipo copo Ford (Vical Instrumentos, São Paulo, Brasil), de acordo com as normativas ASTM D1200:2018 (American Society for Testing Materials, 2018) e ABNT NBR5849:2015 (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2015), selecionando-se o orifício-padrão de escoamento nº5, empregado para a faixa de viscosidade cinemática de 200 a 1200 cSt (centistokes). Tratando-se de um fluido não-newtoniano de caráter pseudoplástico, foi empregado o hidrogel recém-preparado para realização da análise.

O equipamento foi nivelado e o hidrogel preenchido no recipiente metálico até o nível mais elevado, fechando-se o orifício com o dedo. O excesso foi removido com uma lâmina de vidro plana. Ajustado o nível do fluido no copo, o bico foi desobstruído manualmente, iniciando-se a cronometragem do escoamento até o momento da primeira interrupção (ou “corte”) de fluxo normal. Neste instante, o tempo foi registrado, e a viscosidade cinemática calculada a partir da relação associada ao orifício empregado, descrita na equação VIII (Liptak & Venczel, 2016).

$$v = 12,1(t - 2,00) \quad (\text{VIII})$$

Onde  $v$  representa a viscosidade cinemática do fluido em  $\text{mm}^2/\text{s}$  ou centistokes ( $1 \text{ cSt} = 1 \text{ mm}^2/\text{s}$ ), e  $t$  expressa o tempo de escoamento do fluido, em segundos, aferido durante o ensaio. As amostras de hidrogel foram avaliadas em triplicata, e os resultados expressos em cSt.

## 5.4 Adequação de parâmetros de impressão

### 5.4.1 Definição de modelo-base de estudo

A blenda alginato-gelatina/PRP recém preparada foi utilizada como base para construção de um *scaffold* para a caracterização do material de potencial atividade biocurativa. Os tratamentos físico-químicos e microbiológicos foram empreendidos utilizando um modelo de prova de forma discoide, com diâmetro de



40 mm, delineado virtualmente para impressão, levando em consideração o número de camadas, preenchimento e infiltração do material.

Foram testadas, ao todo, quatro configurações de impressão dos discos, com duas configurações em dupla camada e duas configurações com quatro camadas de extrusão, todas apresentando uma morfologia de malha retilinear de porcentagem de infiltração da área de impressão dos discos de biogel (densidade de preenchimento ou densidade de fio de impressão) de 100% para a base do *scaffold* (primeira camada) e entre 35 e 100% para a segunda camada.

O processamento dos discos foi realizado no software de gerenciamento de produção por fatiamento 3D (*slicer*) Simplify3D, por meio do qual o arquivo geométrico em formato STL modelado foi transposto para a impressora, adequando-se os parâmetros de impressão, como a quantidade de material, densidade e volume de hidrogel para extrusão do corpo de prova e impressão de forma homogênea e contínua.

#### **5.4.2 Definição dos parâmetros de máquina**

Os parâmetros de bioimpressão, definidos de acordo com o aspecto reológico de testes experimentais da formulação, foram inseridos na programação do software Simplify3D, onde foi estabelecida a velocidade de extrusão ideal de 30 mm/s, multiplicador de extrusão de 0,2 (fator de controle da quantidade de filamento liberado a partir do bico extrusor, ajustando a taxa de fluxo de material) e profundidade de extrusão (espessura de filamento que sai do sistema extrusor) igual a 2 mm.

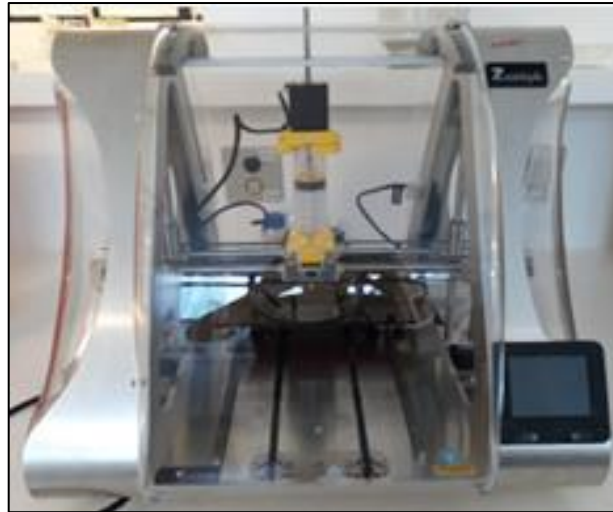
#### **5.4.3 Impressão do modelo de estudo**

A partir do molde projetado em software e ajustados os parâmetros de impressão necessários no software Simplify3D, o disco de gel polimérico associado ao PRP foi acondicionado em uma seringa e impresso em impressora tridimensional multifuncional do tipo extrusora ZMorph 2.0 VX (ZMorph S.A., Wrocław, Polônia).

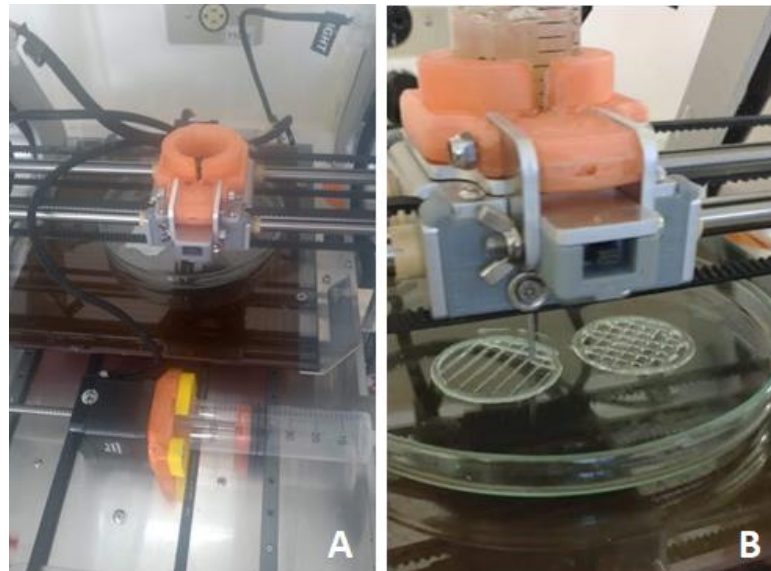
O sistema de extrusão consistiu em um bico extrusor composto por uma agulha hipodérmica de uso veterinário de dimensões 50x20 mm acoplada a uma seringa, associadas ao sistema motor previamente programado para realizar a

deposição do hidrogel sobre uma placa de Petri, de modo que a gelificação do material fosse consolidada pelo resfriamento na superfície de impressão.

**FIGURA 14.** Impressora tridimensional ZMorph 2.0 VX, utilizada nos testes experimentais envolvendo impressão de *scaffolds* poliméricos no laboratório de Genética e Terapia Celular da Faculdade de Ciências e Letras/UNESP Assis (GenTe Cel). Acervo próprio.



**FIGURA 15.** Conjunto de extrusão (seringa hipodérmica, motor e êmbolo) da bioimpressora (A). Teste de impressão dos discos de hidrogel Alg-Gel em diferentes formatações (B). Acervo próprio.



#### 5.4.4 Pós-processamento do hidrogel

A biomembrana polimérica obtida por extrusão do material foi depositada em placa de Petri contendo discos de filtro de papel embebidos em uma solução aquosa

de cloreto de cálcio  $\text{CaCl}_2$  dihidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha) a uma concentração de 2,0% m/v, com o intuito de promover a reticulação (*crosslinking* ou ligação cruzada das cadeias poliméricas) dos grupos químicos carboxila do alginato de sódio que não estavam ligados aos grupos amino do polímero de gelatina.

Para consolidação da reticulação na camada de topo do hidrogel, a solução de  $\text{CaCl}_2$  2,0% m/v foi aspergida sobre o disco, mantendo a estabilidade do material. As membranas de hidrogel resultantes da mistura, caracterizados por uma blenda polimérica do tipo semi-IPN, foram mantidas em repouso em estufa durante 24 horas, em temperatura ambiente.

As membranas obtidas foram lavadas duas vezes em 200 mL de água deionizada durante 30 min, uma vez em 250 mL de tampão HEPES a 10 mM durante 30 min, e uma nova etapa de lavagem, em 500 mL de água deionizada durante 30 min, de acordo com metodologia proposta por Caetano et al. (2015). Por fim, as membranas foram secas a 37°C durante 6 horas. Desta forma, seguiram-se as análises das características físico-químicas e estruturais do biomaterial.

## **5.5 Análise físico-química do biomaterial**

### **5.5.1 Aspecto visual e manuseabilidade**

Os discos de hidrogel foram qualitativamente caracterizados de forma subjetiva, antes das demais análises, em relação ao controle visual e manuseio, de forma que os suportes que apresentaram aspecto irregular, descontínuo, liquefeito ou quebradiço foram descartados dos demais ensaios, visando o emprego de biofilmes homogêneos, visto que estas características dificultariam ou impediriam a realização de análises posteriores.

As amostras foram submetidas a visualização em estereoscópio TIM-10B (Opton, Cotia, Brasil) e microscópio óptico Eclipse E2000 (Nikon, Tóquio, Japão), observando-se a distribuição de bolhas e homogeneidade do filme polimérico.

### **5.5.2 Degradação do hidrogel**

O conteúdo de água dos hidrogéis reticulados foi determinado por meio de medição gravimétrica da massa úmida e massa seca dos biofilmes. As amostras,

depositadas em placas de Petri, foram mantidas em dessecador a vácuo para consolidação do processo de gelificação, durante um período de 120 horas. Decorrido o intervalo requerido, as amostras passaram por uma etapa de remoção de gotículas de água residuais por meio de um filtro de papel, sendo posteriormente pesadas, valor designado como a massa úmida. O conteúdo de água foi determinado de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Conteúdo de água} = \frac{m_w - m_s}{m_w} \times 100\% \quad (\text{IX})$$

Em que  $m_w$  representa a massa úmida dos hidrogéis reticulados, e  $m_s$  expressa a massa seca das amostras.

A partir dos dados de umidade, foi estabelecido o perfil de degradação das amostras de hidrogel alginato-gelatina, e determinada a perda de massa e taxa de degradação média ao longo do processo de secagem. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

### 5.5.3 Capacidade de hidratação dos discos de hidrogel

Para avaliação do comportamento dilatante, discos de hidrogel Alg-Gel impressos foram imersos em 10 mL de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 em temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ). A avaliação da dilatação dos géis foi realizada gravimetricamente, de acordo com a metodologia empregada por Saari et al. (2013).

As amostras foram removidas da solução tampão em diferentes intervalos de tempo previamente definidos (30 min, 60 min, 90 min e 120 min), secas com papel filtro para remoção de líquido excedente, pesadas e novamente mantidas em tampão.

A dilatação dos hidrogéis foi determinada com base na relação estabelecida para cálculo do conteúdo de água, relacionando a diferença entre massas com a massa da amostra seca, segundo a equação:

$$\text{Intumescimento (\%)} = \frac{m_D - m_0}{m_0} \quad (\text{X})$$

Em que  $m_D$  representa a massa dos hidrogéis dilatados, em intervalos de tempo estabelecidos, e  $m_0$  expressa a massa seca das amostras.

A dilatação das amostras também foi observada no pós-processamento dos hidrogéis, após secagem dos discos em dessecador durante 24 horas. Os hidrogéis foram mantidos em solução tampão PBS durante 2 horas, e a variação de massa das amostras foi verificada para o gel seco e nos instantes 30, 60, 90 e 120 minutos, correspondentes aos quatro momentos de lavagem descritos pelo procedimento 5.4.4.

## 5.6 Avaliação antimicrobiana dos hidrogéis

A qualificação da presença de contaminantes no material de potencial biocurativo foi conduzida por análise comparativa em hidrogéis alginato - gelatina 8% associados ao PRP, em duas formatações de diâmetro, preparados conforme procedimento descrito na etapa 5.2, e depositados em placas de Petri grandes (120 mm x 20 mm), de forma que constituíssem, após resfriamento durante 20 minutos, filmes laminares homogêneos. Os filmes poliméricos foram reticulados em cloreto de cálcio 2%, permanecendo imersos durante 10 minutos.

Após remoção da umidade residual em papel filtro, os filmes foram esterilizados em luz ultravioleta (365 nm) em fluxo laminar equipado com lâmpada UV 15W, por quatro diferentes intervalos de tempo – 0, 30, 60 e 90 minutos, de acordo com o protocolo proposto por Koga et al. (2018). Decorrido o tempo designado, os filmes de hidrogel foram cortados em pequenos discos circulares (1 cm de diâmetro X 0,5 cm de espessura), em triplicatas, relativas a cada um dos pontos estudados. Paralelamente, para análise comprobatória, filmes poliméricos de 4 cm de diâmetro X 0,5 cm de espessura foram seccionados e dispostos em ágar Sangue em triplicatas, seguindo o procedimento anteriormente descrito, correspondentes às amostras do modelo-base impresso.

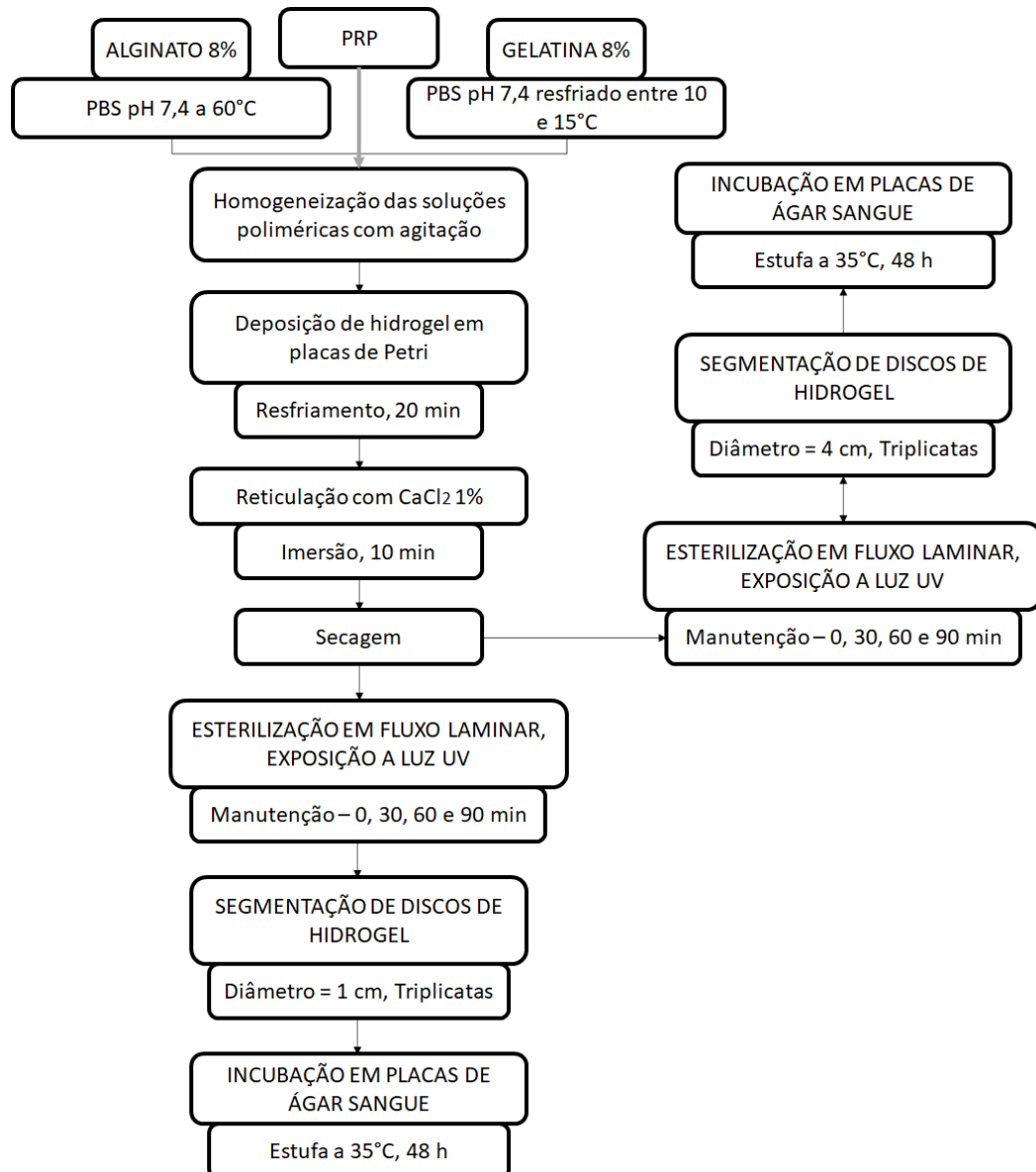
Para detecção de contaminantes e manutenção da inocuidade das amostras, foram utilizados os meios ágar Müller-Hinton (Kasvi<sup>®</sup>, São José dos Pinhais, Brasil), ágar Plate Count (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha) e ágar Sangue (Neogen<sup>®</sup>, Lansing, MI, USA), para identificação da presença de potenciais microrganismos fermentadores gerais (meio não-seletivo) e bactérias entéricas de

potencial infeccioso, bem como na detecção de sensibilidade para manutenção de culturas microbianas que pudessem ser desenvolvidas.

Em cada placa em triplicata analisada, quatro discos de 1 cm foram dispostos sobre os meios e mantidos, durante 48 horas, em estufa incubadora a uma temperatura de 35°C. O procedimento sucedeu-se aos discos de 4 cm, dispostos individualmente nas placas incubadas (Figura 16).

A contaminação das amostras por crescimento microbiano foi analisada em escala macroscópica, por observação dos aspectos morfológicos dos discos de hidrogel, comparativamente entre as replicatas.

**FIGURA 16.** Análise qualitativa da presença de contaminantes em hidrogéis esterilizados em UV em diferentes intervalos de tempo



## **5.7 Automação do processo de obtenção do biocurativo**

### **5.7.1 Modelagem digital por fotogrametria (SfM)**

Determinadas as características de padronização e printabilidade em modelo de prova, foi realizada a projeção da membrana por modelagem virtual de uma ferida teórica por fotogrametria, a partir de imagens capturadas por meio de fotografias pela câmera de celular, com resolução de 12,1 Megapixels (MP).

Nesta abordagem, entre 60 e 90 fotografias (tamanho 4632x2608) foram retiradas de ferimentos presentes na coxa de um manequim geriátrico adulto de poliuretano e PVC para simulação de traumas (3B Scientific, Joinville, Brasil), utilizando diferentes angulações e perspectivas, mantendo-se a distância relativa ao objeto-alvo. Os modelos tiveram suas dimensões aferidas manualmente, para efeitos de reconstrução digital de suas formas em software.

Utilizando reconhecimento digital e alinhamento de pontos comuns, as imagens foram processadas em modelos tridimensionais no software Agisoft® Metashape 1.5, criando nuvens densas de pontos de intersecção das imagens para gerar um modelo virtual que visa mimetizar a ocorrência de úlceras de pressão (escaras) superficiais e lacerações profundas de difícil cicatrização, com o intuito de direcionar o tratamento a partir da aplicação de um curativo anatômico compatível com as condições fisiológicas requeridas pelo tecido.

### **5.7.2 Tratamento do modelo de biocurativo**

Após a projeção virtual em alta resolução, o modelo oriundo da reconstrução 3D foi processado a partir da remoção de arestas e regiões periféricas no software Metashape, gerando um arquivo de extensão STL com o modelo da região de interesse onde encontrava-se a ferida de forma isolada. A cobertura para preenchimento da superfície do ferimento foi realizada por modelagem no software 3D Builder, associando o modelo gerado a uma forma geométrica íntegra da superfície, de modo que a composição resultante desta sobreposição pudesse fornecer o formato anatômico ideal de preenchimento para deposição do filme curativo.

O preparo do modelo virtual para impressão foi realizado no software de fatiamento PrusaSlicer 2.3.3, por meio do qual a malha tridimensional triangular criada a partir do modelo oriundo do escaneamento virtual (arquivo STL) foi transposta para a impressora em linguagem de máquina e dividida em camadas de impressão, utilizando as configurações personalizadas de quantidade de material (atribuídas pelo fatiador), densidade e volume de hidrogel associado ao PRP, de acordo com o requisito necessário para preenchimento da ferida.

### 5.7.3 Bioimpressão do modelo

Previamente à bioimpressão do hidrogel, foram realizados testes com creme Nivea® Facial 5 em 1 (Beiersdorf, Itatiba, Brasil), utilizado como parâmetro reológico a fim de verificar a definição e a acurácia de impressão do curativo projetado virtualmente, bem como o ajuste do preenchimento à ferida teórica no modelo real.

Definidos os parâmetros de impressão e fatiamento do modelo virtual, bem como a proporção de PRP incorporado à blenda de acordo com o volume de preenchimento, o hidrogel preparado segundo as proporções descritas na metodologia do item 5.2 foi acondicionado, a 37°C, em seringa hipodérmica descartável de 10 mL com agulha hipodérmica 18 G1½ 30x0,8 mm (Descarpack, São Paulo, Brasil) como bico extrusor.

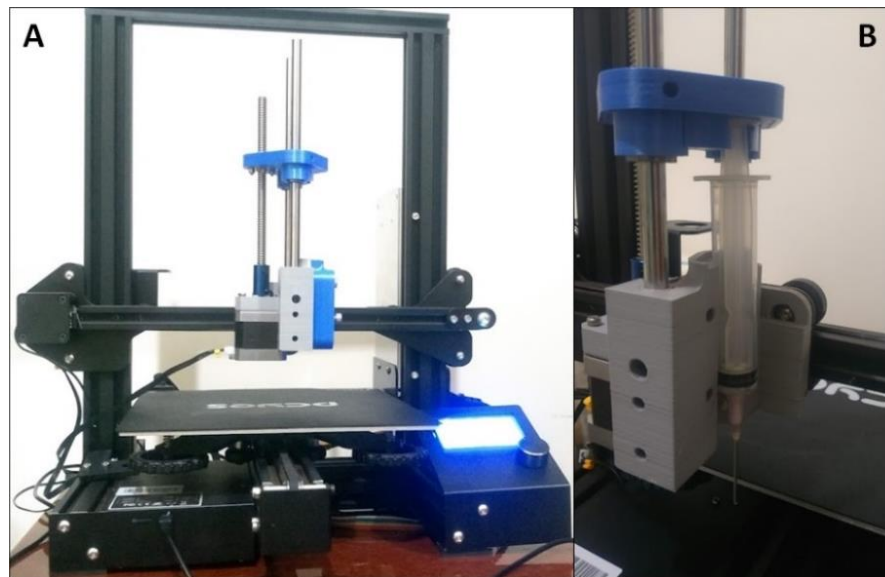
Para a bioimpressão do biocurativo para preenchimento da ferida teórica virtual de um paciente com úlcera de difícil cicatrização, o conjunto formado pela seringa preenchida e agulha foi acoplado ao sistema extrusor de uma bioimpressora 3D Creality Ender-3 FDM (Bioender) (BioEdTech, São Paulo, Brasil), que realizou a deposição do hidrogel com PRP incorporado sobre a superfície da ferida do manequim, umedecida com algodão embebido em cloreto de cálcio a 2%, seguindo o mapeamento estabelecido e os parâmetros de máquina configurados no *slicer*.

O *setup* do posicionamento do extrusor, bem como a origem e orientação da impressão foram determinados no software de comando Pronterface.

O biocurativo foi finalizado com a aspersão de cloreto de cálcio a 2% sobre a área preenchida, visando melhor adesão à ferida e consolidação do formato do filme polimérico na superfície de estudo, completada após 10 minutos.



**FIGURA 17** – Impressora extrusora utilizada na construção dos biocurativos personalizados (**A**) e sistema de extrusão com seringa e agulha como bico extrusor (**B**)



## 5.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para verificação da existência de normalidade na distribuição das amostras e suas variâncias, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Para comparação dos parâmetros físico-químicos de umidade, reologia e densitometria, e averiguação de significância das concentrações plaquetárias, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA *one way*), procedida pelo teste *post hoc* de Tukey para dados paramétricos, e teste de Kruskal-Wallis e teste de Student Newman-Keuls para análise estatística não paramétrica. O índice de significância foi considerado quando  $p < 0,05$ . Todos os testes foram executados no software GraphPad Prism for Windows versão 5.0.

## 5.9 Aspectos éticos

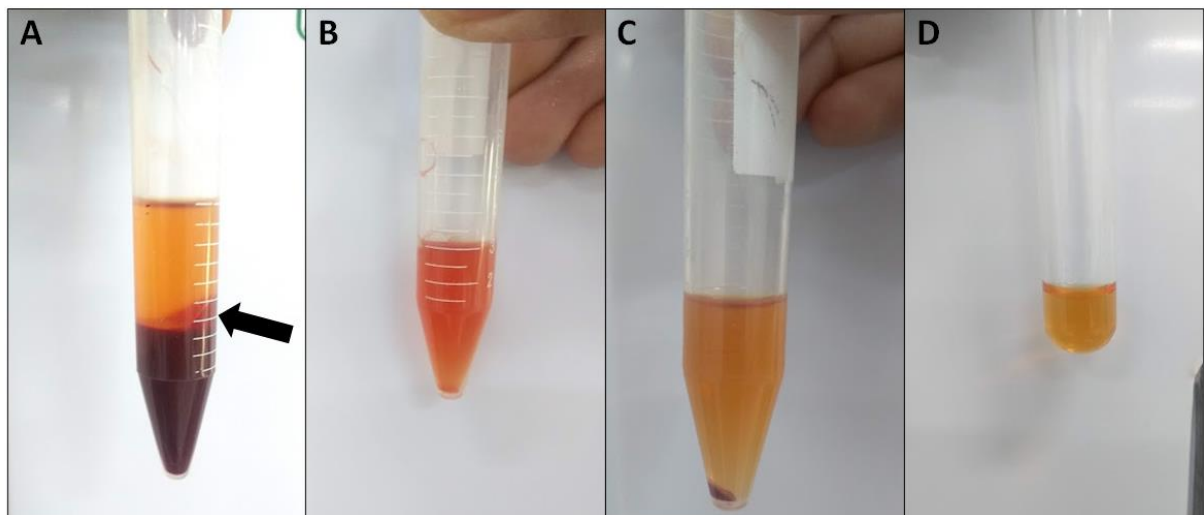
O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências e Letras de Assis (FCL) – UNESP – Campus de Assis (Assis, São Paulo, Brasil), e protocolado com registro na Plataforma Brasil (CAAE 39644820.9.0000.5401). A pesquisa foi conduzida de acordo com os parâmetros legais, definidos na resolução nº 466, de 12 de Dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Avaliação dos componentes do sangue total e PRP

A partir do sangue homogeneizado em tubos de anticoagulante citrato, obteve-se o isolado de PRP de forma eficaz, com porções visualmente bem definidas. A centrifugação dupla do sangue total, a separação das frações de plasma e células sanguíneas após a primeira centrifugação (400 g, 10 min), e a obtenção do PRP final após a segunda centrifugação a 800 g durante 10 minutos, estão representadas sequencialmente na Figura 18:

**FIGURA 18.** Etapas de obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) a partir de dupla centrifugação do sangue total. Separação do plasma e fração de eritrócitos, com formação de zona de névoa na interface (SETA) (A); Fração plasmática com eritrócitos coletada do sobrenadante após 1ª centrifugação (B); Purificação do plasma com sedimentação de eritrócitos residuais após 2ª centrifugação (C); Obtenção do PRP isolado, equivalente ao terço inferior coletado após 2ª centrifugação (D)



O PRP oriundo do terço inferior da segunda centrifugação apresentou fator de concentração plaquetária ( $F_{CP}$ ) de 339,4% (ou 3,394), levando-se em consideração a relação entre a concentração plaquetária basal e a concentração de plaquetas no PRP (Tabela 1). A eficiência na recuperação do plasma ( $E_{(pl)PS}$ ) foi de 40,32%, ao passo que a eficiência de recuperação das plaquetas ( $E_{(pt)PRP}$ ) foi de 27,37%. Paralelamente, a concentração leucocitária verificada no sangue total foi de

$4,73 \times 10^7$  leucócitos/mL, enquanto não houve detecção no plasma centrifugado em duas etapas.

**TABELA 1.** Parâmetros hematológicos plaquetários avaliados no isolamento do PRP

Parâmetro (Unidade)	H	NPTST ( $10^8$ /mL)	NPTPRP ( $10^8$ /mL)	VST (mL)	VPLPS (mL)	VPLST (mL)	VPLPRP (mL)
<b>Média</b>	0,38±0,3	5,2±2,42	17,65±1,8	4	1	2,48±0,12	0,2

**H** = Hematócrito; **N<sub>PTST</sub>** = Concentração Plaquetária no sangue total; **N<sub>PTPRP</sub>** = Concentração Plaquetária no PRP; **V<sub>ST</sub>** = Volume de Sangue Total; **V<sub>PLPS</sub>** = Volume de Plasma no Sobrenadante; **V<sub>PLST</sub>** = Volume de Plasma no Sangue Total; **V<sub>PLPRP</sub>** = Volume de PRP após a 2ª centrifugação

A partir do protocolo adotado, constatou-se que as plaquetas permaneceram íntegras durante as duas etapas de centrifugação. A quantificação de leucócitos e plaquetas no sangue total e na amostra do concentrado de plaquetas após a segunda centrifugação (PRP) foi realizada de forma direta.

Por meio da análise direta por contagem manual, verificou-se um aspecto refratário das plaquetas quando identificadas em microscópio a partir da metodologia de Rees-Ecker. Paralelamente, a coloração azulada dos núcleos segmentados de neutrófilos, linfócitos e basófilos obtidos pelo processo de contagem de leucócitos com líquido de Türk, resultado da afinidade do azul de metileno presente na composição do corante, permitiu a evidenciação e a identificação múltipla em sangue total, e bastante reduzida ou quase nula na amostra de plasma concentrado após a segunda centrifugação.

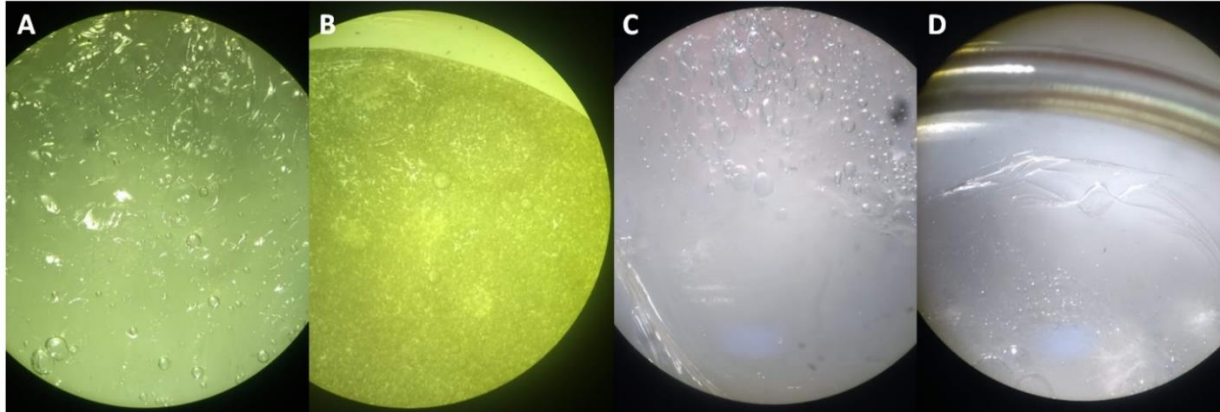
## 6.2 Caracterização do hidrogel

### 6.2.1 Propriedades morfológicas e organolépticas

O material impresso e padronizado apresentou um aspecto visual aerado, homogêneo e com textura contínua. O disco impresso apresentou aspecto liquefeito a 50°C, mantendo-se num escoamento suave e consolidando sua viscosidade em temperatura na faixa de 34-37°C, após resfriamento e reticulação com cloreto de cálcio a 2%.

Ao adicionar  $\text{CaCl}_2$  ao hidrogel após resfriamento, durante o teste de esterilidade, observou-se uma retração do tamanho do disco, que teve início instantâneo a partir de sua adição (Figura 19).

**FIGURA 19.** Morfologia macroscópica de hidrogéis Alg-gel secos após 36 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 horas (D). Acervo próprio.



As configurações dos discos-molde de duas camadas foram desconsideradas em razão da quebra da rede de hidrogel com mínima manipulação. As amostras de quatro camadas apresentaram propriedade viscoelástica estável e resistente, com boa plasticidade e maleabilidade e, fundamentalmente, preservando de um leito úmido e fisicamente absorvente.

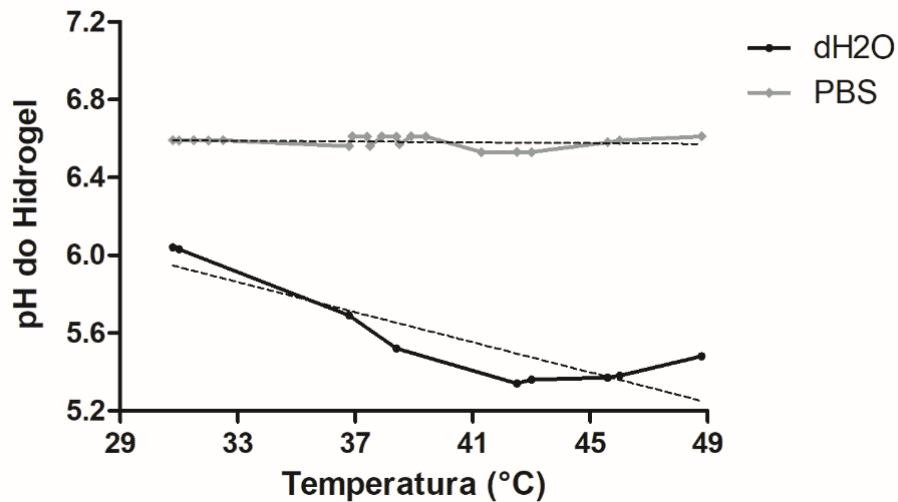
### 6.2.2 Propriedades químicas do hidrogel

Quimicamente, o material apresentou um pH levemente ácido em solução salina tamponada (PBS) pH 7,2. Para efeito comparativo, foi avaliada a acidez de hidrogéis Alg-Gel preparados com água deionizada (pH 5,7).

Para hidrogéis de padrão experimental preparados com PBS (pH 7,2), o pH médio obtido foi de  $6,584 \pm 0,028$ , enquanto as amostras comparativas com água destilada e deionizada ( $\text{dH}_2\text{O}$ ), de pH 5,7, apresentaram média geral de  $5,579 \pm 0,281$ . Ambas as médias estão próximas à acidez da faixa de pH verificada para a pele (entre 5,5 e 6,5), com valor ligeiramente superior para as amostras em PBS, considerando o desvio padrão. Os valores de pH monitorados foram medidos entre o ponto inicial  $30,8^\circ\text{C}$ , onde o hidrogel apresentou um aspecto mais espesso, e  $48,8^\circ\text{C}$ , estado em que a blenda polimérica foi recém-preparada.

As amostras de hidrogel demonstraram grande estabilidade química, verificada a diferença não significativa na variação de pH com o aumento de temperatura ( $p > 0,05$ ) e a alta linearidade da curva perfil para o hidrogel preparado com PBS (coeficiente angular =  $-0,001$ ), de acordo com o gráfico, evidenciando a eficácia da capacidade tampão do diluente.

**FIGURA 20.** Perfil comparativo dos valores de pH dos hidrogéis preparados com água deionizada pH 5,7 (n=3) e tampão fosfato (PBS) pH 7,2 (n=3)



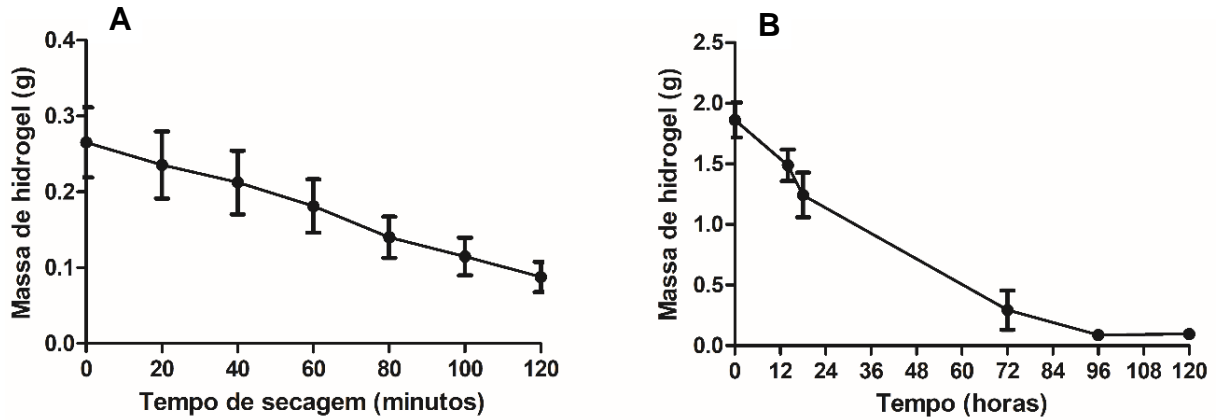
### 6.2.3 Parâmetros físicos de umidade

- **Perfil de degradação dos hidrogéis**

Após 24 horas de secagem, ponto de referência em trabalhos com hidrogéis na literatura, houve remoção de água equivalente a 29,96% de massa dos hidrogéis, em média. Decorrido todo o período de análise dos hidrogéis multicamada (120 horas), a perda máxima de massa entre as amostras Alg-Gel foi de 92,75% em relação ao material recém reticulado.

Neste caso, deve-se ressaltar a relevância do processo de lavagem descrito, que cumpre a função de manter as condições de acidez no leito da ferida, bem como a capacidade de incorporação de umidade.

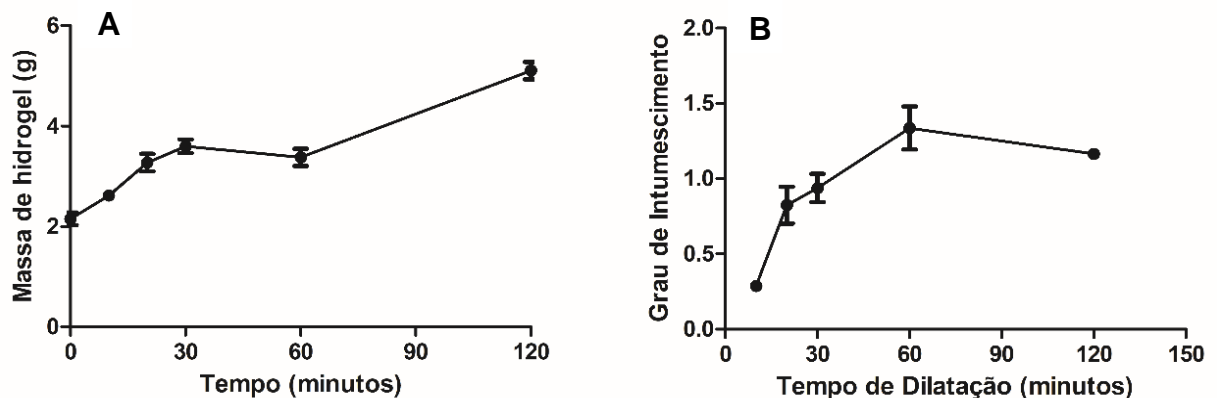
**FIGURA 21.** Degradação dos hidrogéis de alginato-gelatina em função da perda de massa para filmes secos durante 120 minutos (n=3) (A) e hidrogéis de quatro camadas impressos desidratados ao longo de 120 horas (n=3) (B).



- **Conteúdo de água e dilatação dos hidrogéis**

A hidratação dos discos de hidrogéis após reticulação realizada em imersão em PBS resultou em uma dilatação volumétrica pronunciada e uma relação de aumento de massa amostral em até 2,6 vezes (aumento de 260,5%) comparando-se o filme fresco, demonstrando uma grande capacidade de retenção de água (Figura 22).

**FIGURA 22.** Perfil de dilatação temporal de hidrogéis Alg-Gel padrão, com a variação de massa amostral (n=3) (A) e dilatação temporal (n=3) (B)

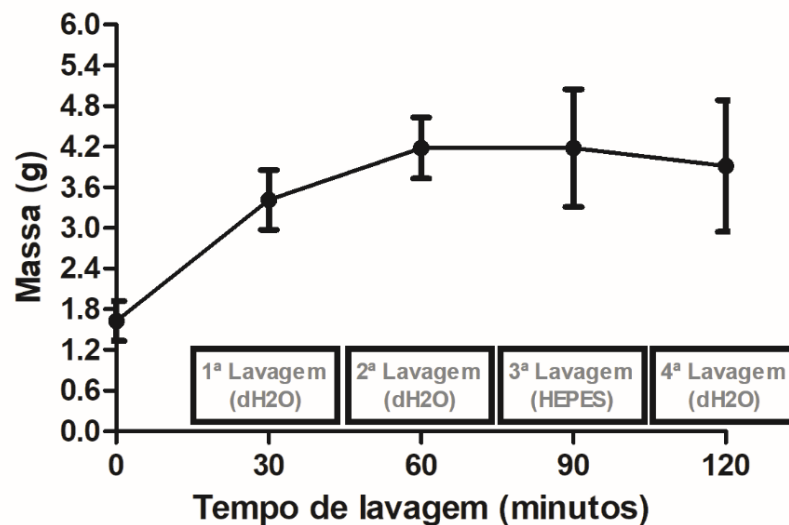


O grau de intumescimento (GI) das amostras foi crescente de forma significativa até a primeira hora de imersão em PBS. A avaliação deste parâmetro demonstrou que as amostras contendo alginato 4% + gelatina 4% em solução, podem absorver até 401,98% de sua massa.

A análise do processamento dos hidrogéis por lavagem demonstrou um ponto de dilatação máxima de 2,58 vezes (258,3%), decorrida a primeira hora de hidratação (Figura 23), em relação a massa do material seco após 24 horas.

A variação da massa ao final das quatro etapas de lavagem (120 minutos) foi, portanto, significativa ( $p < 0,05$ ).

**FIGURA 23.** Perfil de hidratação das amostras submetidas a lavagem em quatro etapas



### 6.3 Caracterização reológica do hidrogel

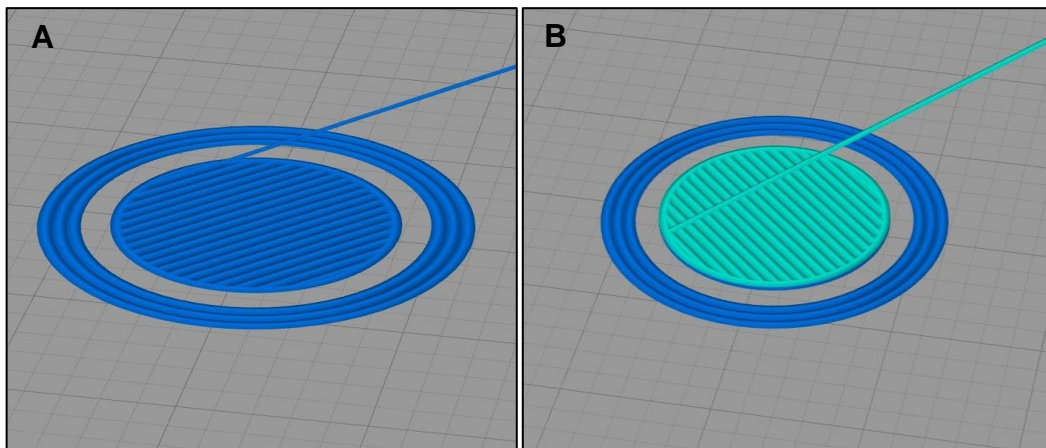
A densidade absoluta do hidrogel a 25°C, aferida em picnômetro em triplicatas ( $n=3$ ), apresentou um valor médio de  $1076,4 \pm 47,5 \text{ kg/m}^3$  (ou  $1,076 \pm 0,0475 \text{ g/cm}^3$ ). Embora o resfriamento do material e a homogeneização tenham proporcionado a redução de bolhas do hidrogel, característica não desejável em aferições realizadas neste sistema de densitometria, a aeração foi observada de forma aparente.

A determinação da viscosidade do hidrogel líquido utilizando-se o orifício nº5, aplicado a fluidos com viscosidade superior a 310 cSt, forneceu um tempo médio de escoamento de  $28,28 \pm 6,72$  segundos até o corte, ou início do gotejamento do material. Desta forma, a viscosidade cinemática aparente média foi calculada em  $317,95 \pm 81,26 \text{ cSt}$ .

#### 6.4 Printabilidade do material padronizado

A partir dos testes de impressão realizados, obteve-se a configuração 4C C35 P100 (Figura 24) como a formatação ideal do modelo teste para verificação do potencial de impressão do biogel como potencial biocurativo personalizado. A configuração com 100% de preenchimento (C100) demonstrou alta fragilidade interna do material, rompido facilmente com a manipulação.

**FIGURA 24.** Projeção do modelo-base digital do hidrogel de quatro camadas utilizado para avaliação de parâmetros físico-químicos e mecânicos a partir do software de fatiamento Simplify3D, simulando extrusão da primeira camada do disco impresso (A), e preenchimento completo da 2ª camada, com a 3ª camada em início de deposição (B). Acervo próprio.

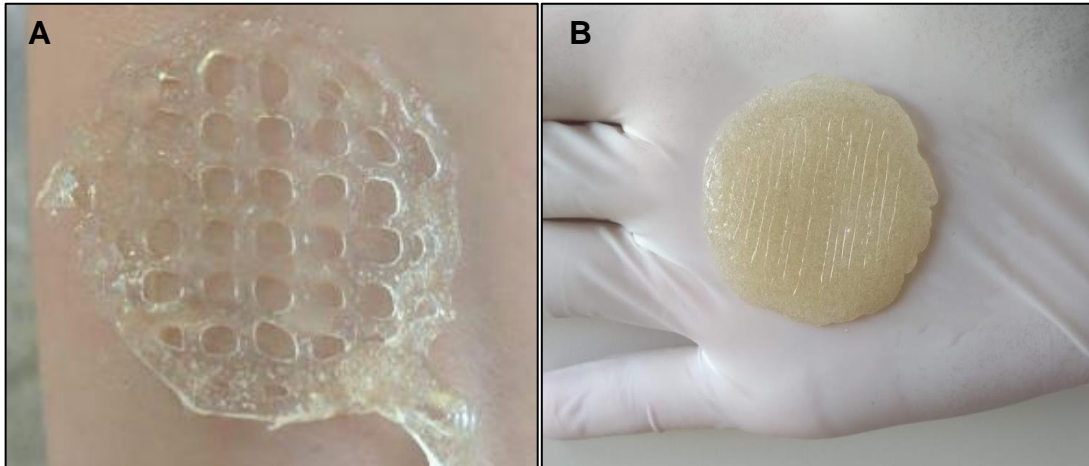


A temperatura ideal de trabalho, após o resfriamento e reticulação do hidrogel, foi estabelecida em 35°C, ponto em que a viscosidade do hidrogel foi suficientemente consistente, de modo que o material, ao ser acondicionado em seringa do sistema de impressão, não apresentasse vazamento do bico extrusor ou pressão insuficiente para extrudar o hidrogel para a superfície de impressão como resultado do aumento de viscosidade.

Os discos de hidrogel na configuração 4C C35 P100 apresentaram excelente processabilidade e estabilidade de forma em temperatura ambiente, com fácil remoção sem provocar desintegração de forma. Apesar da interferência observada no fluxo de material ao longo da padronização dos discos de hidrogel, a presença de bolhas decorrentes da mistura e composição da blenda polimérica não constituiu um fator limitante da resistência dos filmes impressos (Figura 25).



**FIGURA 25.** Disco Alg-Gel base utilizado para análises na configuração 4 camadas, 35% de densidade de preenchimento (A). Disco impresso pós-reticulado na configuração 4 camadas 100% densidade de preenchimento (B). Acervo próprio.



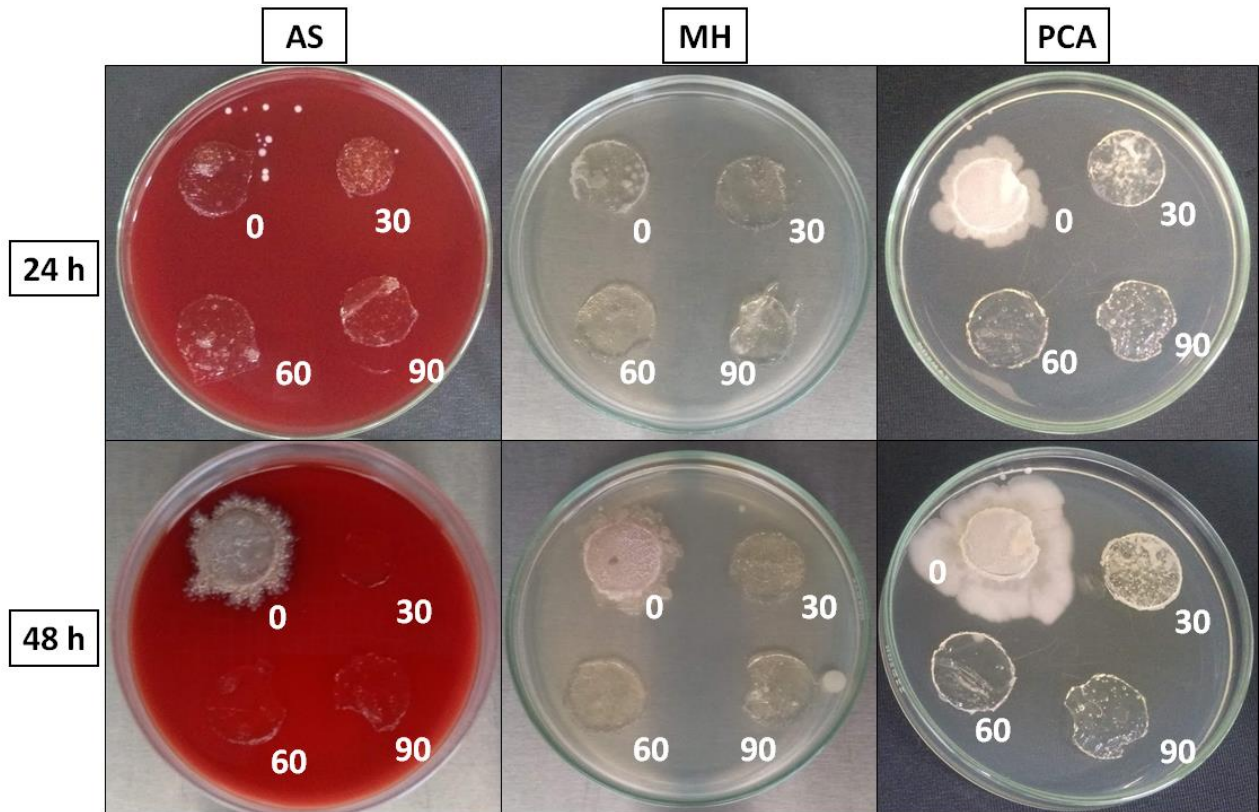
### 6.5 Avaliação de integridade biológica dos filmes poliméricos

Os hidrogéis que não foram submetidos a irradiação UV (T0), para ambas as dimensões, apresentaram contaminação visível e pronunciada após incubação em estufa. Desta forma, a incubação de discos com retenção maior de umidade em temperatura fisiológica promoveu a estimulação do crescimento microbiano.

A inocuidade não foi observada quando as amostras foram acondicionadas em placas fechadas em razão da retenção de umidade interna. Nestes casos, observou-se a contaminação generalizada das amostras, independentemente do tempo de esterilização.

A esterilização das amostras de hidrogel de 1 cm demonstrou regularidade na preservação da inocuidade do material ao longo dos pontos estudados. Proporcionalmente ao tempo de exposição, os discos sofreram maior desidratação (Figura 26).

**FIGURA 26.** Efeito da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em quatro intervalos de tempo (0, 30, 60 e 90 minutos) após incubação de hidrogéis ( $\varnothing = 1$  cm) durante 48 horas para três meios de cultivo distintos. Acervo próprio.

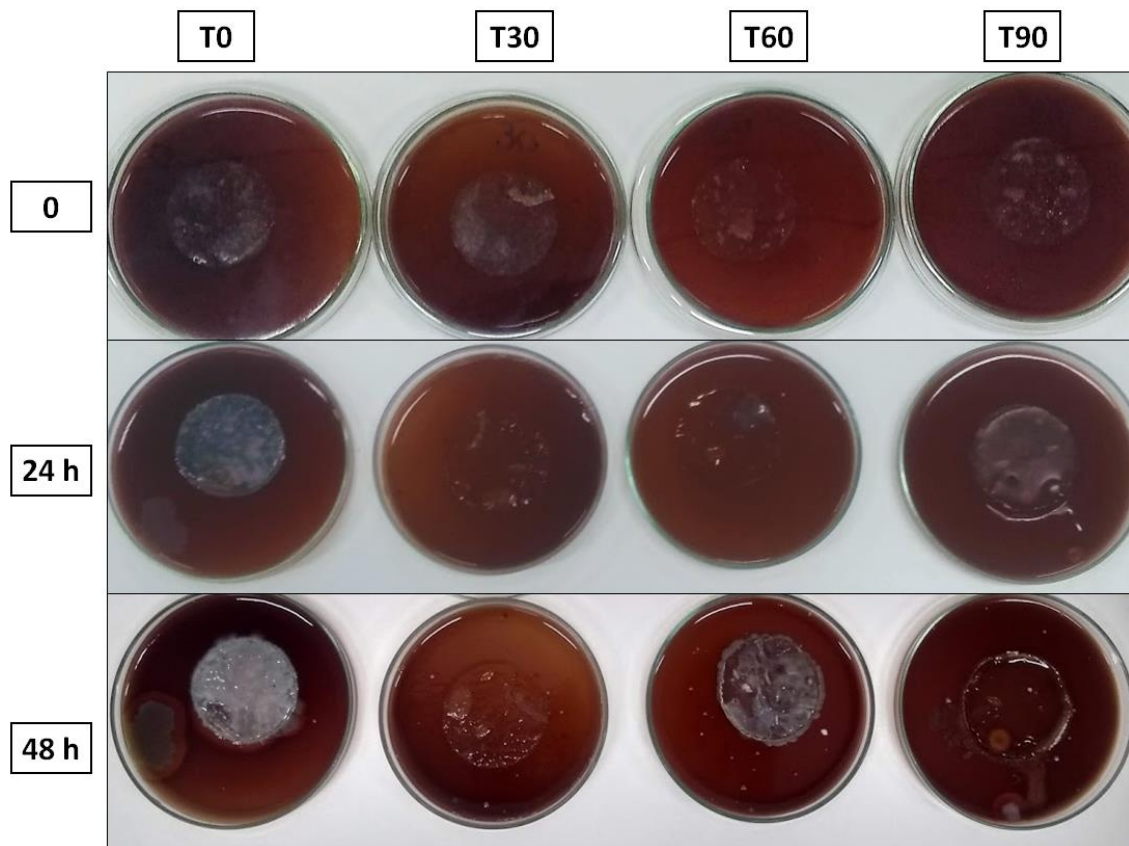


**AS** - Ágar Sangue; **MH** - Müller-Hinton; **PCA** – Ágar Plate Count

Em discos de 4 cm de diâmetro submetidos à UV durante 30 minutos (amostras T30), observou-se maior eficácia do processo de esterilização em UV, com menor contaminação observada, mantendo-se o material levemente úmido. As amostras submetidas a 60 minutos de esterilização (T60) apresentaram contaminação pronunciada após 48 horas (Figura 27). As amostras que permaneceram durante 90 minutos sob luz UV apresentaram focos de contaminação distribuídos na amostra após decorrido o tempo de experimento.

Em períodos de menor exposição a estufa (24 h), os filmes de 4 cm apresentaram contaminação apenas verificada em T0. A incubação das amostras durante 48 horas a 35°C promoveu derretimento parcial de porções superiores do hidrogel, razão de contaminação das amostras.

**FIGURA 27.** Efeito da esterilização por luz ultravioleta em fluxo laminar em quatro intervalos de tempo após incubação de hidrogéis ( $\varnothing=4$  cm) durante 48 horas em Ágar Sangue (AS). Acervo próprio.



**T0** - Hidrogéis sem esterilização, **T30** - Hidrogéis esterilizados durante 30 minutos; **T60** - Hidrogéis submetidos a 60 minutos de esterilização; **T90** - Hidrogéis submetidos a 90 minutos de esterilização

## 6.6 Sistema de escaneamento por reconstrução de imagens

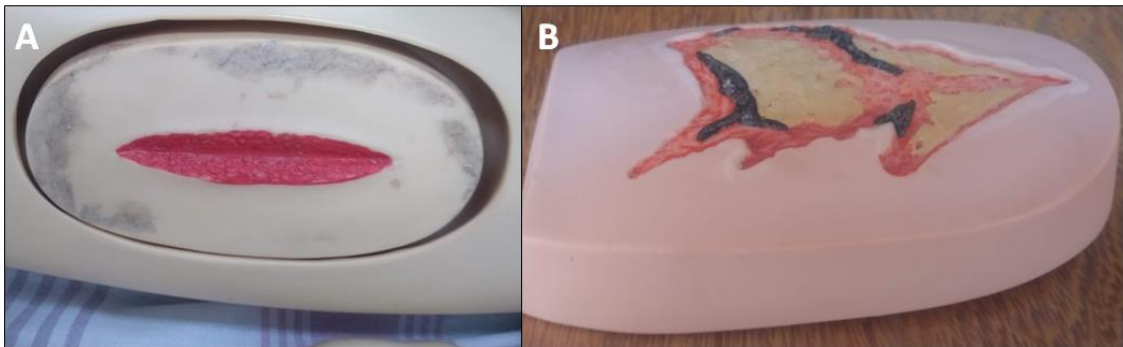
### 6.6.1 Reconstrução virtual das feridas

O molde proveniente da seção lateral da coxa de bonecos de enfermagem utilizado na reprodução da ferida profunda apresentou dimensões de 140 mm x 77 cm x 36 mm (comprimento x largura x altura) (Figura 28A), enquanto a seção correspondente à ferida superficial foi aferida em 148 mm x 78 mm x 30 mm (Figura 28B).

As feridas virtuais consideradas no sistema de bioimpressão de curativos personalizados apresentaram dimensões de 85 mm x 15 mm x 3,5 mm (comprimento x largura máxima x altura) para a reprodução de ferida profunda

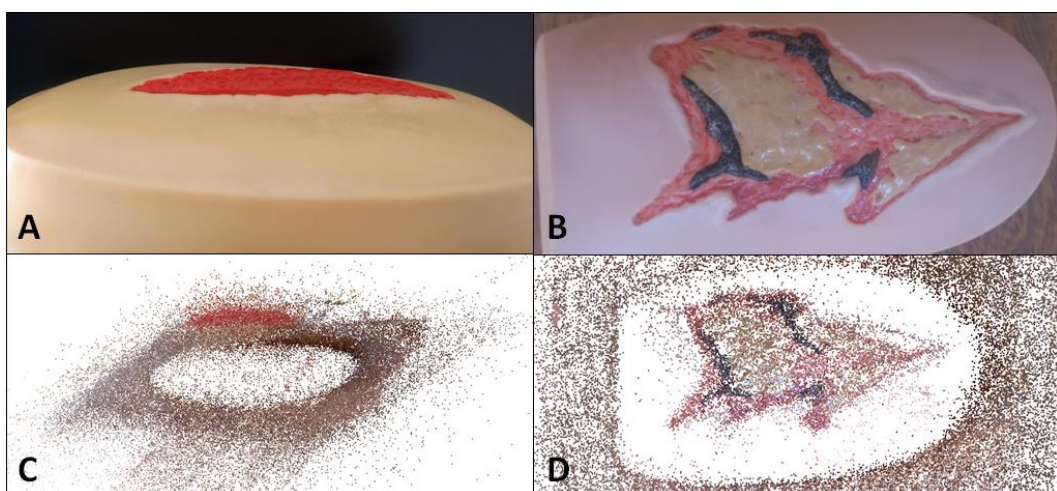
oriunda de laceração/mutilação, e 100 mm x 65 mm x 1,0 mm, levando-se em conta as extremidades das bordas da lesão, para as escaras da porção anterior da coxa.

**FIGURA 28** – Modelos de feridas virtuais da coxa de manequins de simulação de lesões. **(A)** Região lateral da coxa com laceração profunda; **(B)** Seção anterior da coxa com úlcera de pressão. Acervo próprio.



Para a obtenção das reproduções virtuais dos modelos com acurácia e boa reprodutibilidade de detalhes e texturas, foram necessárias 82 imagens do modelo representativo de uma ferida profunda, e 88 imagens do modelo de ferida superficial. A reconstrução por fotogrametria permitiu a geração de nuvens densas de pontos oriundas da correlação entre as imagens (Figura 29) em elevada qualidade após cerca de 2 minutos de processamento, em computador desktop com processador AMD fx-8300, 8 Gb de memória RAM e placa de vídeo AMD HD 7960 4 Gb.

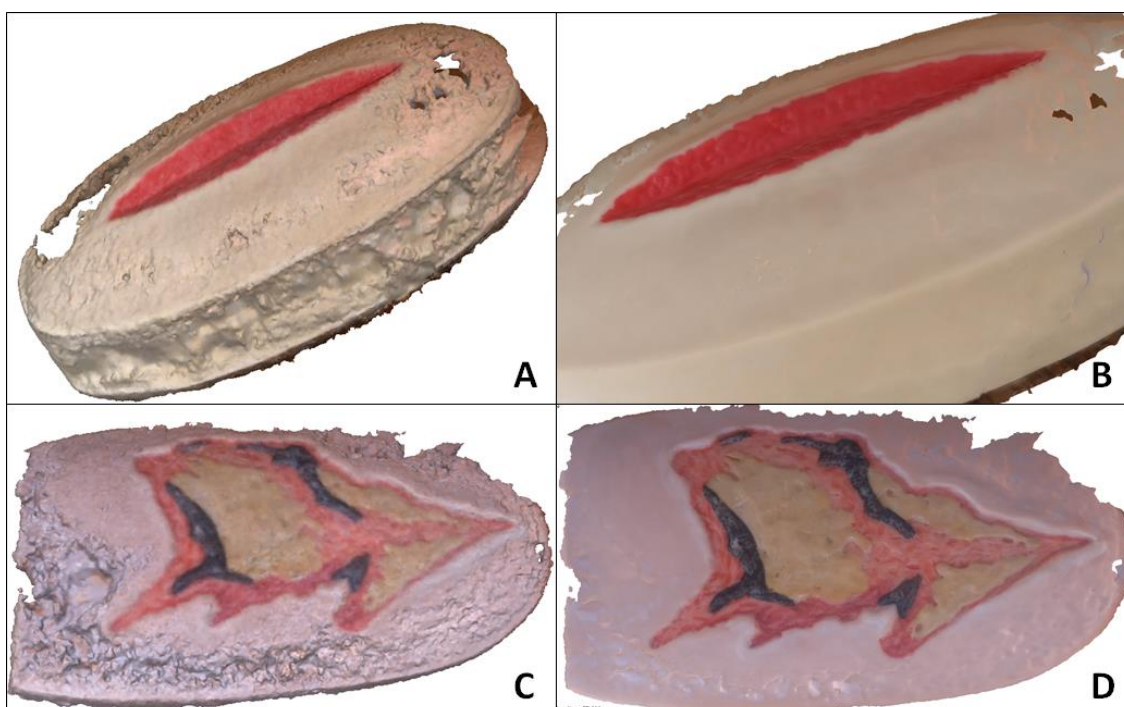
**FIGURA 29** – Modelos de ferida profunda e superficial **(A e B)** e construção de dispersão de pontos de similaridade **(C e D)** em software de fotogrametria. Acervo próprio.



A detecção das intersecções com o modelo real permitiu a reprodução volumétrica e superficial em alta fidelidade (Figuras 30A e 30B), evidenciadas pela modelagem das texturas parametrizadas em software (Figuras 30C e 30D).

A construção das simulações em malha triangular STL possibilitou a geração de formas tridimensionais complexas, ainda que apresentassem falhas pontuais decorrentes de limitações no algoritmo de alinhamento das fotografias e capacidade de processamento de máquina. A região contendo a ferida profunda foi reproduzida em 200.036 faces e 100.240 vértices, ao passo que o modelo contendo a ferida superficial, mais irregular e detalhada com diferentes topologias, foi obtido em 477.070 faces e 239.378 vértices. Em qualidade média de modelagem, as construções foram obtidas em cerca de 2 horas de processamento, enquanto as texturas em alta qualidade foram reproduzidas em até 6 horas após a correlação.

**FIGURA 30** – Geração de modelos por fotogrametria e parametrização de texturas em ferida profunda (A e C) e superficial (B e D). Acervo próprio.



### 6.6.2 Construção virtual do biocurativo

As feridas reconstruídas e isoladas do modelo virtual por recorte em fotogrametria, exportadas como malhas triangulares para o 3D Builder foram

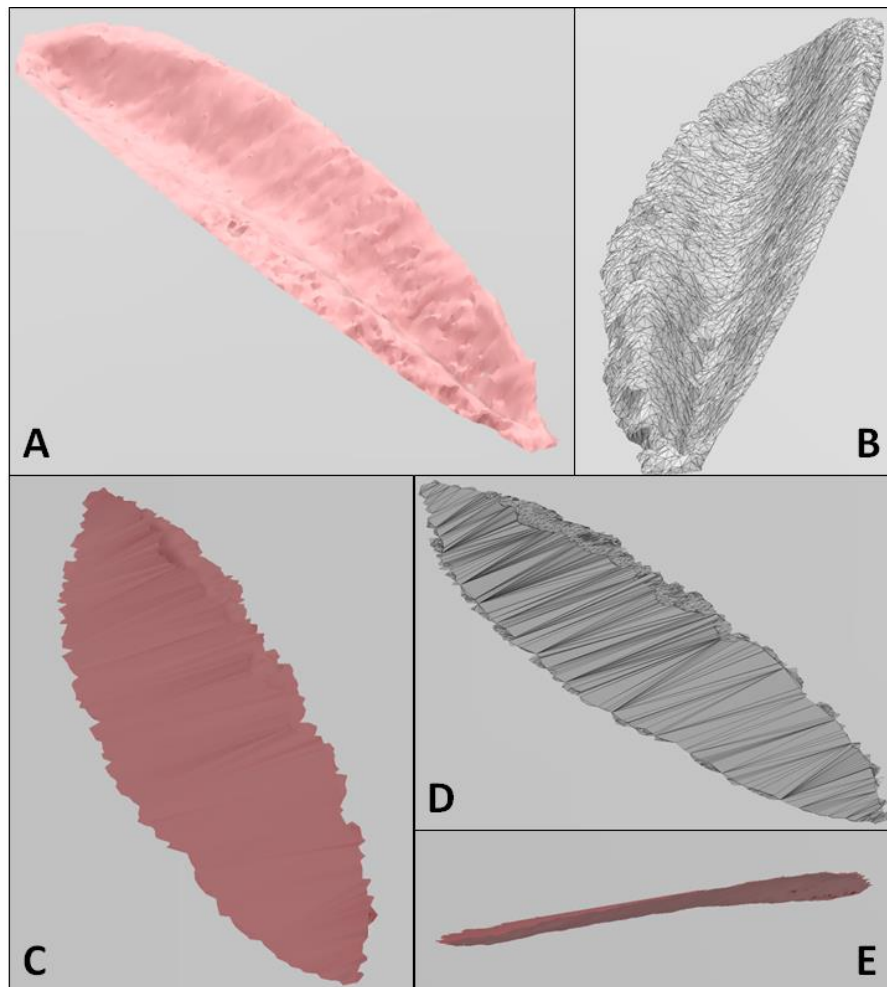
preenchidas anatomicamente com ajuste de geometrias tridimensionais em formato de elipse, configuração que melhor se ajustou à cobertura do modelo real.

Cabe destacar que o dimensionamento da cobertura no 3D Builder (comprimento x largura x altura) necessitou ser realizada em função da escala utilizada pelo software de fotogrametria. Assim, ao ser importado, o modelo de ferida virtual reconstruída foi redimensionado para receber o preenchimento, sem alterar a texturização de sua superfície.

Desta forma, obteve-se o nivelamento completo do volume e da superfície testados, adaptando a projeção virtual às irregularidades do “tecido” original para ambas as aplicações e garantindo as conformações anatômicas que puderam ser escalonadas para a bioimpressão (Figura 31).

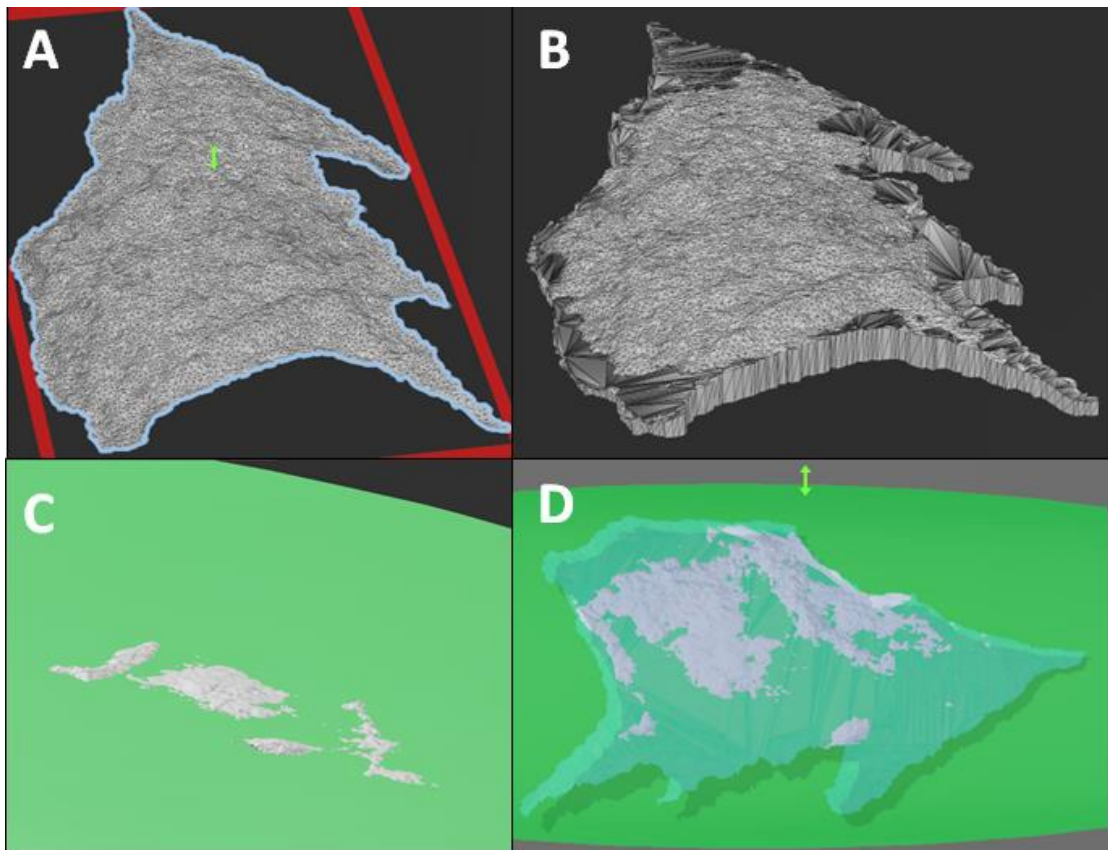
**FIGURA 31** – Construção do modelo virtual de biocurativo para simulação de laceração profunda.

Ferida reconstruída em texturas (**A**) e em malha triangular (**B**); Vista superior do preenchimento anatômico com cobertura ajustada virtualmente (**C**) e em formato STL (**D**); Vista lateral do biocurativo (**E**). Acervo próprio.



Tendo em vista a espessura e a formatação da ferida de úlcera de pressão, o modelo virtual do curativo foi concebido realizando a criação de suportes imaginários no software 3D Builder, por meio do recurso “extrudar para baixo” de modo que a cobertura pudesse ser reproduzida levando em consideração a topologia do tecido debridado e as porções de epitélio remanescente, tornando-a mais representativa possível (Figura 32B).

**FIGURA 32** – Construção do modelo virtual de biocurativo para simulação de escara superficial. Ferida reconstruída em texturas (A) e representada em malha triangular com suporte (B); Vista superior do preenchimento anatômico com cobertura ajustada virtualmente (C) e projeção do preenchimento sobre a ferida (D). Acervo próprio.



O processamento do modelo digital do biocurativo, realizado no fatiador PrusaSlicer, possibilitou o ajuste ideal dos parâmetros de impressão para ambos os modelos, permitindo a observação das camadas de impressão, estimativa do volume de filamento de material polimérico a ser utilizado e tempo de impressão, ajuste de velocidade e pressão de extrusão, configuração da altura e densidade de preenchimento das camadas de base e topo do preenchimento (Tabela 2).

**TABELA 2** – Parâmetros ideais de printabilidade para extrusão dos biocurativos Alg-Gel + PRP

VARIÁVEL	FERIDA PROFUNDA	FERIDA SUPERFICIAL
<b>Configurações de Impressão</b>		
Altura de camada (mm)	0,35	0,25
Altura da primeira camada (mm)	0,3	0,5
Número de camadas totais	11	3
Parede vertical (camadas)	1	0
Parede horizontal (camadas)	2 sólidas (topo)	1 sólida (topo)
	2 sólidas (base)	
	60 (perímetro)	
Velocidade impressão (mm/s)	80 (preenchimento)	80 (preenchimento)
	20 (preench. sólido)	20 (preench. sólido)
	15 (preench. topo)	15 (preench. topo)
	60 (suporte)	30 (1ª camada)
	30 (1ª camada)	
<b>Configurações de filamento</b>		
Diâmetro do bico (mm)	3	0,5
Multiplicador de extrusão	1	1
<b>Configurações da impressora</b>		
Altura máxima impressão (mm)	250	250
Diâmetro bico extrusora (mm)	1	1
Limite altura camada (mm)	0,08 (mínima)	0,08 (mínima)
	1 (máxima)	1 (máxima)

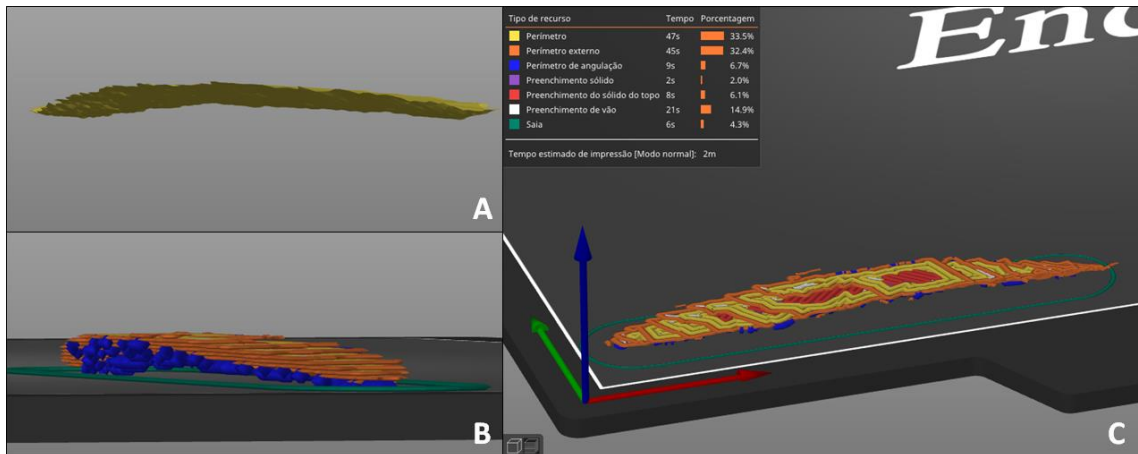
A partir dos volumes de preenchimento definidos pelo fatiamento e segmentação dos modelos de ferida profunda e superficial (Figuras 33 e 34), foi possível definir a proporção de PRP incorporado como aditivo, seguindo a razão 1 mL de PRP para cada 5 cm<sup>3</sup> de tecido lesionado.

Levando-se em consideração uma simulação de tratamento personalizado de um paciente com a concentração média de  $17,65 \times 10^8$  plaquetas/mL de PRP, determinada no item 6.1, o volume de preenchimento da laceração profunda da coxa, com 478,54 mm<sup>3</sup> ou 0,478 cm<sup>3</sup> necessitaria da adição de, aproximadamente, 96 µL de PRP autólogo ou  $1,689 \times 10^8$  plaquetas distribuídas no *scaffold* do biocurativo. Paralelamente, para a úlcera de pressão, com volume de 253,31 mm<sup>3</sup> ou 0,253 cm<sup>3</sup>, seria necessário, aproximadamente, 51 µL de PRP autólogo,

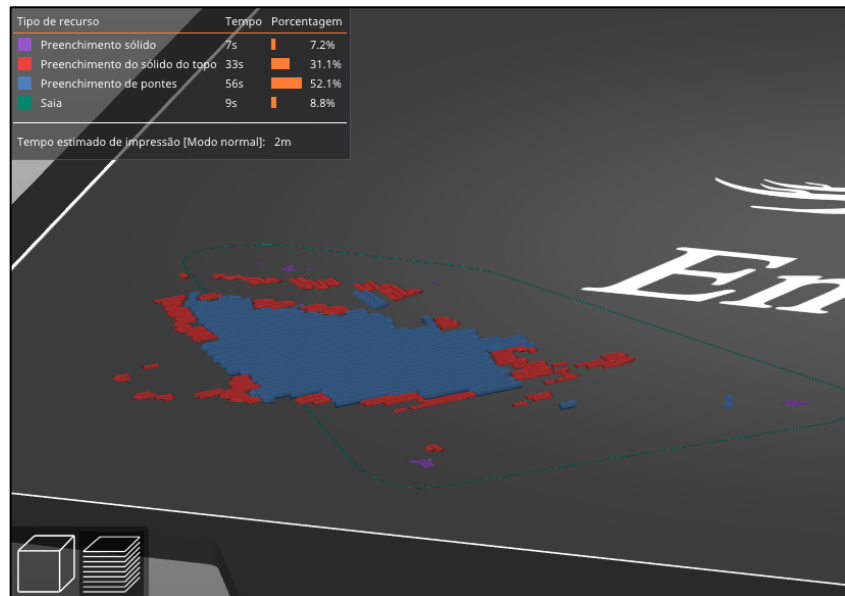


equivalente a  $8,942 \times 10^7$  plaquetas incorporadas na formulação do filme de hidrogel para impressão.

**FIGURA 33** – Fatiamento do biocurativo de ferida profunda no PrusaSlicer. Vista lateral do modelo (A), fatiado na mesa de impressão (B) e distribuição do tempo de impressão (C). Acervo Próprio.



**FIGURA 34** – Formatação do fatiamento do biocurativo para ferida superficial no PrusaSlicer. Acervo Próprio.



### 6.6.3 Bioimpressão do biocurativo anatômico

A prova de configuração dos parâmetros da bioimpressora, realizada com creme facial comercial como padrão reológico demonstrou uma alta correspondência

e assertividade do modelo virtual, preenchendo a ferida em sua quase totalidade (Figura 35). O comportamento reológico do hidrogel permitiu espalhamento por regiões do leito da ferida, cobrindo os pontos onde o creme impresso, substancialmente mais consistente, ficou ausente.

**FIGURA 35** – Adequação do modelo virtual de impressão de ferida profunda com creme comercial



A velocidade de impressão personalizada de acordo com a camada e nível de detalhamento, o mecanismo de atuação do conjunto extrusor e o diâmetro do bico de extrusão permitiram uma pressão exercida de forma contínua sobre o êmbolo, possibilitando uma distribuição contínua e homogênea do material liquefeito, sem falhas aparentes ou interrupções em função da formação de vácuo no interior da seringa.

Os tempos de preenchimento das feridas virtuais foram, respectivamente, de 1 minuto e 51 segundos para a ferida profunda, e 1 minuto e 36 segundos para a ferida superficial. Tendo em vista a continuidade e uniformidade de extrusão do filamento de hidrogel, o bico de impressão ficou posicionado a cerca de 0,5 mm do ponto de contato com o modelo de ferida para início de extrusão, estabelecido de acordo com o posicionamento das coordenadas absolutas de origem, na linguagem G-Code (G92 X0 Y0 Z0 E0), necessária para reconhecimento da superfície de impressão pelo software de comando Pronterface.

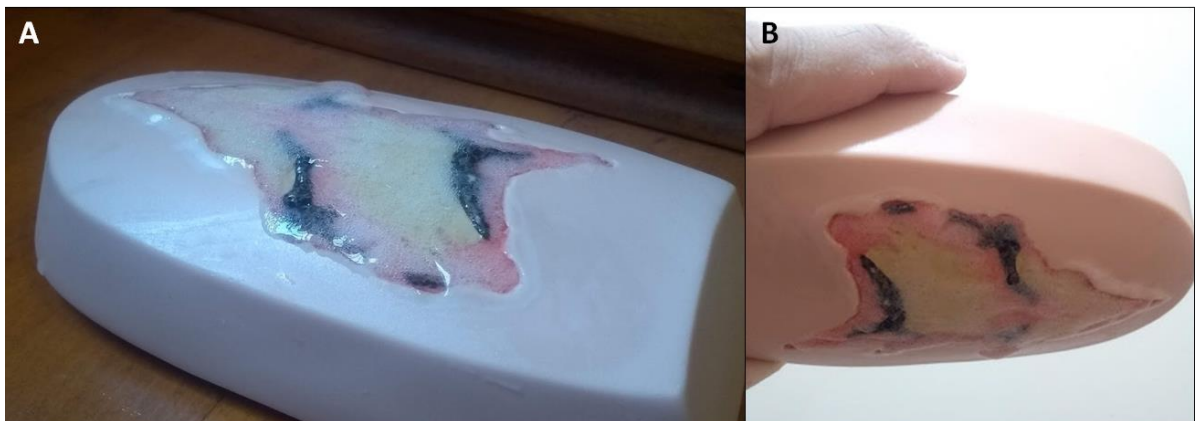
A biotinta impressa demonstrou boa adesividade superficial e estabilidade após reticulação. O espalhamento do agente reticulante sobre o leito da ferida, assim como o jateamento sobre a superfície promoveram maior liga ao material e contribuíram para uma gelificação mais rápida, consolidando a forma definida após resfriamento (Figuras 36 e 37).

Os biocurativos resultantes apresentaram uma camada de adesão (base) e superfície (topo) bem definidas, formando um filme polimérico elástico em suas porções mais externas, enquanto o interior apresentou aspecto fluídico e gelatinoso.

**FIGURA 36** – Bioimpressão do curativo para laceração. Preparo da superfície com cloreto de cálcio 2% (A); Extrusão do hidrogel sobre o ferimento teórico (B); Reticulação da superfície por aspensão de  $\text{CaCl}_2$  2% (C); Biocurativo anatômico (D)



**FIGURA 37** – Bioimpressão do curativo para escaras. Superfície impressa (A); Adesão do biocurativo após consolidação da reticulação (B)



## 7. DISCUSSÃO

A associação de matrizes poliméricas com o plasma rico em plaquetas como adjuvante tem se mostrado uma alternativa promissora na composição de formulações de biotintas estáveis e adaptáveis à modelagem por impressão 3D por extrusão, e que oferecem risco mínimo de reações imunológicas ou contaminações virais, combinadas a um ambiente altamente concentrado em citocinas (Stessuk, 2016; Sadeghi-Ataabadi et al., 2016; Li et al., 2020; Kumar et al., 2021). Estudos demonstraram a eficácia do emprego de filmes formados por blendas poliméricas e PRP na modulação da fase inflamatória, estímulo da fibroplasia e síntese de colágeno em modelos murinos e porcinos em feridas cutâneas experimentais, resultando na restauração das características dermo-epidérmicas do tecido nativo (Caetano et al., 2015; Albanna et al., 2019; Barbu et al., 2021).

As perspectivas encontradas no cenário atual da padronização de metodologias de produção automatizada em manufatura aditiva estão atreladas aos desafios na definição das proporções relativas de componentes para gelificação e incorporação efetiva do bioaditivo, no caso do PRP, bem como as propriedades estruturais e físico-químicas da biomembrana submetida à impressão 3D para reprodução dos componentes da microarquitetura da matriz extracelular em resolução eficiente para reproduzir a função biológica (Murphy & Atala, 2014; Bierhalz et al., 2017; Morgan et al., 2020; Campos & Blaeser, 2021).

Tendo em vista as considerações, o presente estudo propôs-se a estabelecer as bases metodológicas para construção de um produto autólogo baseado na proposição de um biocurativo polimérico personalizado a partir da padronização e desenvolvimento de um sistema acessível de escaneamento de feridas virtuais a partir de fotogrametria, empregando, como prova de conceito, simulações de lesões profundas e superficiais em indivíduos saudáveis projetadas em membros inferiores de modelos de bonecos anatômicos de enfermagem, com intuito de adequar, testar e verificar a eficiência do processo.

Como biomaterial amplamente utilizado em aplicações de TERM, o PRP tem sido proposto como alternativa em procedimentos clínicos, seja na formatação de gel ou aditivo de arcabouços (*scaffolds*) biodegradáveis que mimetizam a matriz extracelular de tecidos para promover o estímulo regenerativo em feridas traumáticas (Santos, 2017; Stessuk et al., 2020; Kharaziha et al., 2021). Pesquisas

de caráter básico e experimental suscitam a necessidade de padronização de protocolos que visem otimizar a eficácia terapêutica decorrente do uso do PRP, compreendendo as vias de ação dos fatores de crescimento plaquetários e eliminando divergências decorrentes da qualidade e manutenção da integridade plaquetária a partir do material coletado, bem como a ativação efetiva para alcance de resultados uniformes e reproduzíveis (Jo et al., 2013; Marques et al., 2015; Teixeira et al., 2018; Dos Santos et al., 2021; Oneto & Etulain, 2021).

A configuração de centrifugação adotada no presente experimento, com centrifugação crescente (400 e 800 g) forneceu um fator de concentração plaquetária ( $F_{CP} = 3,39$ ) representativo de aproximadamente três vezes superior à concentração no sangue total das amostras, e 4,41 vezes a concentração basal estabelecida nos valores de referência, compatíveis com o índice de enriquecimento plaquetário aos níveis observados na literatura, sugeridos por autores em proporções de 3 a 5 vezes a concentração basal (Franco et al., 2012; Jo et al., 2013; Liao et al., 2019; Stessuk et al., 2020). Tais constatações possuem importância crucial na consolidação e garantia de eficácia da metodologia de isolamento do PRP, dada a inexistência de padronização quanto ao número de etapas e velocidade de centrifugação, pontos de divergência em abordagens terapêuticas do PRP para o tratamento de feridas (Marques et al., 2015).

A ausência de leucócitos detectáveis na fração de PRP oriundo de dupla centrifugação está possivelmente associada à quantidade pequena de amostra obtida. A concentração de plaquetas acompanhada da redução da concentração de leucócitos constitui um indicador da integridade da atividade de coagulação, precursora do processo regenerativo, ao passo que uma elevada concentração leucocitária demarca uma atividade pró-inflamatória e, portanto, indicativa de cicatrização (Arora et al., 2016). Em concentrações basais, os leucócitos atuam na modulação imunológica e citoquímica por meio da liberação de fatores de crescimento, espécies reativas e proteases para neutralização de antígenos, porém ao custo de lesões teciduais decorrentes destas interações (Reed & Clark, 1985; Stessuk et al., 2016).

A leucodepleção verificada no protocolo utilizado mostra-se uma alternativa viável na prevenção e redução do processo cicatricial *in vivo* e, de forma sinérgica, a elevada concentração de plaquetas no PRP contribui para o estímulo de fibroblastos e queratinócitos, fundamentais na recomposição tecidual de feridas, em menor

intervalo de tempo (DeLong et al., 2012; Xian et al., 2015; Stessuk et al., 2016). Desta forma, quando incorporadas ao *scaffold* polimérico Alg-Gel, base do biofilme curativo proposto, as plaquetas são ativadas pelo íon bivalente de cálcio presente no reticulador cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), um dos principais agentes eliciadores da degranulação plaquetária, possibilitando a indução e progressão da cascata de coagulação por efeito dos fatores de crescimento secretados, neoangiogênese e recrutamento de células proliferativas (Mazzocca et al., 2012; Faramarzi et al., 2018; Stessuk et al., 2020).

Biologicamente, as biotintas que empregam PRP podem permitir a utilização e a aplicação de terapias autólogas personalizadas, promovendo, com a secreção de fatores de crescimento, o estímulo regenerativo com resposta imune minimizada. Sob o ponto de vista químico, a produção de blends Alg-Gel representa uma combinação polimérica acessível e versátil que alia a geração de suportes biológicos homogêneos e estáveis como propriedades oferecidas pelo alginato, e fornecimento de sítios de biocompatibilidade para plaquetas, por meio dos peptídeos componentes da gelatina (Sarker et al., 2014; An et al., 2018; Park et al., 2018).

Assim como validado por Faramarzi e colaboradores (2018), a printabilidade de uma biotinta associando alginato a PRP foi verificada com a fabricação de diferentes estruturas adaptáveis, de forma que o composto possa ser empregado em sistemas de bioimpressão 3D baseados em tecnologia FDM. A composição alginato-gelatina na proporção de mistura a 8% m/v, definida metodologicamente, apresentou excelente printabilidade e estabilidade de forma. O comportamento viscoelástico permitiu a aplicação de uma pressão de extrusão que possibilitou a deposição constante do material, resultante da interconexão entre as cadeias poliméricas, que não seriam alcançadas em hidrogéis de componente único.

Conforme verificado em estudos desenvolvidos por Mondal et al. (2019), foram avaliados os parâmetros de printabilidade de hidrogéis de alginato em diferentes faixas de concentração (3,25 – 4%) e gelatina a 4% em solução de blenda polimérica, as formulações que utilizam alginato como componente principal em concentrações menores do que 4% apresentam viscosidades extremamente baixas, comprometendo a definição estrutural na impressão, enquanto elevadas concentrações requerem elevadas pressões de extrusão ao custo da menor viabilidade celular e plaquetária em decorrência da alta taxa de cisalhamento (Nair et al., 2009; Zhao et al., 2015). A adição de gelatina, além da reconhecida

bioadesividade, confere integridade e maior elasticidade ao hidrogel pela potencialidade de reticulação em temperatura de impressão (Pan et al., 2016). Paralelamente, a utilização de elevadas concentrações de gelatina (>10%) reduz a acurácia da impressão em função da agregação de peptídeos, comprometendo a compatibilidade em associação com o alginato (Giuseppe et al., 2018; Wang et al., 2019). O posicionamento do bico de impressão sobre a superfície foi compatível com o comportamento de hidrogéis Alg-Gel estudados por Alruwaili et al. (2019), onde a espessura do filamento de hidrogel extrudado através do bico de impressão aumentou com diminuição da distância relativa à superfície de impressão, resultando em um espalhamento lateral do material.

Durante a padronização da blenda polimérica, com a formação da rede Alg-Gel, o preparo da solução de gelatina realizado com necessidade de resfriamento prévio do solvente (PBS), de modo a evitar a degradação dos peptídeos de adesão, possibilitou a observação do comportamento do soluto como uma solução suspensa sobre o alginato, sendo incorporada pela homogeneização após equilíbrio térmico, em concordância com a caracterização realizada por Nooeaid et al. (2017). No contexto macroscópico visual, a incorporação da gelatina promoveu clarificação da mistura após homogeneização. O aspecto levemente opaco dos hidrogéis foi resultado da interação do PBS com o agente reticulante, corroborando com as propriedades organolépticas verificadas por Li e colaboradores (2018).

A retração dos discos observada na adição do  $\text{CaCl}_2$  pode ser explicada pelo princípio de reticulação das cadeias do alginato, por meio do qual a estrutura química do polímero torna-se mais compacta, conforme relatado por Alruwaili et al. (2019). Paralelamente, a retenção de água também foi observada durante a consolidação do *crosslinking* do hidrogel, verificada sua natureza hidrofílica.

Em concordância dos resultados do presente trabalho com o que foi descrito no trabalho de Koga e colaboradores, envolvendo o estudo de biogéis associados a *Aloe vera*, filmes poliméricos de alginato submetidos ao processo de pós-tratamento com reticulante cloreto de cálcio apresentam menor solubilidade em água e são suficientemente flexíveis para acompanhar estiramentos e dobramentos do tecido epitelial durante movimentos, na aplicabilidade como biocurativos (Pereira et al., 2013). Ademais, o íon presente no reticulante mantém a hemostasia e auxilia na promoção da cascata de coagulação, estimulada pela incorporação do PRP (Rathinamoorthy & Sasikala, 2011; Koga et al., 2018).

No âmbito fisiológico, a capacidade das amostras em absorver água constitui uma variável de relevância para predição do volume de fluido absorvido pelo biocurativo em contato com feridas exsudativas, essencialmente na fase inflamatória, bem como para manutenção da umidade do meio e liberação de fatores e compostos de propriedade bioativa (Barros et al., 2020). Como requisito essencial para a eficácia do processo regenerativo, a determinação da umidade do material visou caracterizar a capacidade de retenção e suporte à liberação de exsudatos da ferida e metabólitos pelas plaquetas, mantendo o leito úmido e íntegro em relação às propriedades bioativas promovidas pela aplicação do biomaterial, fornecendo hidratação e superfície para trocas gasosas, envolvendo o oxigênio e o gás carbônico (Chung et al., 2013; Szekalska et al., 2016).

A avaliação do intumescimento dos discos de hidrogel permitiu inferir que, após a primeira hora de hidratação, a solubilização dos componentes do hidrogel ocasionou a redução da capacidade de dilatação, perfil físico-químico compatível com o observado por Siqueira et al. (2019). O aumento proporcional de 401,98% da massa dos hidrogéis foi compatível com o potencial de absorção do alginato verificado nos estudos de Barros (2020), onde a preparação de membranas oriundas da formulação de blendas de látex-alginato a 15% apresentou um GI de 479,5%. A constatação do menor grau de intumescimento do produto estudado pelo presente trabalho encontra-se vinculada à presença de uma fração de gelatina, altamente hidrofílica e facilmente solubilizada, em igual proporção de alginato. A relação de componentes poliméricos na mistura para formação de hidrogéis está em concordância com a abordagem de Li et al. (2018) para as misturas alginato-gelatina. Amostras constituídas por alginato puro em sua composição apresentam um potencial de retenção de até 900% quando imersas em tampão fosfato salino (Pasparakis & Bouropoulos, 2006), porém carecem de printabilidade e potencial bioadesivo, atribuído pela adição de gelatina, conforme implementada na metodologia deste trabalho.

A dilatação máxima de 258,3% decorrida a primeira hora de hidratação em relação a massa do material seco após 24 horas corrobora as observações acerca da relação tempo-dependente observada por Aroguz et al (2014), onde foi atingido o ponto de máxima dilatação de 250% em hidrogéis alginato-gelatina na proporção 1:1 após 8 horas de hidratação, demonstrando a recomposição da capacidade absorviva do material em função do caráter higroscópico, mesmo após secagem (Saarai et al.,



2013). Apesar da variação significativa de aumento de massa após a lavagem dos discos, a leve redução verificada entre a terceira e quarta etapas de lavagem (90 e 120 minutos) evidenciou a solubilização do polímero na presença do meio de lavagem, saturando seu potencial retenção de umidade e promovendo a desestabilização estrutural do material por quebra da reticulação (Garms et al., 2019).

A construção de um modelo de teste baseado em curativos circulares permitiu, portanto, simular o comportamento do biomaterial frente a exposição ao ambiente, bem como reproduzir as variações nas condições físico-químicas às quais a superfície de uma ferida real encontra-se submetida. A obtenção de biofilmes de natureza levemente ácida em temperatura fisiológica compatível com a condição química do tecido lesionado, conforme verificado na análise dos hidrogéis analisados neste presente trabalho, visam promover a estimulação do fluxo sanguíneo, ao mesmo tempo em que o preparo em solução tampão auxilia na manutenção de variações pequenas no pH do material, prevenindo o leito do ferimento de possíveis contaminações, especialmente as infecções de origem fúngica e bacteriana (Varaprasad et al., 2020).

Como um dos fundamentos na proposição de um biocurativo ideal, a capacidade de proteção de feridas frente à ação bacteriana é primordial na inibição da propagação de microrganismos e redução da inflamação local (Jayakumar et al., 2011). Para que um filme polimérico possibilite a recomposição de uma ferida local em condições fisiológicas adequadas, faz-se necessária a garantia de esterilidade do material, isentando um local lesado de possíveis infecções ou contaminações no momento de aplicação do produto. Dentre os métodos disponíveis para a esterilização de biofilmes de origem polimérica, como óxido de etileno e calor/autoclavagem, foi utilizada a irradiação UV, responsável por promover a fotocura de hidrogéis em aplicações que envolvem a modificação dos polímeros empregados como matriz na preparação de filmes (Marreco et al., 2004).

Em esterilização prolongada, a radiação UV promove quebra de ligações químicas, gerando produtos de degradação que podem estar associados à liquefação que foi verificada nos hidrogéis esterilizados durante 90 minutos de exposição, segundo proposto por Gupta et al. (2013) e Lorson et al (2020). Somada a este fator, uma reticulação ineficiente ou incompleta pode constituir-se um fator de solubilização dos filmes de hidrogel para esta faixa de temperatura (Wang et al.,

2019; Varaprasad et al., 2020). Ademais, em diâmetros superiores de cobertura (4 cm) sobre nutrientes disponibilizados pela placa de cultura ao longo de 48 horas, a superfície de exposição do filme é mais ampla, facilitando o espalhamento de microrganismos no leito do material.

Os resultados apresentados para os três meios de cultura em discos experimentais de hidrogel de 1 cm e discos padrão (4 cm) são compatíveis com as observações de Koga et al. (2018), onde ficou demonstrado o efeito esterilizante do UV durante 24 horas de incubação, com contaminações verificadas apenas nas amostras controle (T0). Desta forma, ao empregar um meio de cultivo enriquecido de amplo espectro para microrganismos fastidiosos e com atividade hemolítica, não-seletivo e diferencial como o ágar sangue, ficaram evidenciadas a sensibilidade dos hidrogéis não esterilizados previamente, e a resistência a contaminantes de origem externa às amostras submetidas a radiação UV.

As avaliações qualitativas e quantitativas dos parâmetros do hidrogel e o sistema de extrusão, viabilizadas pelos estudos no modelo de teste e que caracterizaram a validação da biotinta como material printável, seguindo os critérios propostos por Groll et al. (2019) e Varaprasad et al. (2020), forneceram as diretrizes para que a combinação Alg-Gel + PRP pudesse ser escalonada para uma metodologia primordial de escaneamento baseada na mimetização de um modelo real em arquivos tridimensionais digitais.

O sistema de projeção de um biocurativo polimérico personalizado, fundamentado na construção de modelo a partir da combinação de fotografias de um ferimento teórico em diferentes ângulos, em substituição aos *scanners*, constitui uma alternativa viável, versátil, barata e com amplo espectro de aplicações, dadas as condições de *hardware*, necessitando apenas de aparelho celular ou máquina fotográfica e computador com softwares de fotogrametria.

De acordo com o proposto por Schönberger et al. (2016), os algoritmos de *matching* (ou combinação) de imagens dos softwares de fotogrametria possibilitam a geração de um modelo acurado com uma tiragem mínima de 20 fotografias. Entretanto, a sensibilidade de iluminação, sombra, rugosidade e transparência do alvo podem gerar uma insuficiência de similaridades, distorcendo a projeção final. A relação recomendada de 50 a 80 fotografias retiradas em posições variadas ao redor do objeto de interesse garantiram uma sobreposição adequada, como foi verificado em ambos os exemplos de lesão estudadas.

Como prova de conceito bastante eficaz, ainda que rudimentar, a metodologia de “protoescaneamento” demonstrou excelente adaptabilidade, especialmente em superfícies onde o preenchimento é dificultado. A adequação do sistema para produção dos biocurativos poliméricos em feridas superficiais e profundas em membros inferiores forneceu modelos que apresentam boa correspondência às dimensões do curativo real, especialmente quanto ao volume da forma e, por conseguinte, permite determinar com precisão o volume necessário de PRP a ser utilizado e isolado do sangue do próprio paciente.

A manufacturabilidade da metodologia encontrou no tempo de processamento de máquina para realização de correlações entre as imagens, na definição do número ideal de fotos requerido para reconstrução da heterogeneidade da região lesada e a necessidade de tratamento do modelo para definir a região a ser preenchida e promover a interface material-tecido constituíram os principais desafios na geração de um modelo virtual fidedigno.

Ademais, a projeção de feridas em extremidades com proeminências em formato de parábola ou elipse (cotovelos e joelhos, por exemplo) demanda a modelagem orgânica da superfície curva por planificação, reduzindo a acurácia do método e para o qual haveria a necessidade de utilização de um sistema robótico de dispensação em cinco eixos e uso de algoritmos de reconhecimento para treinamento em superfícies irregulares visando o direcionamento da trajetória dos extrusores, como estudado por Fortunato et al. (2021).

Desta forma, o sistema tridimensional padronizado para as provas de conceito em aplicações tópicas mostrou-se melhor adaptado a feridas profundas em superfícies distais de articulações (braços e pernas, por exemplo). As vantagens dos sistemas portáteis, como a capacidade de modelar cirurgicamente a lesão para obtenção da estrutura desejada, a manuseabilidade cirúrgica que possibilita a deposição de material dentro de fissuras ou sob saliências, e a construção do tecido de substituição a critério do manipulador ficaram evidenciadas na metodologia proposta, a exemplo dos estudos em modelos planares de tecidos in situ, realizados por Hakimi et al. (2018).

Trabalhos anteriores justificaram a bioimpressão como uma ferramenta útil para a fabricação de substitutos biomiméticos de pele para regeneração de feridas. Sistemas de associação de escaneamento e bioimpressão foram relatados por recentes pesquisas em diferentes sítios de incidência de lesões, como a

reconstituição de tecidos moles e matriz óssea da região craniofacial pela aplicação de biomáscaras personalizadas, com índice de reparo de até 80% (Moncal et al, 2021). Lee et al. (2013) demonstraram o uso de um sistema robótico livre de contato com a superfície biológica formado por dispensadores capazes de distribuir queratinócitos e fibroblastos em alta densidade celular e em altas resoluções.

Um sistema de dispensação baseado em múltiplos bicos extrusores para deposição *in situ* e *delivery* de fibroblastos e queratinócitos a partir de uma blenda carreadora composta por colágeno e fibrinogênio em regiões escaneadas por imageamento em aparelho portátil a laser, foi proposto por Albanna et al. (2019).

Trabalhos envolvendo a construção de hidrogéis para propósito terapêutico a partir de modelos virtuais escaneados foram descritos para plataformas de impressão integradas envolvendo fotopolimerização (Li et al., 2021). Ao mesmo tempo, ainda são escassos os trabalhos que envolvem a incorporação de plaquetas aderidas a *scaffolds* biomiméticos bioimpressos por escaneamento obtidos a partir de biopolímeros (Derakhshanfar et al., 2018; Faramarzi et al., 2018; Wei et al., 2019). O presente trabalho apresentou-se como uma alternativa promissora, acessível e inédita na utilização de PRP, fontes de fatores de crescimento, incorporadas em uma matriz polimérica anatômica obtida por extrusão, com acurácia e resolução aliadas ao menor investimento em equipamentos.

A integração com a bioimpressora possibilitou o fornecimento dos parâmetros de material, como o volume requerido para o preenchimento da região a ser regenerada, permitindo a adequação das proporções dos componentes poliméricos (alginate e gelatina) e bioativos (PRP) do biocurativo.

No contexto da crescente evolução do surgimento de soluções que utilizam a impressão 3D como meio e finalidade no desenvolvimento de novas tecnologias voltadas para medicina regenerativa, a proposta de um biocurativo associado a componentes bioativos autólogos modelados em *scanner* sob medida para uso clínico, desenvolvido a curto prazo, representa uma contribuição inovadora no âmbito do tratamento de úlceras cutâneas de difícil cicatrização, como pacientes com úlceras de pé (*diabetic foot ulcers*) e úlceras de pressão em pacientes acamados por longos períodos (*decubitus ulcers*).

O ineditismo desta proposta justifica-se pela portabilidade da metodologia abordada e o menor custo de operacionalização em *hardware*, empregando-se matérias-primas biodegradáveis e componentes bioativos. Como processo de fácil

operação a profissionais de saúde, a projeção de uma membrana polimérica a partir de modelagem de uma ferida virtual, capturada utilizando um sistema portátil de escaneamento baseado em fotogrametria a partir de aparelhos celulares representa uma alternativa de grande acessibilidade a médicos e enfermeiros, à beira do leito do paciente, ainda que estes não disponham de conhecimento técnico em informática ou engenharia.

A funcionalidade poderá permitir a elaboração de curativos de baixo custo e de mínimo risco imunológico tratando-se de uma associação de polímeros inertes e biocompatíveis a um material biológico autólogo, gerando um produto exequível, a curto prazo, de potencial incorporação a clínicas privadas e ao SUS.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível propor que a blenda polimérica Alg-Gel + PRP, como proposta de biocurativo para composição de biotintas utilizadas em aplicações tópicas com feridas de difícil cicatrização, demonstrou-se uma alternativa promissora do ponto de vista químico, biológico e tecnológico.

A natureza hidrofílica com manutenção de umidade, característica fundamental na prevenção de desidratação, aliada à compatibilidade química levemente ácida com o pH observado no leito de uma ferida, garantem a hemóstase e o suprimento de oxigênio para estímulo regenerativo, credenciando esta formulação como um biomaterial ideal para formulação de uma biotinta. Ademais, a menor bacterioscopia observada em hidrogéis irradiados com UV durante 30 minutos ressalta a inocuidade do material aplicado sobre uma superfície, sobretudo em uso tópico do produto aqui proposto.

A printabilidade e a versatilidade da composição com o PRP autólogo possibilitaram a proposição de um método seguro, acessível e personalizado de construção de biocurativos biodegradáveis e adesivos para aplicação tópica, sem provocarem danos teciduais por desbridamento do tecido circundante, como verificado em curativos comumente empregados em sistemas de saúde, como a gaze.

## 8. CONCLUSÃO

A partir das observações e resultados obtidos, conclui-se que a metodologia padronizada e automatizada para impressão de biocurativos de alginato-gelatina e Plasma Rico em Plaquetas na forma de hidrogéis constitui uma proposta reprodutível, biocompatível e potencialmente segura para aplicação terapêutica.

A blenda Alg-Gel na concentração 8% m/v em solução constitui uma biotinta viável como potencial biocurativo à base de um hidrogel polimérico, estável quando reticulada e livre de contaminação quando esterilizada previamente. A biocompatibilidade com os atributos fisiológicos e parâmetros físico-químicos da pele na condição de um ferimento, como o pH e a capacidade de retenção de umidade, a inocuidade do material quando exposto a fotocura por curtos períodos em esterilização em UV aliadas à printabilidade do material em impressora de extrusão, garantem uma geometria estável com uma grande plasticidade na definição e preenchimento de superfícies.

Ademais, o sistema de reprodução da ferida demonstrou-se uma alternativa bastante promissora e acessível ao escaneamento de alto custo, utilizando câmeras de aparelho celular e softwares de fotogrametria que permitiram a detecção de profundidade e área de superfície e adequação de modelos escaneados para impressão de biocurativos sob medida, dadas as condições de aprimoramento da técnica, principalmente quanto às limitações de tempo de processamento dos modelos virtuais e aperfeiçoamento da técnica a tecidos com lesões delimitadas por superfícies de geometria arredondada em regiões articulares de movimento contínuo, como ombros, joelhos e cotovelo.

Como prova de conceito, o processo biotecnológico descrito abre novas perspectivas de aplicação de tratamentos personalizados para cada paciente e tipo de ferida frente a um cenário onde a demanda mundial encontra nas tecnologias de Manufatura Aditiva uma nova fronteira na Medicina Regenerativa e Translacional.

## 9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterização mecânica do material – Perfil de tensão-deformação para avaliar a estabilidade do material, visando aplicação terapêutica em paciente
- Avaliação de porosidade – Verificação da adesão das plaquetas ao suporte de hidrogel, por análise em microscopia eletrônica de varredura (USP/Ribeirão Preto)
- Caracterização de grupos químicos por meio de espectroscopia Raman (UEL/Londrina) – Verificação da eficácia de construção da blenda alginato-gelatina, por meio de detecção de grupos e ligações químicas, bem como presença de metabólitos liberados pelas plaquetas aderidas ao suporte/*scaffold*

## 10. REFERÊNCIAS

ABBASIAN, M. et al. Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering?. **International Journal of Biological macromolecules**, v. 134, p. 673-694, 2019.

ABDULHAMEED, O. et al. Additive manufacturing: Challenges, trends, and applications. **Advances in Mechanical Engineering**, v. 11, n. 2, p. 1687814018822880, 2019.

ABDULLAH, B. J; ATASOY, N.; OMER, A. K. Evaluate the effects of platelet rich plasma (PRP) and zinc oxide ointment on skin wound healing. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 37, p. 30-37, 2019.

ADERIBIGBE, B. A.; BUYANA, B. Alginate in wound dressings. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 42, 2018.

AGUILAR, M. R. & SAN ROMÁN, J. Introduction to smart polymers and their applications. In: **Smart polymers and their applications**. Woodhead Publishing, 2019. p. 1-11.

AIMAN, A. R. et al. Advancing Regenerative Medicine Through the Development of Scaffold, Cell Biology, Biomaterials and Strategies of Smart Material. **Regenerative Engineering and Translational Medicine**, p. 1-23, 2021.

ALBANNA, M. al. In situ bioprinting of autologous skin cells accelerates wound healing of extensive excisional full-thickness wounds. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

ALDANA, A. A. et al. Biomimetic double network hydrogels: Combining dynamic and static crosslinks to enable biofabrication and control cell-matrix interactions. **Journal of Polymer Science**, p. 1-12, 2021.

ALJOHANI, W. et al. Bioprinting and its applications in tissue engineering and regenerative medicine. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 261-275, 2018.



ALI, M. et al. A photo-crosslinkable kidney ECM-derived bioink accelerates renal tissue formation. **Advanced healthcare materials**, v. 8, n. 7, p. 1800992, 2019.

ALLEN, L.; NELSON, A. I.; STEINBERG, M. P.; MCGILL, J. N. Edible corn carbohydrate food coatings. I. Development and physical testing of a starch alginate coating. **Food Technology**, v. 17, p. 1442-1446, 1963.

ALMEIDA, S. A. et al. Avaliação da qualidade de vida em pacientes com diabetes mellitus e pé ulcerado. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 28, n. 1, p. 142-146, 2013.

ALRUWAILI, M. et al. Liquid-phase 3D bioprinting of gelatin alginate hydrogels: influence of printing parameters on hydrogel line width and layer height. **Bio-Design and Manufacturing**, v. 2, n. 3, p. 172-180, 2019.

ALSBERG, E. et al. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 11, p. 2025–2029, 2001.

AMABLE, P. R et al. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. **Stem cell research & therapy**, v. 4, n. 3, p. 67, 2013.

AMBROGI, V. et al. Biocompatible alginate silica supported silver nanoparticles composite films for wound dressing with antibiofilm activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 112, p. 110863, 2020.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. **ASTM D1200-10R18 – Standard Test Method for Viscosity by Ford Viscosity Cup**. ASTM International, West Conchohoken, PA, 2012.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING MATERIALS. **ASTM F2792-12a – Standard terminology for additive manufacturing Technologies**. ASTM International, West Conchohoken, PA, 2012.

AN, H. L.; WON, J.; LEE, H. J. Hyaluronate-alginate hybrid hydrogels modified with biomimetic peptides for controlling the chondrocyte phenotype. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 422–430, 2018.

ANDERSON, D. G.; BURDICK, J. A.; LANGER, R. Smart biomaterials. **Science**, v. 305, n. 5692, p. 1923-1924, 2004.

ANITUA E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 14, n. 4, p. 529-535, 1999.

ANITUA, E. et al. Plasma rich in growth factors reduces blue light-induced oxidative damage on retinal pigment epithelial cells and restores their homeostasis by modulating vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor expression. **Clinical & experimental ophthalmology**, v. 48, n. 6, p. 830-838, 2020.

AROGUZ, A. Z. et al. Alginate/polyoxyethylene and alginate/gelatin hydrogels: preparation, characterization, and application in tissue engineering. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 173, n. 2, p. 433-448, 2014.

ARORA, S. et al. Quantification of platelets and platelet derived growth factors from platelet-rich-plasma (PRP) prepared at different centrifugal force (g) and time. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 54, n. 1, p. 103-110, 2016.

ASADI, N. et al. A novel multifunctional bilayer scaffold based on chitosan nanofiber/alginate-gelatin methacrylate hydrogel for full-thickness wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 734-747, 2021.

ASGHARI, F. et al. Biodegradable and biocompatible polymers for tissue engineering application: a review. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 45, n. 2, p. 185-192, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 5849 – Tintas – Determinação de Viscosidade pelo Copo Ford**. Rio de Janeiro, 2015.

ÁVILA, A. et al. Study of optimization of the synthesis and properties of biocomposite films based on grafted chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 4, p. 752-761, 2012.

BAI, X. et al. Bioactive hydrogels for bone regeneration. **Bioactive materials**, v. 3, n. 4, p. 401-417, 2018.

BARBU, A. et al. Current Trends in Advanced Alginate-Based Wound Dressings for Chronic Wounds. **Journal of Personalized Medicine**, v. 11, n. 9, p. 890, 2021.

BARNETT, S. & VARLEY, S. The effects of calcium alginate on wound healing. **Ann R Coll Surg Engl**, v. 69, n. 4, p. 153, 1987.

BARRIENTOS, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.

BARRETO, J. A. et al. Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy. **Adv Mater**, v. 23, n. 12, 2011.

BARROS, N. R. **Desenvolvimento de blendas poliméricas de látex-alginato e látex-colágeno para aplicação em engenharia de tecidos**. [tese]. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, São Paulo. 2020. 144p.

BELLINI, M. Z.; PIRES, A. L. R.; VASCONCELOS, M. O. et al. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. **Journal Of Applied Polymer Science**. n. 125, p. 421-431, 2012.

BENETT, N. T. & SCHULTZ, G. S. Growth factors and wound healing. **Am J Surg**, v. 166, p. 74-81, 1993.

BHANOT, S. & ALEX, J. C. Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. **Facial plastic surgery**, v. 18, n. 1, p. 27-34, 2002.

BHASKAR, B. **Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: From Basic Concepts to State of the Art Approaches**. Springer Nature, 2021.

BHASKAR, B. & NAGARJUNA, V. Biomaterials, Tissue Engineering, and Regenerative Medicine: A Brief Outline. In: **Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Springer, Singapore, 2021. p. 3-17.

BIANCHERA, A. et al. The place of biomaterials in wound healing. **Therapeutic dressings and wound healing applications**, p. 337-366, 2020.

BIERHALZ, A. C. K. & MORAES, A. M. Composite membranes of alginate and chitosan reinforced with cotton or linen fibers incorporating epidermal growth factor. **Materials Science and Engineering: C**, v. 76, p. 287-294, 2017.

BIGI, A.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, n. 25, p. 5675-5680, 2004.

BLAINE, G. Experimental Observations on Absorbable Alginate Products in Surgery: Gel, Film, Gauze and Foam. **Ann Surg**, v. 125, n. 1, p. 102–14, 1947.

BLOOM, H. " Cellophane" dressing for second-degree burns. **Lancet**, v. 2, p. 559, 1945.

BOANINI, E. & BIGI, A. Biomimetic gelatin–octacalcium phosphate core–shell microspheres. **Journal of colloid and interface science**, v. 362, n. 2, p. 594-599, 2011.

BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.

BORRIONE, P. et al. Systemic effects of locally injected platelet rich plasma in a rat model: an analysis on muscle and bloodstream. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*. v. 29, n. 1, p. 251-258. 2021.

BOSCHI, A. O. O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial? In: Congresso Anual da Associação Brasileira de Metalurgia, 50., 1995, São Pedro. **Anais...** São Paulo: ABM, 1996. v. 6, p. 43–53.

BRANT, A. J. C. et al. Hydrogels from chitosan and a novel copolymer poly (N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrolein). **Materials Sciences and Applications**, v. 2, n. 08, p. 1058, 2011.

BUENO, C. Z. et al. Aplicação de polissacarídeos para a produção de curativos e outros biomateriais. In: DE SOUSA, H. C.; BRAGA, M. E. M.; SOSNIK, A. (Editores). **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados**. Imprensa da Universidade de Coimbra/Coimbra University Press, 2015.

CABRAL, J. et al. Extracellular vesicles as modulators of wound healing. **Advanced drug delivery reviews**, v. 129, p. 394-406, 2018.

CAETANO, G. F. et al. Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 103, n. 5, p. 1013-1022, 2015.

CALORI, I. R. et al. Polymer scaffolds as drug delivery systems. **European Polymer Journal**, v. 129, p. 109621, 2020.

CAMPBELL, I. et al. Additive manufacturing: rapid prototyping comes of age. **Rapid Prototyping Journal**, v. 18, n. 4, p. 255-258, 2012.

CAMPOS, D. F. D. & BLAESER, A. 3D-Bioprinting. In: **Basic Concepts on 3D Cell Culture**. Springer, Cham, 2021. p. 201-232.

CASCONE, M. G. Dynamic–mechanical properties of bioartificial polymeric materials. **Polymer International**, v. 43, n. 1, p. 55-69, 1997.

CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321-32, 2006.

CENTENO, A. F. T. et al. Bioestimulación cutánea con plasma rico en plaquetas autólogo. Estudio controlado con ecografía. **Piel**, v. 28, n. 2, p. 69-74, 2013.

CHABALA, L. F. G; CUARTAS, C. E. E.; LÓPEZ, M. E. L. Release behavior and antibacterial activity of chitosan/alginate blends with aloe vera and silver nanoparticles. **Marine drugs**, v. 15, n. 10, p. 328, 2017.

CHAKRABARTY, D. Interpenetrating polymer networks: Engineering properties and morphology. **Polymer Gels and Networks**, v. 6, n. 3-4, p. 191-204, 1998.

CHANTRE, C. O.; HOERSTRUP, S. P.; PARKER, K. K. Engineering biomimetic and instructive materials for wound healing and regeneration. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 10, p. 97-106, 2019.

CHAUDHARI, R.; LOHARKAR, P. K.; INGLE, A. Medical Applications of Rapid Prototyping Technology. In: **Recent Advances in Industrial Production**. Springer, Singapore, 2021. p. 241-250.

CHEN, H. et al. An injectable self-healing hydrogel with adhesive and antibacterial properties effectively promotes wound healing. **Carbohydrate polymers**, v. 201, p. 522-531, 2018.

CHEN, X. et al. Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. **Nature protocols**, v. 7, n. 4, p. 654, 2012.

CHEN, Q. et al. An interpenetrating alginate/gelatin network for three-dimensional (3D) cell cultures and organ bioprinting. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 756, 2020.

CHO, E. B. et al. Effect of platelet-rich plasma on proliferation and migration in human dermal fibroblasts. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 18, n. 4, p. 1105-1112, 2019.

CHRISMAN, C. A. Care of chronic wounds in palliative care and end-of-life patients. **International wound journal**, v. 7, n. 4, p. 214-235, 2010.

CHUA, C. K. & LEONG, K. F. **3D Printing and Additive Manufacturing: Principles and Applications Fifth Edition**. World Scientific Publishing Company, 2017.

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

CLARK, M. Rediscovering alginate dressings. **Wounds International**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 2012.

CLARK, M. Alginates in dressings and wound management. In: **Alginates and Their Biomedical Applications**. Springer, Singapore, 2018. p. 213-222.

COLOSI, C. et al. Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3d tissue constructs. In: **3D Cell Culture**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 369-380.

CONCEIÇÃO, M. L. et al. Plasma rico em plaquetas: estudo comparativo entre a dupla centrifugação e o filtro E-PET (Equine Platelet Enhancement Therapy). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 215-220, 2017.

CROSBY, C. O. et al. Interpenetrating polymer network hydrogels as bioactive scaffolds for tissue engineering. **Reviews in Chemical Engineering**, 2020. <<https://doi.org/10.1515/revce-2020-0039>> Acesso em 10 Nov. 2021.

CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Cell interactions with three-dimensional matrices. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, p. 633–640, 2002.

DALLAN, P. R. M. et al. Effects of chitosan solution concentration and incorporation of chitin and glycerol on dense chitosan membrane properties. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 80, n. 2, p. 394-405, 2007.

DASH, B. C. et al. Stem cells and engineered scaffolds for regenerative wound healing. **Bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 23, 2018.

DA SILVA, M. L. A. et al. Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: assessment of extracellular matrix formation. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 1149-1157, 2010.

DAUNTON, C. et al. A history of materials and practices for wound management. **Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association**, v. 20, n. 4, 2012.

DAVIES, P. & RIPPON, M. Comparison of foam and hydrocolloid dressings in the management of wounds: a review of the published literature. *World Wide Wounds*, 2010.

DELONG, J. M.; RUSSELL, R. P.; MAZZOCCA, A. D. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. **Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery**, v. 28, n. 7, p. 998-1009, 2012.

DE MACÊDO, L. B. et al. Updates on the use of Biological Membranes in the Healing of Skin Wounds in Animals. **Journal of Advanced Veterinary Research**, v. 8, n. 4, p. 104-109, 2018.

DERAKHSHANFAR, S. et al. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. **Bioactive materials**, v. 3, n. 2, p. 144-156, 2018.

DHILLON, R. S.; SCHWARZ, E. M.; MALONEY, M. D. Platelet-rich plasma therapy- future or trend?. **Arthritis research & therapy**, v. 14, n. 4, p. 219, 2012.

DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings—a review. **BioMedicine**, v. 5, n. 4, 2015.

DIECKMANN, C. et al. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. **Experimental dermatology**, v. 19, n. 8, p. 697-706, 2010.

DING, Z. Y. et al. Novel applications of platelet concentrates in tissue regeneration. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 21, n. 3, p. 1-12, 2021.

DOCKING, R. et al. A preliminary study of pain relieving dressings for older adults with chronic leg ulcers from the provider's perspective: a qualitative study. **Journal of pain & palliative care pharmacotherapy**, v. 32, n. 2-3, p. 71-81, 2018.

DOS SANTOS, R. G. et al. The regenerative mechanisms of platelet-rich plasma: A review. **Cytokine**, v. 144, p. 155560, 2021.

DOYLE, J. W. et al. Effect of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 32, n. 4, p. 561–568, 1996.

DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 47-55, 1997.

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

DUAN, R. The functional properties and application of gelatin derived from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Chem**, v. 239, p. 464–469, 2018.

DUMVILLE, J. C. et al. Hydrogel dressings for healing diabetic foot ulcers. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2013.

ERKOC, P. et al. 3D Printing of Cytocompatible Gelatin-Cellulose-Alginate Blend Hydrogels. *Macromolecular Bioscience*, v. 20, n. 10, p. 2000106, 2020.



ERTAS, Y. N. et al. In Situ Tissue Engineering: A New Dimension. In: **Engineering Materials for Stem Cell Regeneration**. Springer, Singapore, 2021. p. 325-350.

EVERTS, P. A. et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. **Journal of ExtraCorporeal Technology**, v. 38, p. 174-187, 2006.

FARAMARZI, N. et al. Patient-specific bioinks for 3D bioprinting of tissue engineering scaffolds. **Advanced healthcare materials**, v. 7, n. 11, p. 1701347, 2018.

FEDOROVICH, N. E. et al. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. **Tissue engineering**, v. 13, n. 8, p. 1905-1925, 2007.

FERNÁNDEZ-DELGADO, N.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, P.; FORRELLAT-BARRIOS, M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la Medicina Regenerativa. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 28, n. 3, p. 200-216, 2012.

FERRARI, M. et al. A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. **The International journal of Artificial Organs**, v. 10, p. 47-50, 1987.

FISHER, M. B. & MAUCK, R. L. Tissue engineering and regenerative medicine: recent innovations and the transition to translation. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2013.

FORREST, R. D. Early history of wound treatment. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 75, n. 3, p. 198, 1982.

FORTUNATO, G. M. et al. Robotic platform and path planning algorithm for in situ bioprinting. **Bioprinting**, v. 22, p. e00139, 2021.

FRANCISCO, J.C. Desenvolvimento de biomaterial a partir de matriz amniótica humana. [tese]. Universidade Federal do Paraná. 2013; 100 p.

FRANCO, D. et al. Protocol for Obtaining Platelet- Rich Plasma (PRP), platelet-Poor Plasma (PPP), and Thrombin for Autologous Use. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 36, p. 1254-1259, 2012.

GAMBA, M. A.; PETRI, V.; COSTA, M. T. F. **Feridas**. Grupo Gen-Livraria Santos Editora, 2016.

GAO, X. et al. Fabrication and properties of an injectable sodium alginate/PRP composite hydrogel as a potential cell carrier for cartilage repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 9, p. 2076-2087, 2019.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. da. Ácido algínico bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, p. 1006-1080, 2008.

GARMS, B. C. et al. Novel polymeric dressing to the treatment of infected chronic wound. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 12, p. 4767-4778, 2019.

GASPERINI, L.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 100, p. 20140817, 2014.

GENTILE, P. et al. Impact of the different preparation methods to obtain autologous non-activated platelet-rich plasma (A-PRP) and activated platelet-rich plasma (AA-PRP) in plastic surgery: wound healing and hair regrowth evaluation. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 2, p. 431, 2020.

GEORGE, A. et al. A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, p. 329-338, 2020.

GHOSH, S. et al. Application of 3D Bioprinting in Wound Healing: A Review. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**, v. 35, n. 5, p. 495-509, 2021.

GILEVICH, I. V. et al. Platelet-rich plasma in the treatment of chronic inflammatory diseases of lower extremities. **Science and Innovations in Medicine**, v. 6, n. 3, p. 63-68, 2021.

GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circulation research**, v. 100, n. 9, p. 1249-1260, 2007.

GIUSEPPE, M. D. et al. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 79, p. 150-157, 2018.

GOLCHIN, A. et al. Regenerative Medicine Under the Control of 3D Scaffolds: Current State and Progress of Tissue Scaffolds. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 16, n. 2, p. 209-229, 2021.

GOMES, M. et al. Natural polymers in tissue engineering applications. In: **Tissue engineering**. Academic Press, 2013. p. 145-192.

GROLL, J. et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, v. 11, n. 1, p. 013001, 2019.

GU, Z. et al. Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 5, p. 529-557, 2020.

GUILLEMOT, F. et al. Laser-assisted cell printing: principle, physical parameters versus cell fate and perspectives in tissue engineering. **Nanomedicine**. v. 5, n. 3, p. 507–515, 2010.

GUPTA, A. et al. Ultraviolet radiation in wound care: sterilization and stimulation. **Advances in wound care**, v. 2, n. 8, p. 422-437, 2013.

HAKIMI, N. et al. Handheld skin printer: in situ formation of planar biomaterials and tissues. *Lab on a Chip*, v. 18, n. 10, p. 1440-1451, 2018.

HARPER, B. A. et al. Characterization of 'wet'alginate and composite films containing gelatin, whey or soy protein. **Food research international**, v. 52, n. 2, p. 452-459, 2013.

HASSAN, M. E. S.; BAI, J.; DOU, D. Q. Biopolymers; definition, classification and applications. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 62, n. 9, p. 1725-1737, 2019.

HAUG, A. & SMIDSROD, O. Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions. **Acta Chem Scand**, v. 24, n. 3, p. 843–854, 1970.

HEATH, D. E. & COOPER, S. L. The development of polymeric biomaterials inspired by the extracellular matrix. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, v. 28, n. 10-12, p. 1051-1069, 2017.

HOSPODIUK, M. et al. Extrusion-based biofabrication in tissue engineering and regenerative medicine. **3D printing and biofabrication**, p. 1-27, 2017.

HU, X. et al. Mechanically tough biomacromolecular IPN hydrogel fibers by enzymatic and ionic crosslinking. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 403-409, 2015.

HU, H. & XU, F. J. Rational design and latest advances of polysaccharide-based hydrogels for wound healing. **Biomaterials science**, v. 8, n. 8, p. 2084-2101, 2020.

HUANG, B. et al. Effects of halloysite nanotubes on physical properties and cytocompatibility of alginate composite hydrogels. **Materials Science and Engineering: C**, v. 70, p. 303–310, 2017.

IBGE. Expectativa de vida dos brasileiros aumenta 3 meses e chega a 76,6 anos em 2019. [S.l.] [2020]. Disponível em: <<https://censo2021.ibge.gov.br/2012-agencia-de-noticias/noticias/29505-expectativa-de-vida-dos-brasileiros-aumenta-3-meses-e-chega-a-76-6-anos-em-2019.html>> Acesso em 18 mai. 2021.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocósméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 19, n. 1, p. 81-96, 2008.

IWANAGA, S.; ARAI, K.; NAKAMURA, M. Inkjet bioprinting. In: **Essentials of 3D biofabrication and translation**. Academic Press, 2015. p. 61-79.

JANG, T. S. et al. 3D printing of hydrogel composite systems: Recent advances in technology for tissue engineering. **International Journal of Bioprinting**, v. 4, n. 1, 2018.

JAYAKUMAR, R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2011.

JI, S. & GUVENDIREN, M. Recent advances in bioink design for 3D bioprinting of tissues and organs. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 5, p. 23, 2017.

JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n.4, p. 457-463, 2003.

JIMÉNEZ, M. et al. Additive manufacturing technologies: an overview about 3D printing methods and future prospects. **Complexity**, v. 357, p. 559-566, 2019.

JO, C. H. et al. Optimizing platelet-rich plasma gel formation by varying time and gravitational forces during centrifugation. **Journal of Oral Implantology**, v. 39, n. 5, p. 525-532, 2013.

JOHANSSON, T. The significance of believing in healing: On the therapeutic value of spoken words in ancient Egyptian medical papyri. 2019.

JONES, I.; CURRIE, L.; MARTIN, R. A guide to biological skin substitutes. **British journal of plastic surgery**, v. 55, n. 3, p. 185-193, 2002.

JONES, M. L. The HCA's guide to modern dressings. **British Journal of Healthcare Assistants**, v. 9, n. 9, p. 427-434, 2015.

JONES, M. L. Wound care: a brief history. **British Journal of Healthcare Assistants**, v. 3, n. 4, p. 186-188, 2009.

JONES, A. M.; SAN MIGUEL, L. Are modern wound dressings a clinical and cost-effective alternative to the use of gauze?. **Journal of wound care**, v. 15, n. 2, p. 65-69, 2006.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 13ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAČAREVIĆ, Z. P. et al. An introduction to 3D bioprinting: possibilities, challenges and future aspects. **Materials**, v. 11, n. 11, p. 2199, 2018.

KARIMKHANI, C. et al. Global skin disease morbidity and mortality: an update from the global burden of disease study 2013. **JAMA dermatology**, v. 153, n. 5, p. 406-412, 2017.

KATARI, R.; PELOSO, A.; ORLANDO, G. Tissue engineering and regenerative medicine: semantic considerations for an evolving paradigm. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 2, p. 57, 2015.

KHADEMHOSEINI, A. **3D Bioprinting in Regenerative Engineering: Principles and Applications**. CRC Press, 2018.

KHAN, F. & AHMAD, S. R. Polysaccharides and their derivatives for versatile tissue engineering application. **Macromolecular bioscience**, v. 13, n. 4, p. 395-421, 2013.

KHARAZIHA, M.; BAIDYA, A.; ANNABI, N. Rational Design of Immunomodulatory Hydrogels for Chronic Wound Healing. **Advanced Materials**, v. 33, n. 39, p. 2100176, 2021.

KICKLER, T. S. Platelet biology—an overview. **Transfusion alternatives in transfusion medicine**, v. 8, n. 2, p. 79-85, 2006.

KIM, D. et al. Morphologic and transcriptomic comparison of adipose and bone-marrow-derived porcine stem cells cultured in alginate hydrogels. **Cell Tissue Res**, v. 341, p. 359–370, 2010.

KLIMEK, K. & GINALSKA, G. Proteins and peptides as important modifiers of the polymer scaffolds for tissue engineering applications - A review. **Polymers**, v. 12, n. 4, p. 844, 2020.

KNIGHTON, D. R. et al. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). **Annals of surgery**, v. 204, n. 3, p. 322, 1986.

KOEHLER, J.; BRANDL, F. P.; GOEPFERICH, A. M. Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. **European Polymer Journal**, v. 100, p. 1-11, 2018.

KOGA, A. Y. et al. Evaluation of wound healing effect of alginate films containin g Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) gel. **Journal of Biomaterials applications**, v. 32, n. 9, p. 1212-1221, 2018.

KON, E. et al. Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano-composite multilayered biomaterial. **Journal of orthopaedic research**, v. 28, n. 1, p. 116-124, 2010.

KONTOPODIS, N. et al. Effectiveness of platelet -rich plasma to enhance healing of diabetic foot ulcers in patients with concomitant peripheral arterial disease and critical limb ischemia. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2016.

KOPP, J. et al. Ancient traditional Chinese medicine in burn treatment: a historical review. **Burns**, v. 29, n. 5, p. 473-478, 2003.

KUMAR, S.; BENDI, R.; KUMAR, V. Introduction to 3D Printing Technology for Biomedical Applications. In: **3D printable Gel-inks for Tissue Engineering**. Springer, Singapore, 2021. p. 1-26.

KUO, C. K. & MA, P. X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. **Biomaterials**, v. 22, n. 6, p. 511–521, 2001.

LANGER, R. & VACANTI, J. Tissue engineering. **Science**. v. 260, n. 5110, p.920-926, 1993.

LANZA, R. et al. **Principles of tissue engineering (5<sup>th</sup> edition)**. Academic press, 2020.

LEE, J.; CUDDIHY, M. J.; KOTOV, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. **Tissue Eng B Rev**, v. 14, n. 1, p. 61–86, 2008.

LEE, J. Y. et al. Customized biomimetic scaffolds created by indirect three-dimensional printing for tissue engineering. **Biofabrication**, v. 5, n. 4, p. 045003, 2013.

LEE, K. Y. & MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37., n. 1, p. 106–126, 2012.

LEEUWENBURGH, S. C. et al. Trends in biomaterials research: An analysis of the scientific programme of the World Biomaterials Congress 2008. **Biomaterials**, v. 29, n. 21, p. 3047, 2008.

LESHER, A. P. et al. Effectiveness of Biomembrane for treatment of partial-thickness burns in children. **Journal of pediatric surgery**, v. 46, n. 9, p. 1759-1763, 2011.

LESSER, M. A. Alginates in drugs and cosmetics. **Drug and cosmetic industry**, v. 61, n. 6, p. 761-842, 1947.

LEV, E. & AMAR, Z. “Fossils” of practical medical knowledge from medieval Cairo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 24-40, 2008.

LI, J. et al. 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 140, p. 100543, 2020.

LI, L. et al. Engineering gelatin-based alginate/carbon nanotubes blend bioink for direct 3D printing of vessel constructs. **International journal of biological macromolecules**, v. 145, p. 262-271, 2020.

LI, W. et al. A Smartphone-Enabled Portable Digital Light Processing 3D Printer. **Advanced Materials**, v. 33, n. 35, p. 2102153, 2021.

LI, Z. et al. Tuning alginate-gelatin bioink properties by varying solvent and their impact on stem cell behavior. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

LI, Z. & ZHANG, M. Chitosan–alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 75, n. 2, p. 485-493, 2005.



LIAO, X. et al. Allogeneic platelet-rich plasma therapy as an effective and safe adjuvant method for chronic wounds. **Journal of Surgical Research**, v. 246, p. 284-291, 2020.

LIPTÁK, B. G. & VENCZEL, K. **Analysis and Analyzers: Volume II**. CRC Press, 2016.

LIU, H. et al. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. **RSC advances**, v. 8, n. 14, p. 7533-7549, 2018.

LOHANI, A. et al. Interpenetrating polymer networks as innovative drug delivery systems. **Journal of drug delivery**, v. 2014, 2014.

LORSON, T. et al. Sterilization methods and their influence on physicochemical properties and bioprinting of alginate as a bioink component. **ACS omega**, v. 5, n. 12, p. 6481-6486, 2020.

LU, B. et al. Healing of skin wounds with a chitosan–gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 884-891, 2016.

LV, Y. et al. Artificial Dermis and Autologous Platelet-Rich Plasma for Treatment of Refractory Wounds: A Clinical Study. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, p. 15347346211050710, 2021.

MA, L. et al. Mechanical and structural properties of rabbit skin gelatin films. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 1203-1218, 2018.

MALAFAYA, P. B.; SILVA, G. A.; REIS, R. L. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 4-5, p. 207-233, 2007.

MALAGUTTI, W. & KAKIHARA, C. T. Curativos, estomias e dermatologia: uma abordagem multiprofissional. In: **Curativos, estomias e dermatologia: uma abordagem multiprofissional**. 2014. p. 637-637.

MALEKMOHAMMADI, S. et al. Smart and Biomimetic 3D and 4D Printed Composite Hydrogels: Opportunities for Different Biomedical Applications. **Biomedicines**, v. 9, n. 11, p. 1537, 2021.

MALDA, J. et al. 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. **Advanced materials**, v. 25, n. 36, p. 5011-5028, 2013.

MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates. **Journal of Food Engineering**, v. 28, p. 283-295, 1996.

MARGOLIS, D. J. et al. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. **Diabetes care**, v. 24, n. 3, p. 483-488, 2001.

MARQUES, L. F. et al. Platelet-rich plasma (PRP): Methodological aspects and clinical applications. **Platelets**, v. 26, n. 2, p. 101-113, 2015.

MARRECO, P. R. et al. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 268-277, 2004.

MARTINEAU, L. & SHEK, P. N. Evaluation of a bi-layer wound dressing for burn care: I. Cooling and wound healing properties. **Burns**, v. 32, n. 1, p. 70-76, 2006.

MARX, R. E., et al. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 85, n. 6, p. 638-646, 1998.

MASSEE, M. et al. Type I and II diabetic adipose-derived stem cells respond in vitro to dehydrated human amnion/chorion membrane allograft treatment by increasing proliferation, migration, and altering cytokine secretion. **Advances in wound care**, v. 5, n. 2, p. 43-54, 2016.

MATRICARDI, P. et al. Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 9, p. 1172-1187, 2013.

MAZZOCCA, A. D. et al. Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. **JBJS**, v. 94, n. 4, p. 308-316, 2012.

MCDANIEL, J. C. & BROWNING, K. K. Smoking, chronic wound healing, and implications for evidence-based practice. **Journal of wound, ostomy, and**

**continence nursing: official publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society/WOCN**, v. 41, n. 5, p. 415, 2014.

MCHUGH, D. J. Production, properties and uses of alginates. Production and utilization of products from commercial seaweeds. **FAO Fish Tech Pap**, v. 288, p. 58–115, 1987.

MENG, X. et al. Stem cells in a three-dimensional scaffold environment. **Springerplus**, v. 3, n. 1, p. 80, 2014.

MOAY, Z. K. et al. Keratin-Alginate Sponges Support Healing of Partial-Thickness Burns. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 16, p. 8594, 2021.

MONCAL, K. K. et al. Intra-Operative Bioprinting of Hard, Soft, and Hard/Soft Composite Tissues for Craniomaxillofacial Reconstruction. **Advanced Functional Materials**, v. 31, n. 29, p. 2010858, 2021.

MONDAL, A. et al. Investigation of Rheology and 3D Printability of PDMS Nanocomposites Ink. In: **Proceedings of the American Society for Composites—Thirty-fourth Technical Conference**. 2019.

MONTEIRO, M. R. Plasma rico em plaquetas em dermatologia. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 5, n. 2, p. 155–159, 2013.

MONTERO, A. et al. Hyaluronic acid-fibrin hydrogels show improved mechanical stability in dermo-epidermal skin substitutes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 128, p. 112352, 2021.

MONTERO, E. C.; SANTOS, M. F.; FERNÁNDEZ, R. S. Plasma rico en plaquetas: aplicaciones en dermatología. **Actas dermo-sifiliográficas**, v. 106, n. 2, p. 104-111, 2015.

MONTOYA, C. et al. On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. **Bone Research**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2021.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. A. Alginate biosynthesis and biotechnological production. In: **Alginates and their biomedical applications**. Springer, Singapore, 2018. p. 1-25.

MORAIS, A. et al. Advanced biomaterials and processing methods for liver regeneration: state-of-the-art and future trends. **Advanced healthcare materials**, v. 9, n. 5, p. 1901435, 2020.

MØRCH, Y. A. et al. Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471–1480, 2006.

MORGAN, F. L. C.; MORONI, L.; BAKER, M. B. Dynamic bioinks to advance bioprinting. **Advanced healthcare materials**, v. 9, n. 15, p. 1901798, 2020.

MUCHA, M.; PIEKIELNA, J.; WIECZOREK, A. Characterisation and morphology of biodegradable chitosan/synthetic polymer blends. In: **Macromolecular symposia**. Weinheim, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1999. p. 391-412.

MUKHTAR, A. et al. Applications of Polymeric Materials in Biomedical Engineering. In: **Sustainable Production and Applications of Waterborne Polyurethanes**. Springer, Cham, 2021. p. 133-142.

MUNOZ-ABRAHAM, A. S. et al. 3D printing of organs for transplantation: where are we and where are we heading? **Current Transplantation Reports**, v. 3, n. 1, p. 93-99, 2016.

MURPHY, S. V. & ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 773, 2014.

MURUGAN, S. S. et al. Polymeric Biomaterials for Bone Tissue Repair and Regeneration. In: **Functional Nanomaterials for Regenerative Tissue Medicines**. CRC Press. p. 239-262.

NAIR, K. et al. Characterization of cell viability during bioprinting processes. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 4, n. 8, p. 1168-1177, 2009.

NAM, S. Y. & PARK, S. H. ECM based bioink for tissue mimetic 3D bioprinting. **Biomimetic Medical Materials**, p. 335-353, 2018.

NEGI, S., DHIMAN, S., & SHARMA, R. K. Basics, applications and future of additive manufacturing technologies: A review. **Journal of Manufacturing Technology Research**, v. 5, n. 1/2, p. 75.

NEGUT, I.; DORCIOMAN, G.; GRUMEZESCU, V. Scaffolds for Wound Healing Applications. **Polymers**, v. 12, n. 9, p. 2010, 2020.

NEVES, M. I.; MORONI, L.; BARRIAS, C. C. Modulating alginate hydrogels for improved biological performance as cellular 3D microenvironments. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 665, 2020.

NGO, T. D. et al. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. **Composites Part B: Engineering**, v. 143, p. 172-196, 2018.

NIH. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Disponível em: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine#pid-1156>. Acesso em: 23 jan. 2021.

NIKOLOVA, M. P. & CHAVALI, M. S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. **Bioactive materials**, v. 4, p. 271-292, 2019.

NOOEAD, P.; CHUYSINUAN, P.; TECHASAKUL, S. Alginate/gelatine hydrogels: characterisation and application of antioxidant release. **Green Materials**, v. 5, n. 4, p. 153-164, 2017.

NUSSBAUM, S. R. et al. An economic evaluation of the impact, cost, and medicare policy implications of chronic nonhealing wounds. **Value in Health**, v. 21, n. 1, p. 27-32, 2018.

O'BRIEN, J. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OLIVEIRA, C. S.; LEEUWENBURGH, S.; MANO, J. F. New insights into the biomimetic design and biomedical applications of bioengineered bone microenvironments. **APL Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 041507, 2021.

OLIVEIRA, M. P. **Análise in vitro da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana** [dissertação]. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2009. 71p.

ONETO, P. & ETULAIN, J. PRP in wound healing applications. **Platelets**, v. 32, n. 2, p. 189-199, 2021.

ONSØYEN, E. Alginates. In: Thickening and gelling agents for food. Ed. IMENSON, A. London: Blackie Academic & Professional 2 ed., p. 230-260, 1997.

ONU. Pandemics: Do They Change How We Address Age and Ageing? [S.I.] [2020]. Disponível em: <<https://www.un.org/en/observances/older-persons-day#:~:text=By%202020%2C%20the%20number%20of,%2D%20and%20middle%2Dincome%20countries.>> Acesso em 18 mai. 2021.

OZEL, B. et al. Polysaccharide blended whey protein isolate-(WPI) hydrogels: a physicochemical and controlled release study. **Food Hydrocoll**, v. 71, p. 35–46, 2017.

PAN, T. et al. 3D bioplotting of gelatin/alginate scaffolds for tissue engineering: influence of crosslinking degree and pore architecture on physicochemical properties. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 32, n. 9, p. 889-900, 2016.

PANDEY, P M.; REDDY, N. V.; DHANDE, S. G. Real time adaptive slicing for fused deposition modelling. **International Journal of Machine Tools and Manufacture**, v. 43, n. 1, p. 61-71, 2003.

PAPPALARDO, D.; MATHISEN, T.; FINNE-WISTRAND, A. Biocompatibility of resorbable polymers: a historical perspective and framework for the future. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 4, p. 1465-1477, 2019.

PARK, J. B. & BRONZINO, J. D. **Biomaterials – Principles and Applications**. CRC Press: New York. 2003.

PARK, M. H. et al. The three dimensional cues-integrated-biomaterial potentiates differentiation of human mesenchymal stem cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 488–496, 2018.

PASPARAKIS, G. & BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. **International journal of pharmaceutics**, v. 323, n. 1-2, p. 34-42, 2006.

PASSADOR, F. R.; PESSAN, L. A.; RODOLFO JR, A. Estado de mistura e dispersão da fase borrachosa em blendas PVC/NBR. **Polímeros**, v. 16, n. 3, p. 174-181, 2006.

PATI, F. et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. **Nat Commun**, v. 5, n. 1, p. 3935, 2014.

PAWAR, S. N. & EDGAR, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3279–3305, 2012.

PEDERSEN, L. K. & JEMEC, G. B. E. Plasticising effect of water and glycerin on human skin in vivo. **Journal of dermatological science**, v. 19, n. 1, p. 48-52, 1999.

PEREIRA, R. et al. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 52, p. 221-230, 2013.

PEREGO, R. et al. Use of Autologous Leucocyte-and Platelet-Rich Plasma (L-PRP) in the Treatment of Aural Hematoma in Dogs. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 9, p. 172, 2021.

PEREZ, A. G. M. Preparação, modulação, encapsulação e liberação controlada de plasma rico em plaquetas para aplicação em terapia regenerativa [tese]. Universidade Estadual de Campinas, 2013; 232 p.

PETROVIC, V. et al. Additive layered manufacturing: sectors of industrial application shown through case studies. **International Journal of Production Research**, v. 49, n. 4, p. 1061-1079, 2011.

PICARD, F. et al. The growing evidence for the use of platelet-rich plasma on diabetic chronic wounds: A review and a proposal for a new standard care. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 5, p. 638-643, 2015.

PINA, S. et al. Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Materials**, v. 12, n. 11, p. 1824, 2019.

PINTO, J. M. N & PIZANI, N. S. Aplicabilidade em dermatologia do plasma rico em plaquetas. **Surgical And Cosmetic Dermatology**, v. 7, n.1, p.61-64, 2015.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

RATHINAMOORTHY, R. & SASIKALA, L. Polysaccharide fibers in wound management. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v. 3, p. 38-44, 2011.

RATNER, B. D. & BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 6, p. 41-75, 2004.

RAUF, S. et al. Self-assembling tetrameric peptides allow in situ 3D bioprinting under physiological conditions. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 4, p. 1069-1081, 2021.

RAWLINGS, A. V. & LOMBARD, K. J. A review on the extensive skin benefits of mineral oil. **International journal of cosmetic science**, v. 34, n. 6, p. 511-518, 2012.

REED, B. R. & CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair: practical implications of current knowledge. II. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 13, n. 6, p. 919-941, 1985.

REES, H. M. & ECKER, E. E. An improved method of counting blood platelets. **J. Amer. Med. Ass.**, v. 80, n. 9, p. 621-622, 1923.

REHM, B. H. A. & MORADALI, M. F. **Alginates and their biomedical applications**. Berlin, Germany: Springer, 2018.

RODRIGUES, A. P. et al. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. **Journal of applied polymer science**, v. 109, n. 4, p. 2703-2710, 2008.

ROWLEY, J. A.; MADLAMBAYAN G.; MOONEY, D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. **Biomaterials**, v. 20, p. 45–53, 1999.

SAARAI, A. et al. On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatine hydrogels. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 18, p. 152-166, 2013.



SADEGHI-ATAABADI, M. et al. Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 71, p. 372-380, 2017.

SALOMÉ, G. M. et al. The impact of venous leg ulcers on body image and self-esteem. **Advances in skin & wound care**, v. 29, n. 7, p. 316-321, 2016.

SÁNCHEZ, M. et al. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. **The American journal of sports medicine**, v. 35, n. 2, p. 245-251, 2007.

SÁNCHEZ, M. et al. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. **Sports medicine**, v. 39, n. 5, p. 345-354, 2009.

SÁNCHEZ, M. et al. Platelet rich plasma (PRP) biotechnology: Concepts and therapeutic applications in orthopedics and sports medicine. **InTech**, p.113-138, 2012.

SANTOS, N. C. D. **Gel de plasma rico em plaquetas (PRP) e associação de gel de PRP com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano: caracterização físico-química, morfológica e de análise de viabilidade celular** [dissertação]. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Assis, São Paulo. 2017. 98p.

SARKER, B. et al. Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 11, p. 1470-1482, 2014.

SARKER, B. & BOCCACCINI, A. R. Alginate utilization in tissue engineering and cell therapy. In: **Alginates and Their Biomedical Applications**. Springer, Singapore, 2018. p. 121-155.

SAVINI, A.; SAVINI, G. G. A short history of 3D printing, a technological revolution just started. In: **2015 ICOHTEC/IEEE international history of high-technologies and their socio-cultural contexts conference (HISTELCON)**. IEEE, 2015. p. 1-8.

SCAIN, S. F.; FRANZEN, E.; HIRAKATA, V. N. Riscos associados à mortalidade em pacientes atendidos em um programa de prevenção do pé diabético. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 39, 2018.

SCHNEIBLE, J. D.; DANIELE, M. A.; MENEGATTI, S. Natural and Synthetic Biopolymers in Drug Delivery and Tissue Engineering. **Biopolymers for Biomedical and Biotechnological Applications**, p. 265-356, 2021.

SCHONBERGER, J. L. & FRAHM, J. M. Structure-from-motion revisited. In: **Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition**. 2016. p. 4104-4113.

SCHULTZ, G. S. et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. **Wound repair and regeneration**, v. 11, p. S1-S28, 2003.

SEKAR, J. A. et al. 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Current Landscape and Future Prospects. In: **Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Springer, Singapore, 2021. p. 561-580.

SERRANO, M. L. et al. Risk factors for pressure ulcer development in Intensive Care Units: A systematic review. **Medicina Intensiva (English Edition)**, v. 41, n. 6, p. 339-346, 2017.

SEVERINO, P. et al. Alginate nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current pharmaceutical design**, v. 25, n. 11, p. 1312-1334, 2019.

SHAKOR, P. et al. Review of emerging additive manufacturing technologies in 3D printing of cementitious materials in the construction industry. **Frontiers in Built Environment**, v. 4, p. 85, 2019.

SHARMA, P. et al. Tissue engineering; current status & futuristic scope. **Journal of medicine and life**, v. 12, n. 3, p. 225, 2019.

SHEIR, M. M.; NASRA, M. M. A.; ABDALLAH, O. Y. Chitosan alginate nanoparticles as a platform for the treatment of diabetic and non-diabetic pressure ulcers: Formulation and in vitro/in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 607, p. 120963, 2021.

SHEN, Z. et al. Efficacy and safety of platelet-rich plasma in treating cutaneous ulceration: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 18, n. 2, p. 495-507, 2019.

SHIMOJO, A. A. M. et al. Performance of PRP associated with porous chitosan as a composite scaffold for regenerative medicine. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

SINGH, S. et al. In situ bioprinting—bioprinting from benchside to bedside?. **Acta biomaterialia**, v. 101, p. 14-25, 2020.

SKARDAL, A. **Principles and applications of bioprinting. 3D bioprinting in regenerative engineering principles and applications**. CRC Press, Boca Raton, p. 1-19, 2018.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New England journal of medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

SIONKOWSKA, A. Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials. **Progress in polymer science**, v. 36, n. 9, p. 1254-1276, 2011.

SIQUEIRA, P. et al. Three-dimensional stable alginate-nanocellulose gels for biomedical applications: Towards tunable mechanical properties and cell growing. **Nanomaterials**, v. 9, n. 1, p. 78, 2019.

SMETANA, K. Cell biology of hydrogels. **Biomaterials**, v. 14, p. 1046–1050, 1993.

SMITH, J. R. et al. Biomedical applications of polymers and ceramic coatings: a review of recent developments. **Transactions of the IMF-The International Journal of Surface Engineering and Coatings**, 2021.

SORG, H. et al. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1-2, p. 81-94, 2017.

SOUZA, E. J. R. et al. Geographic variation as a risk factor for digital ulcers in systemic sclerosis patients: a multicentre registry. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 46, n. 4, p. 288-295, 2017.

STEED, D. L. Debridement. **The American journal of surgery**, v. 187, n. 5, p. S71-S74, 2004.

STEPANOVSKA, J. et al. Collagen Bioinks for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogel Properties, Bioprinting Parameters, Protocols, and Bioprinted Structure Characteristics. **Biomedicines**, v. 9, n. 9, p. 1137, 2021.

STESSUK, T. et al. A topical cell therapy approach for diabetic chronic ulcers: Effects of mesenchymal stromal cells associated with platelet-rich plasma. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 19, n. 10, p. 2669-2678, 2020.

STESSUK, T. et al. Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Archives of dermatological research**, v. 308, n. 7, p. 511-520, 2016.

STESSUK, T. **Terapia celular em úlceras crônicas com implante de células tronco mesenquimais associadas a plasma rico em plaquetas** [tese]. Universidade de São Paulo, 2016; 142 p.

STANFORD, E. C. C. On align: a new substance obtained from some of the commoner species of marine algae. **Chem News**, v. 47, p. 254–257, 1883.

STARLY, B.; SHIRWAIKER, R. 3D bioprinting techniques. **3D Bioprinting Nanotechnology in Tissue Engineering Regenerative Medicine**. v. 15, n. 8, p. 5321-5329, 2015.

SUBBARAYAPPA, B. V. The roots of ancient medicine: an historical outline. **Journal of Biosciences**, v. 26, n. 2, p. 135-143, 2001.

SUBRAMANIAM, T. et al. Comparison of three different skin substitutes in promoting wound healing in an ovine model. **Burns**, v. 6514, p. 1-11, 2021.

SUN, J. & TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials**, v. 6, n. 4, p. 1285–1309, 2013.

SWEENEY, I. R.; MIRAFTAB, M.; COLLYER, G A critical review of modern and emerging absorbent dressings used to treat exuding wounds. **International wound journal**, v. 9, n. 6, p. 601-612, 2012.

SZEKALSKA, M. et al. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. **International Journal of Polymer Science**, v. 2016, p. 1140-1156, 2016.

TAGHIPOUR, Y. D. et al. The application of hydrogels based on natural polymers for tissue engineering. **Current medicinal chemistry**, v. 27, n. 16, p. 2658-2680, 2020.

TAKAMORI, E. R. et al. Fibrina rica em plaquetas: preparo, definição da qualidade, uso clínico. **Revista Vigilância Sanitária em Debate**. v. 6, n. 1, p. 118-124, 2018.

TALIKOWSKA, M.; FU, X.; LISAK, G. Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 135, p. 50-63, 2019.

TALUKDAR, D. & DUTTA, K. An archetype for evolving dynamics of primitive human culture. **Evolving Systems**, p. 1-15, 2020.

TAN, S. H. et al. Recent Advances in the Design of Three-Dimensional and Bioprinted Scaffolds for Full-Thickness Wound Healing. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 2021.

TAN, H., & MARRA, K. G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1746–1767, 2010.

TEIXEIRA, M. V. T. et al. Utilização de plaquetas e de produtos derivados de plaquetas humanas em terapias avançadas. **Revista Vigilância Sanitária em Debate**. v. 6, n. 1, p. 125-136, 2018.

THOMAS, D. et al. Alginate film modified with aloe vera gel and cellulose nanocrystals for wound dressing application: Preparation, characterization and in vitro evaluation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 59, p. 101894, 2020.

THOMAS, L. V. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering: Retrospect and Prospects. In: **Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Springer, Singapore, 2021. p. 89-118.

THOMAS, S. & LOVELESS, P. Observations on the fluid handling properties of alginate dressings. **Pharmaceutical journal**, v. 248, n. 6693, p. 850-851, 1992.

TONSOMBOON, K.; BUTCHER, A. L.; & OYEN, M. L. Strong and tough nanofibrous hydrogel composites based on biomimetic principles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 72, p. 220–227, 2017.

TOTTOLI, E. M. et al. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 735, 2020.

UTRACKI, L. A. **Commercial polymer blends**. Springer Science & Business Media, 2013.

VALOT, L. et al. Chemical insights into biinks for 3D printing. **Chemical Society Reviews**, v. 48, n. 15, p. 4049-4086, 2019.

VARAPRASAD, K. et al. Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review. **Carbohydrate polymers**, v. 236, p. 116025, 2020.

VENDRAMIN, F. S. et al. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 1, p. 24-28, 2006.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 24, n. 2, p. 212-218, 2009.

VERMA, D. et al. Characterization of surface charge and mechanical properties of chitosan/alginate based biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 8, p. 1741-1747, 2011.

WAINWRIGHT, D. J. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. **Burns**, v. 21, n. 4, p. 243-248, 1995.

WALKER, M. & HUMPHRIES, S. 3D Printing: Applications in evolution and ecology. **Ecology and evolution**, v. 9, n. 7, p. 4289-4301, 2019.

WANG, Q. Q. et al. Alginate/gelatin blended hydrogel fibers cross-linked by Ca<sup>2+</sup> and oxidized starch: Preparation and properties. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 1469-1476, 2019.

WANG, Y. et al. Ultrasonic assisted microwave synthesis of poly (chitosan-co-gelatin)/polyvinyl pyrrolidone IPN hydrogel, Ultrason. **Sonochem**, v. 40, p. 714–719, 2018.

WEI, L. et al. 3D printing of silk fibroin-based hybrid scaffold treated with platelet rich plasma for bone tissue engineering. **Bioactive materials**, v. 4, p. 256-260, 2019.

WESTPHALEN, N. et al. Roman Warfare, Ships and Medicine. **Journal of Military and Veteran's Health**, v. 28, n. 3, p. 11-21, 2020.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials**: proceeding of a consensus conference of the european society for biomaterials, Chester. Progress in biomedical engineering. Amsterdam: Elsevier, 1987.

WINTER, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, v. 193, n. 4812, p. 293-294, 1962.

WOO, K. Y. et al. Palliative wound care management strategies for palliative patients and their circles of care. **Advances in skin & wound care**, v. 28, n. 3, p. 130-140, 2015.

WONG, V. W. & GURTNER, G. C. Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 10, p. 729-734, 2012.

WU, L. et al. Mechanical characterization and modeling of sponge-reinforced hydrogel composites under compression. **Soft Matter**, v. 14, n. 21, p. 4355–4363, 2018.

XIAN, L. J. et al. Concentration-dependent effect of platelet-rich plasma on keratinocyte and fibroblast wound healing. **Cytotherapy**, v. 17, n. 3, p. 293-300, 2015.

XU, P. et al. Platelet-rich plasma accelerates skin wound healing by promoting re-epithelialization. **Burns & trauma**, v. 8, p. 1-14, 2020.

XUE, M. et al. Delivery systems of current biologicals for the treatment of chronic cutaneous wounds and severe burns. **Advanced drug delivery reviews**, v. 129, p. 219-241, 2018.

YAN, Y. et al. Direct construction of a three-dimensional structure with cells and hydrogel. **Journal of bioactive and compatible polymers**, v. 20, n. 3, p. 259-269, 2005.

YANG, X. et al. Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 83, p. 195–201, 2018.

YANG, Y.; RITCHIE, A. C.; EVERITT, N. M. Comparison of glutaraldehyde and procyanidin cross-linked scaffolds for soft tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 263-273, 2017.

YAP, Y. L.; SING, S. L.; YEONG, W. Y. A review of 3D printing processes and materials for soft robotics. **Rapid Prototyping Journal**, v. 26, n. 8, p. 1345-1361, 2020.

YU, M. et al. Cytokine release kinetics of concentrated growth factors in different scaffolds. **Clinical oral investigations**, v. 23, n. 4, p. 1663-1671, 2019.

ZARRINTAJ, P. et al. Application of compatibilized polymer blends in biomedical fields. In: **Compatibilization of Polymer Blends**. Elsevier, 2020. p. 511-537.

ZHAN, C. et al. Three-dimensional printing of cell-laden bioink for blood vessel tissue engineering: Influence of process parameters and components on cell viability. **Authorea Preprints**, 2021.

ZHANG, M. & ZHAO, X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1414-1428, 2020.

ZHANG, P.; HEYNE, M. A.; TO, A. C. Biomimetic staggered composites with highly enhanced energy dissipation: Modeling, 3D printing, and testing. **Journal of the Mechanics and Physics of Solids**, v. 83, p. 285-300, 2015.

ZHAO, X. et al. Injectable stem cell-laden photocrosslinkable microspheres fabricated using microfluidics for rapid generation of osteogenic tissue constructs. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 17, p. 2809-2819, 2016.



ZHAO, Y. et al. The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3D cell printing technology. **Biofabrication**, v. 7, n. 4, p. 045002, 2015.

ZHU, T. et al. Recent Progress of Polysaccharide-Based Hydrogel Interfaces for Wound Healing and Tissue Engineering. **Advanced Materials Interfaces**, v. 6, n. 17, p. 1900761, 2019.

ZHUANG, Y. et al. Alginate/graphene double-network nanocomposite hydrogel beads with low-swelling, enhanced mechanical properties, and enhanced adsorption capacity. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 4, n. 28, p. 10885–10892, 2016.

## 11. ANEXOS

### 11.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

#### Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para coleta de sangue

(RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012)

O(a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Estabelecimento de um processo biotecnológico com emprego de manufatura aditiva para produção de biocurativos resultantes da associação de gel de alginato-gelatina com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) definidos morfológicamente a partir de escaneamento de úlceras cutâneas virtuais”, sob a responsabilidade do pesquisador Caetano Pedro Evangelista Ribeiro, RG nº 40.187.532-5. Este termo deverá ser elaborado em duas vias. Depois de lido, rubricado e assinado, uma via ficará em poder do sujeito ou de seu representante legal e a outra via em poder do pesquisador responsável.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências e Letras – UNESP/Câmpus de Assis. Qualquer dúvida quanto aos aspectos éticos poderão ser esclarecidas no telefone (18) 3302-5607 ou pelo e-mail [cep@assis.unesp.br](mailto:cep@assis.unesp.br), ou diretamente com o pesquisador no telefone (18) 3302-5856 ou e-mail [caetano.ribeiro1@gmail.com](mailto:caetano.ribeiro1@gmail.com)

A pesquisa será realizada com o sangue total oriundo de procedimento de coleta por punção venosa, com uso de seringa devidamente esterilizada. O material será utilizado em uma pequena quantidade, necessária para concentração de plaquetas. Neste procedimento, serão obtidas três alíquotas únicas de 10 mL de sangue, volume-base para a obtenção do Plasma Rico em Plaquetas. O sangue coletado será levado para o nosso laboratório, que está qualificado para a separação e isolamento do Plasma Rico em Plaquetas (PRP). As plaquetas obtidas serão concentradas por método de centrifugação e depois serão incorporadas em um hidrogel suporte de alginato-gelatina, para verificação da adesão, compatibilidade e estabilidade em meio a estes componentes. Estas informações são importantes para que, a partir deste estudo, seja possível ou não utilizar estas plaquetas para formulação de um biocurativo que atuará no processo de regeneração de feridas cutâneas utilizando material proveniente do próprio paciente, minimizando assim, os riscos de rejeição imunológica.

O seu médico já esclareceu ao Senhor(a) os riscos e benefícios do procedimento de coleta do sangue. Nós não participaremos desta etapa, apenas utilizaremos o material coletado para estudo científico. Se o(a) Senhor(a) concordar em ceder uma amostra de sangue, não haverá risco nenhum para a sua saúde e integridade física, pois todo o estudo será feito em laboratório, de forma controlada e segura.

Sua identidade será mantida em sigilo pelos pesquisadores, sendo utilizados apenas os dados necessários para esta pesquisa, tais como, faixa etária, condições de saúde, alimentação e quantidade

de elementos presentes no sangue (concentração de plaquetas e leucócitos). Informamos ainda que os resultados deste estudo serão publicados em uma revista científica, mas, repetindo, sua identidade será mantida em sigilo.

O(a) Senhor(a) pode a qualquer momento desistir da doação do material, mesmo depois de ter assinado este termo de consentimento. O(a) Senhor(a) deve estar à vontade para fazer qualquer pergunta sobre este estudo, podendo entrar em contato, a qualquer momento, com o pesquisador responsável cujo nome, telefone e endereço está abaixo colocado:

Pesquisadores responsáveis: Caetano Pedro Evangelista Ribeiro

Fone (14) 998726871

Endereço: Rua Atilio Toloto, 809 – Ourinhos/ SP, CEP: 19914-212

### CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar, como sujeito, da pesquisa “Estabelecimento de um processo biotecnológico com emprego de manufatura aditiva para produção de biocurativos resultantes da associação de gel de alginato-gelatina com Plasma Rico em Plaquetas (PRP) definidos morfológicamente a partir de escaneamento de úlceras cutâneas virtuais”. Fui devidamente informado(a) e esclarecido pelo pesquisador Caetano Pedro Evangelista Ribeiro sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido, ainda, que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Declaro, ainda, que ( ) concordo / ( ) não concordo com a publicação dos resultados desta pesquisa, ciente da garantia quanto ao sigilo das minhas informações pessoais e ao meu anonimato.

Local e data \_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Eu, Caetano Pedro Evangelista Ribeiro, pesquisador responsável pelo estudo, obtive de forma voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do sujeito/representante legal para a participação na pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador