

Produção de estruturas de quitosano e alginato por impressora de extrusão por seringa

Catarina Martins da Paz

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores

Professor Doutor Ivo Manuel Ferreira de Bragança (ISEL)

Professora Doutora Ana Catarina Cardoso de Sousa (ISEL)

Júri

Presidente: Professor Doutor Miguel Minhalma

Vogais: Professor Doutor Tiago Daniel Adriano
Fernandes

Professor Doutor Ivo Manuel Ferreira de
Bragança

Dezembro de 2023

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora Professora Doutora Ana Catarina Sousa, por todo o apoio, ajuda e disponibilidade ao longo deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Doutor Ivo Bragança, pela paciência, ajuda e disponibilidade ao longo destes meses. Por todo o conhecimento partilhado, que foi sem dúvida essencial para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa e Departamento de Engenharia Química pela realização do trabalho experimental no Laboratório de Química Inorgânica, e ao Departamento de Engenharia Mecânica. Agradeço também ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo apoio financeiro através do projeto IPL/2022/3DBioProd_ISEL.

Um agradecimento muito especial à Inês Amaral, que foi essencial para a realização deste trabalho, por todo o conhecimento transmitido no laboratório, por toda a paciência, dedicação e pela sua amizade e companhia em muitos momentos.

Aos meus colegas de laboratório, Luís Correia, Hugo Lapa e Rafaela Cabral, que foram essenciais em muitos momentos em que precisei de ajuda, pela companhia e boa disposição no laboratório.

À minha amiga Inês Ferreira, que foi essencial desde o início do meu percurso académico, pela companhia, amizade, pelo apoio e por todos os momentos que passamos juntas e que vou levar para a vida.

Quero também agradecer à minha amiga Maria Lopes, que mesmo estando longe foi crucial nesta etapa, por me ouvir nos momentos em que precisava de apoio, por toda a amizade e carinho demonstrados.

Aos meus amigos, Diogo Barradas e Inês Chouzende, pela companhia ao longo destes meses, por todos os momentos partilhados que fizeram sempre os meus dias serem melhores, por toda a amizade e ajuda.

Ao meu namorado, Nuno, por estar sempre do meu lado e ser o meu apoio incondicional, por me fazer acreditar sempre em mim e ser sempre a minha companhia em todos os momentos. Por todo o carinho e por todas as palavras, muito obrigada.

E, finalmente, à minha família, principalmente aos meus pais, por terem acreditado sempre em mim. Pelo apoio incondicional, compreensão e carinho que foi fundamental na conclusão desta etapa.

A todos, muito obrigado!

Resumo

A investigação e o desenvolvimento da impressão tridimensional (3D) para aplicações na área da engenharia biomédica tem aumentado significativamente na última década. A impressão 3D permite criar estruturas complexas e personalizadas, adaptadas às características individuais de cada paciente, apresentando benefícios nos tratamentos de diversas condições médicas e reduzindo os custos associados. O desenvolvimento de biomateriais naturais, com propriedades biológicas melhoradas devido à sua biocompatibilidade e não toxicidade, é atualmente uma área em expansão e com um grande potencial de aplicação. Os antioxidantes são substâncias que têm demonstrado a sua capacidade de proteger contra os radicais livres e controlar o stress oxidativo das células. A combinação de biopolímeros com compostos que apresentam uma atividade antioxidante comprovada é particularmente interessante para a produção de pensos para feridas.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a produção de filmes de quitosano e alginato dopados com ácido ascórbico e quercetina, com o objetivo de produzir materiais biocompatíveis, com possíveis propriedades antioxidantes. Os filmes foram produzidos pelo método de *casting* e estudou-se o perfil de libertação dos compostos incorporados. De modo a avaliar a atividade antioxidante dos filmes produzidos foi utilizado o método do DPPH e os resultados demonstraram que a incorporação de quercetina permitiu obter filmes de quitosano e alginato com atividade antioxidante.

Para avaliar a sua utilização em tecnologias de fabrico aditivo, este trabalho envolveu a modelação e criação de um módulo de seringa personalizado para desenvolver uma impressora 3D por extrusão por seringa, de baixo custo, adaptada ao fabrico de estruturas tridimensionais de quitosano e alginato. Foi possível produzir ambas as estruturas, no entanto as estruturas impressas de alginato demonstraram uma qualidade superior comparativamente com as de quitosano.

Palavras-chave: Filmes biocompatíveis; Atividade antioxidante; Impressão 3D; Estruturas tridimensionais; Extrusão por seringa.

Abstract

The research and the development of the three-dimensional (3D) printing for biomedical applications has increased significantly during the last decade. In addition, 3D printing allows the production of complex and personalized structures, adapted to the individual characteristics of each patient, presenting beneficials in the treatments of several medical conditions and reducing the related costs. The development of natural biomaterials with enhanced biological properties, due to their biocompatibility and non-toxicity, is nowadays a growing field with a vast potential. Antioxidants are substances that have shown their capacity for protection against free radicals and control of oxidative stress in cells. The combination of biopolymers with proven antioxidants compounds is particularly interesting to the production of wound dressings.

In this context, the present study reports the production of chitosan and alginate films doped with ascorbic acid and quercetin, to produce biocompatible materials, with possible antioxidant properties. Films were produced by casting method and the release profile of incorporated compounds was studied. To evaluate the antioxidant activity of the produced films, DPPH standard method was used, and the results showed that the incorporation of quercetin allowed to obtain chitosan and alginate films with antioxidant activity.

To evaluate its use in additive manufacturing technologies, this work involved modeling and creating a customized syringe module to develop a low-cost syringe extrusion 3D printer, adapted to the manufacture of three-dimensional chitosan and alginate structures. It was possible to produce both structures, with alginate structures achieved with higher quality than chitosan.

Keywords: Biocompatible films; Antioxidant activity; 3D printing; Three-dimensional structures; Syringe extrusion.

Lista de Abreviaturas

3D	Tridimensional
AA	Ácido Ascórbico
AA%	Percentagem de Atividade Antioxidante
Abs	Absorvância
ALG	Alginato
CAD	Desenho assistido por computador (<i>Computer-Aided Design</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
FDM	Deposição por Material Fundido (<i>Fused Deposition Modeling</i>)
GEL	Gelatina
HA	Hidroxiapatite
MA	Manufatura Aditiva
QTC	Quercetina
QTS	Qitosano
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
STL	<i>Standard Tessellation Language</i>
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	vi
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tabelas	xii
1. Introdução	1
1.1. Impressão 3D	2
1.1.1 Impressão 3D por extrusão por seringa.....	6
1.2. Sistemas de liberação controlada	7
1.3. Materiais para sistemas de liberação controlada	9
1.3.1. Quitosano.....	10
1.3.2. Alginato	11
1.3.3. Gelatina.....	13
1.3.4. Hidroxiapatite	14
1.4. Antioxidantes	15
1.4.1. Ácido Ascórbico.....	16
1.4.2. Quercetina.....	17
2. Materiais e Métodos.....	19
2.1. Reagentes	19
2.1.1. Síntese da hidroxiapatite	19
2.2. Preparação dos filmes	19
2.2.1. Produção dos filmes de quitosano.....	19
2.2.2. Produção dos filmes de alginato.....	20
2.2.3. Produção dos filmes de quitosano e hidroxiapatite	20
2.2.4. Produção dos filmes de alginato e hidroxiapatite	20
2.3. Avaliação da atividade antioxidante	21
2.3.1. Avaliação dos compostos antioxidantes.....	21

2.3.2.	Avaliação da atividade antioxidante dos filmes.....	22
2.4.	Espectrofotometria Ultravioleta-Visível	22
2.4.2.	Ensaio de liberação controlada.....	23
2.5.	Microscopia ótica.....	23
2.6.	Desenvolvimento e otimização de uma impressora 3D por extrusão por seringa.....	23
2.6.2.	Projeção do módulo de seringa no SolidWorks.....	24
2.6.3.	Otimização da impressora 3D e dos parâmetros de impressão	30
2.7.	Preparação das misturas para impressão 3D	32
2.7.2.	Produção da mistura de alginato e gelatina	32
2.7.3.	Produção da mistura de quitosano e gelatina	32
2.7.4.	Processo de <i>Crosslinking</i>	33
2.8.	Impressão das peças 3D	33
3.	Resultados e Discussão.....	36
3.1.	Preparação e caracterização dos filmes.....	36
3.1.1.	Filmes de quitosano	36
3.1.2.	Filmes de alginato	37
3.1.3.	Filmes de quitosano e hidroxiapatite	37
3.1.4.	Filmes de alginato e hidroxiapatite.....	38
3.2.	Avaliação da atividade antioxidante.....	39
3.2.1.	Compostos em estudo.....	39
3.2.2.	Filmes de quitosano	39
3.2.3.	Filmes de alginato	41
3.2.4.	Análise comparativa dos resultados dos ensaios antioxidantes.....	43
3.3.	Análise morfológica por microscopia ótica	43
3.3.1.	Filmes de quitosano	44
3.3.2.	Filmes de alginato	44
3.4.	Ensaio de liberação controlada	45
3.4.1.	Filmes de quitosano	46
3.4.2.	Filmes de alginato	47

3.4.3. Análise conjunta dos resultados de libertação	48
3.5. Produção de peças 3D	49
3.5.1. Validação e arranque em funcionamento da impressora por extrusão por seringa.....	49
3.5.2. Impressão e peças 3D obtidas	51
4. Conclusões e perspetivas futuras	56
5. Referências Bibliográficas.....	60
Anexos	68
Anexo 1. Desenho técnico do módulo de seringa.....	68

Índice de Figuras

Figura 1- Principais diferenças entre o método convencional e a técnica de manufatura aditiva na produção de medicamentos. Adaptado (Beg et al., 2020).	5
Figura 2- Impressão 3D por extrusão por seringa. Adaptado (Hussain et al., 2022)..	7
Figura 3- Comparação das variações de concentração de um fármaco no plasma num sistema de libertação convencional e num sistema de libertação controlada. Adaptado (Huynh & Lee, 2015).....	8
Figura 4- Estrutura química da quitina e do quitosano. Adaptado (Abd El-Hack et al., 2020).....	11
Figura 5- Estrutura química do alginato e dos seus constituintes β -1,4D-manuronato e α -1,4L-guluronato. Adaptado (Chaturvedi et al., 2019).	12
Figura 6- Estrutura química da gelatina. Adaptado (Li et al., 2014).	13
Figura 7- Estrutura cristalina da HA (Fiume et al., 2021).	14
Figura 8- Estrutura química do ácido ascórbico.....	17
Figura 9- Degradação do ácido L-ascórbico em ácido desidroascórbico e ácido 2,3-dicetogulónico. Adaptado (Yin et al., 2022).	17
Figura 10- Estrutura química da quercetina.....	18
Figura 11- Mecanismo de reação do DPPH.	21
Figura 12- Impressora 3D Anet A8 (Anet 3D Printer, 2023).....	24
Figura 13- Modelação do módulo de seringa no SolidWorks.....	25
Figura 14- Fonte de inspiração para o módulo de extrusão por seringa (Ulises Gordillo Zapana, 2020).....	25
Figura 15- Peça de base do módulo de seringa.	26
Figura 16- Peça de movimentação na guia do módulo de seringa.	27
Figura 17- Cilindro de suporte inferior da seringa.....	27
Figura 18- Componentes adicionais para o módulo de seringa. A) Acoplador; B) Seringa; C) Fuso; D) Rosca; e E) Guia.....	28
Figura 19- Conjunto montado do módulo de seringa e principais componentes; A) Peça de base; B) Peça de movimentação na guia e C) Cilindro de suporte inferior da seringa.	29
Figura 20- Fresadora usada no corte da rosca.....	30
Figura 21- Interface do software Repetier-Host.	34
Figura 22- Modelo do paralelepípedo de 24x24x5 mm A) criado no SolidWorks e B) Preparado no Ultimaker Cura para impressão.....	34
Figura 23- Modelo do paralelepípedo de 60x60x2 mm A) criado no SolidWorks e B) Preparado no Ultimaker Cura para impressão.....	35

Figura 24- Filmes de A) QTS; B) QTS-QCT e C) QTS-AA.....	37
Figura 25- Filmes de A) ALG; B) ALG-QCT e C) ALG-AA.....	37
Figura 26- Filmes de A) QTS:HA; B) QTS:HA-QCT; C) QTS:HA-AA	38
Figura 27- Filmes de A) ALG:HA; B) ALG:HA-QCT; C) ALG:HA-AA.....	38
Figura 28- AA% do filme controlo (QTS) e dos filmes dopados (QTS-QCT e QTS-AA), após 1 h de reação no ensaio DPPH.....	40
Figura 29- AA% do filme controlo (QTS:HA) e dos filmes dopados (QTS:HA-QCT e QTS:HA-AA), após 1 h de reação no ensaio DPPH.	40
Figura 30- AA% do filme controlo (ALG) e dos filmes dopados (ALG-QCT e ALG-AA), após 1 h de reação no ensaio DPPH.....	42
Figura 31- AA% do filme controlo (ALG:HA) e dos filmes dopados (ALG:HA-QCT e ALG:HA-AA), após 1 h de reação no ensaio DPPH.....	42
Figura 32- Imagens microscópicas dos filmes de QTS com uma ampliação de 100x; A) QTS; B) QTS-QCT; C) QTS-AA; D) QTS:HA; E) QTS:HA-QCT e F) QTS:HA-AA.	44
Figura 33- Imagens microscópicas dos filmes de ALG com uma ampliação de 100x; A) ALG; B) ALG-QCT; C) ALG-AA; D) ALG:HA; E) ALG:HA-QCT e F) ALG:HA-AA.	45
Figura 34- Espectros de UV-vis (em etanol) dos compostos utilizados; A) QCT ($3,97 \times 10^{-5}$ mol/L); B) AA ($7,5 \times 10^{-5}$ mol/L).....	45
Figura 35- Perfis de libertação dos filmes QTS-QCT, QTS-AA, QTS:HA-QCT e QTS:HA-AA, em função do tempo.....	46
Figura 36- Perfis de libertação dos filmes ALG-QCT, ALG-AA, ALG:HA-QCT e ALG:HA-AA, em função do tempo.....	47
Figura 37- Peças impressas.....	50
Figura 38- Módulo de seringa montado na impressora.....	50
Figura 39- Peça de teste com a mistura de ALG e GEL.....	51
Figura 40- Peça de teste após 2 h de imersão na solução de CaCl_2 100 mM.	52
Figura 41- <i>Scaffold</i> de ALG e GEL impresso com $v=30$ mm/s e padrão de enchimento <i>lines</i> A) antes e B) depois da imersão na solução de CaCl_2 500 mM.	52
Figura 42- Impressão do <i>scaffold</i> de ALG e GEL com agulha, padrão de enchimento <i>lines</i> e $v=30$ mm/s.	53
Figura 43- <i>Scaffold</i> obtido de ALG e GEL, após <i>crosslinking</i> em solução de CaCl_2 500 mM, com $v=15$ mm/s.	53
Figura 44- <i>Scaffold</i> de ALG e GEL impresso com $v=10$ mm/s e padrão <i>grid</i> A) antes e B) depois da imersão na solução de CaCl_2 500 mM.....	54
Figura 45- Impressão do <i>scaffold</i> de QTS e GEL com agulha, padrão de enchimento <i>grid</i> e $v=15$ mm/s.....	54

Índice de Tabelas

Tabela 1- Parâmetros de impressão utilizados.	32
Tabela 2- Filmes poliméricos produzidos.	36
Tabela 3- Atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH dos compostos QCT e AA, expressa em valores de EC ₅₀ (µg/mL).	39
Tabela 4- Resultados dos ensaios antioxidantes, dos filmes de QTS e QTS:HA, ao final de 1 h.	40
Tabela 5- Resultados dos ensaios antioxidantes, dos filmes de ALG e ALG:HA, ao final de 1 h.	42
Tabela 6- Resultados da liberação, em etanol, dos filmes de QTS, após 4 h, 24 h e 48 h.	46
Tabela 7- Resultados da liberação, em etanol, dos filmes de ALG, após 4 h, 24 h e 48 h.	48

1. Introdução

A impressão tridimensional (3D) foi desenvolvida pela primeira vez há cerca de três décadas, e a sua utilização na área da saúde tem apresentado um crescimento contínuo, exibindo diversas vantagens devido à sua elevada flexibilidade para personalizar diferentes formas geométricas e tamanhos, bem como um baixo custo de produção. Assim, esta tem-se tornado uma técnica muito valiosa e inovadora para aplicações biomédicas, desde a concepção e fabrico de diversos sistemas de administração de fármacos, para aplicações terapêuticas, até ao desenvolvimento de tecidos e órgãos artificiais (Beg et al., 2020).

Nesse contexto, os sistemas de libertação controlada de fármacos têm desempenhado um papel fundamental na melhoria da eficácia terapêutica, pois permitem que os medicamentos sejam administrados de forma prolongada e controlada, aumentando a segurança do tratamento, maximizando os benefícios terapêuticos e reduzindo os efeitos colaterais indesejados (Bruschi, 2015). Para tal, os materiais híbridos apresentam uma alternativa promissora para o desenvolvimento destes sistemas, possuindo normalmente uma matriz polimérica, destacando-se o alginato (ALG) e o quitosano (QTS) como polímeros amplamente investigados, devido às suas propriedades únicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo, disponibilidade e segurança (Hegde et al., 2022; Kaur et al., 2023).

De acordo com Yeo et al. (2021), os antioxidantes têm atraído muito interesse na área farmacêutica, devido à capacidade de reduzir o stress oxidativo e proteger as células dos danos causados pelos radicais livres. A incorporação de antioxidantes em matrizes poliméricas permite uma melhoria da estabilidade e da biodisponibilidade do antioxidante e a criação de sistemas de entrega de fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias. Antioxidantes naturais, tais como a quercetina (QCT), pertencente à classe dos flavonóides, e o ácido ascórbico (AA), mais conhecido como vitamina C, são antioxidantes que foram sujeitos a diversos testes clínicos e demonstraram a sua capacidade de eliminação de radicais, bem como propriedades anticancerígenas e antibacterianas (Yeo et al., 2021).

A impressão 3D por extrusão por seringa é uma técnica muito promissora para avanços na administração de medicamentos e aplicações biomédicas, devido à sua versatilidade, precisão e capacidade de produzir estruturas em camadas. Esta tecnologia permite a produção de sistemas de entrega de fármacos complexos e personalizados, controlando com precisão a dosagem de substâncias ativas para a produção de comprimidos personalizados para cada indivíduo. Esta oferece diversas vantagens em comparação com

outras técnicas de impressão, como uma ampla disponibilidade de materiais e a capacidade de impressão à temperatura ambiente. Além disso, o uso de seringas descartáveis oferece muitos benefícios em relação ao cumprimento de requisitos de qualidade para produtos farmacêuticos. A característica mais importante deste processo é a extrusão do material, pois este pode estar na forma sólida com um ponto de fusão relativamente baixo ou em estado semi-sólido, como um gel. Desta forma, esse material é colocado numa seringa e, durante o processo de impressão, é extrudido através de um bico e depositado camada por camada para formar a estrutura desejada (Borandeh et al., 2021; Seoane-Viaño et al., 2021). Adicionalmente, os *scaffolds* de hidrogel são estruturas que fornecem um ambiente de crescimento celular e regeneração de tecidos e que também podem ser impressos em 3D (Jiang et al., 2020).

1.1. Impressão 3D

A impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva (MA) ou fabrico aditivo (FA), é um processo que permite a criação de objetos camada por camada. O conceito de impressão 3D teve origem no início dos anos 70, quando Pierre A. L. Ciraud desenvolveu uma técnica em que se aplicava material em pó e depois solidificava-se cada camada através da ação de um raio de alta energia. Mais tarde, no início dos anos 80, Carl Deckard criou uma técnica de solidificação de pós utilizando um raio laser, ficando conhecida como sinterização selectiva por laser (SLS). Ainda nos anos 80, a primeira invenção comercialmente bem-sucedida foi de Chuck Hull, denominada por estereolitografia (SLA), e baseava-se na fotopolimerização de resina líquida induzida por luz ultravioleta (UV) (Jamróz et al., 2018; A. Su & Al'Aref, 2018).

O processo de impressão 3D inclui diversas etapas, começando pela modelação digital do objeto pretendido, geralmente através de um software CAD (*Computer-Aided Design*). De seguida, o modelo 3D é exportado para um formato adequado para a impressão 3D, como o formato STL (*Standard Tessellation Language*), que contém informações sobre a geometria do objeto, como as suas dimensões e formas, e que vai ser processado num software “*slicer*”, convertendo o modelo 3D numa série de camadas e produzindo um ficheiro de código G contendo instruções para a impressora. Antes de se iniciar a impressão, a impressora 3D deve ser adequadamente otimizada, escolhendo o tipo de material a ser utilizado e a configuração dos parâmetros de impressão, como temperatura e velocidade. Por fim, a impressora 3D recebe o arquivo digitalizado do objeto e começa a imprimir o modelo camada por camada (Gokhare et al., 2017; Jamróz et al., 2018).

Hoje em dia, existe uma ampla gama de tecnologias de impressão 3D disponíveis no mercado, que oferecem métodos eficientes para a produção de objetos físicos em três dimensões. Cada tecnologia possui as suas próprias características e capacidades, oferecendo opções versáteis para o fabrico desses objetos. Com as inovações nesta área, a impressão vai muito para além de materiais termoplásticos, pois atualmente já é possível imprimir uma grande variedade de materiais, incluindo metais, cerâmicos, resinas fotossensíveis e até materiais biológicos, como células e tecidos vivos (Chia & Wu, 2015; Lai et al., 2021).

Assim, surgiu a necessidade de classificar as diferentes técnicas utilizadas, e a *American Society for Testing and Materials* (ASTM) definiu uma nomenclatura para os processos de manufatura aditiva que classifica estas tecnologias em sete categorias: *Vat Photopolymerization* (VP), *Powder Bed Fusion* (PBF), *Material Extrusion* (ME), *Material Jetting* (MJ), *Binder Jetting* (BJ), *Sheet Lamination* (SL) e *Directed Energy Deposition* (DED) (Bandyopadhyay et al., 2015; Zhang et al., 2018). Entre as tecnologias disponíveis, as mais utilizadas na área médica são a SLA, SLS, deposição por material fundido (FDM) e bioimpressão (Chia & Wu, 2015; Lai et al., 2021). Além disso, para que a impressão 3D seja bem sucedida e fiável, devem existir normas que garantam a eficácia, segurança e qualidade dos produtos e processos. Nesse contexto, destaca-se a norma ASTM F2792-12a, intitulada "*Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies*", a qual permitiu estabelecer uma terminologia comum para descrever os termos e conceitos específicos relacionados ao fabrico aditivo (ASTM International, 2012).

A SLA é um tipo específico de tecnologia de VP, sendo muito utilizada na área da biomédica devido à sua alta resolução e capacidade de produzir pequenos detalhes. Neste tipo de impressão, é utilizada uma fonte UV capaz de solidificar uma resina fotossensível. Depois de cada camada estar curada, a plataforma com a estrutura curada desce e outra camada de resina líquida não curada espalha-se por cima e, assim sucessivamente, até se formar o objeto final pretendido (Chia & Wu, 2015; Lai et al., 2021).

Em relação à categoria PBF, a SLS é o processo mais comum e tem a capacidade de imprimir objetos com geometrias complexas, permitindo a utilização de uma variedade de materiais, incluindo polímeros termoplásticos, metais e até mesmo cerâmicas. Através da irradiação de um pó por um laser de alta potência este funde-se, a plataforma baixa e deposita-se uma nova camada fina e fresca de pó sobre o material anterior, camada a camada, até se obter o objeto final (Borandeh et al., 2021)

A FDM, um dos métodos mais comuns na tecnologia de ME, foi descrita pela primeira vez por Scott Crump em 1989 e tornou-se uma técnica muito utilizada devido à sua

acessibilidade, versatilidade e facilidade de uso. A disponibilidade de diversos materiais termoplásticos, como ácido polilático (PLA), acrilonitrila butadieno estireno (ABS), tereftalato de polietileno glicol (PETG), entre outros, permite a produção de objetos com diferentes propriedades mecânicas, estéticas e funcionais. Neste processo, o filamento feito de material termoplástico é aquecido pela impressora 3D até que atinja o seu ponto de fusão. À medida que a cabeça de impressão se desloca horizontalmente nos eixos X e Y, o material é extrudido através de um bico e vai solidificando em contacto com a plataforma de impressão, que desce gradualmente permitindo que a próxima camada seja depositada. Este processo de deposição de camadas é repetido até que o objeto seja totalmente construído (Chia & Wu, 2015; A. Su & Al'Aref, 2018).

Na área da saúde, a bioimpressão tem-se mostrado uma técnica muito inovadora e revolucionária. O seu conceito foi apresentado pela primeira vez numa conferência internacional em 2004, e, desde então, tem despertado uma atenção significativa devido ao seu enorme potencial na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos. O seu principal objetivo foca-se no fabrico de estruturas tridimensionais utilizando células vivas, o que permite a criação de tecidos e órgãos funcionais personalizados. Atualmente, os biomateriais mais comumente utilizados na bioimpressão 3D são os hidrogéis de, por exemplo, alginato, gelatina e colágeno. Durante o processo de bioimpressão, o material é depositado num fio longo e contínuo ou em pontos individuais através de um bocal ou seringa, criando formas tridimensionais desejadas feitas de cerâmica, polímeros ou hidrogéis. É importante destacar que a bioimpressão pode ser efetuada à temperatura ambiente ou a temperaturas elevadas, dependendo dos materiais utilizados e das propriedades desejadas, mas não envolve o uso de termoplásticos, como no caso da FDM. Embora a bioimpressão 3D esteja em constante evolução e enfrente diversos desafios, tem demonstrado resultados muito promissores (Chia & Wu, 2015; Fang et al., 2022; Lai et al., 2021).

Os métodos de impressão 3D têm ganho muita importância no campo das aplicações farmacêuticas e médicas devido às suas vantagens, pois possibilitam o fabrico rápido de objetos complexos e personalizados a cada indivíduo com materiais biocompatíveis, que podem ser aplicados em terapia ou medicina personalizada, bem como uma redução do desperdício, daí ser uma técnica “amiga do ambiente”. Alguns dispositivos médicos impressos em 3D atualmente são: curativos de feridas, implantes, próteses, fantomas e guias cirúrgicos. Apesar de todos os benefícios, a MA ainda enfrenta uma série de desafios relacionados com o controlo dos parâmetros de conceção e desempenho do dispositivo (Jamróz et al., 2018).

A introdução da impressão 3D na indústria farmacêutica centra-se no desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos para uma melhor terapia focada nas necessidades

individuais de cada doente, concebendo medicamentos personalizados de forma a selecionar a dose adequada no momento adequado tendo em consideração muitos fatores, como a genética, o género, a idade e o peso, resultando assim num maior benefício possível no tratamento e nas respostas farmacocinéticas e farmacodinâmicas desejadas. A impressão 3D pode ser utilizada para o tratamento de várias doenças, como Alzheimer e cancro, bem como em pacientes pediátricos e geriátricos, e, em comparação com as técnicas de fabrico convencionais, esta permite fabricar várias formas de dosagem com uma elevada precisão da relação entre o princípio ativo (API) e excipientes. Na Figura 1 podem ser observadas as principais etapas e diferenças de produção entre os dois métodos (Beg et al., 2020; Park et al., 2018).



Figura 1- Principais diferenças entre o método convencional e a técnica de manufatura aditiva na produção de medicamentos. Adaptado (Beg et al., 2020).

1.1.1 Impressão 3D por extrusão por seringa

A impressão 3D por extrusão é uma técnica com destaque em diversas áreas, como na indústria alimentar, automobilística, arquitetura, moda, farmacêutica e biomédica, devido à sua flexibilidade, facilidade de uso e capacidade de produzir objetos com geometrias complexas (Hussain et al., 2022). Essa técnica permite criar objetos tridimensionais camada por camada, através da extrusão controlada de materiais específicos (Placone & Engler, 2018).

Os materiais utilizados na impressão são muito importantes, específicos do método utilizado e influenciam o desempenho dos produtos finais. Diversos tipos de polímeros, incluindo termoplásticos, termoendurecíveis, elastómeros, hidrogéis, polímeros funcionais, misturas de polímeros e compósitos podem ser usados na impressão 3D por extrusão, sendo os mais utilizados na área biomédica baseados em polímeros naturais, como o quitosano, o ácido hialurônico, o colágeno e o alginato de sódio (Jiang et al., 2020).

Na área biomédica e farmacêutica, a impressão 3D por extrusão por seringa tem-se destacado como uma técnica inovadora ao permitir o fabrico de estruturas utilizando hidrogéis. Esta técnica consiste num sistema composto por uma seringa que irá extrudir o material através de um bocal ou agulha, controlado por uma força mecânica, ao depositá-lo camada por camada (Figura 2). Para uma extrusão ideal, é necessário que o material tenha uma alta viscosidade semelhante a um gel, mas que essa viscosidade diminua quando uma força é aplicada e este é “forçado” a sair da seringa e, quando esta força é interrompida, o material deve recuperar a sua viscosidade, garantido uma deposição precisa e controlada (Jiang et al., 2020; Olmos-Juste et al., 2021). Após a conclusão do processo de impressão, o *crosslinking* é essencial para estabilizar e fortalecer as estruturas impressas, garantindo que o material permaneça no lugar e mantenha a forma desejada. A reticulação iónica é uma das técnicas mais utilizadas e serve para criar ligações cruzadas entre os grupos carboxílicos do biopolímero, onde são utilizados iões bivalentes, sendo os iões Ca^{2+} os mais adequados para fins biomédicos e farmacêuticos, que vão proporcionar uma rede estável semelhante a um gel, o que permite obter estruturas sólidas e bem definidas (Olmos-Juste et al., 2021; Placone & Engler, 2018).

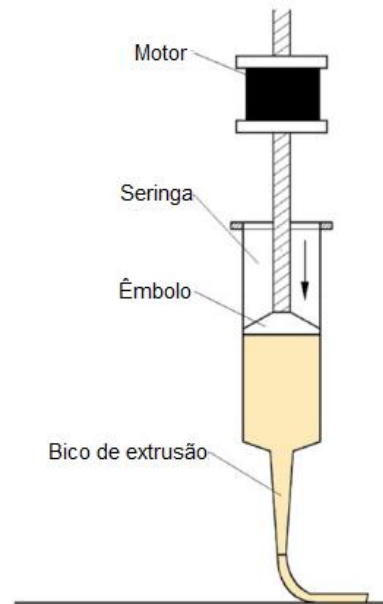


Figura 2- Impressão 3D por extrusão por seringa. Adaptado (Hussain et al., 2022).

Hidrogéis são materiais poliméricos tridimensionais com alta capacidade de absorção de água, semelhantes a uma matriz gelatinosa. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de interagir com células e tecidos, os hidrogéis têm diversas aplicações na engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Nesse contexto, os *scaffolds* de hidrogel são estruturas 3D que podem ser impressas por extrusão por seringa e desempenham um papel de suporte para o crescimento celular e regeneração de tecidos. Ao proporcionar um ambiente semelhante à matriz extracelular, estes permitem a adesão das células, bem como a sua diferenciação e proliferação, tornando-os aplicáveis para tratamentos de feridas, cicatrização de tecidos e regeneração óssea (Chen et al., 2023; Jiang et al., 2020). Além disso, uma das aplicações mais relevantes desta tecnologia de impressão 3D é o fabrico de sistemas de libertação personalizados e inovadores, adaptados às necessidades específicas de cada doente. Através da impressão 3D, é possível obter um controlo preciso da geometria da estrutura, o que pode influenciar a taxa de libertação e a eficácia do fármaco, resultando numa melhoria da eficácia no local-avo e reduzindo o número de administrações necessárias ao longo de um tratamento (Seoane-Viaño et al., 2021).

1.2. Sistemas de libertação controlada

Os sistemas de libertação de fármacos convencionais incluem comprimidos, cápsulas, xaropes, pomadas e são definidos como formulações farmacêuticas que libertam o fármaco de forma imediata e rápida. Estes podem causar concentrações no plasma muito elevadas logo após a sua administração, seguidas de uma rápida redução, levando a efeitos

secundários indesejáveis e uma possível redução da eficácia do tratamento. Concentrações elevadas acima da faixa terapêutica podem ser tóxicas, enquanto concentrações subterapêuticas são ineficazes e podem causar resistência ao fármaco (Adepu & Ramakrishna, 2021).

De forma a superar estas limitações, têm sido desenvolvidos sistemas de libertação controlada, que permitem a introdução de substâncias químicas, medicamentos, compostos biológicos ou outras substâncias ativas no corpo, regulando a taxa, o tempo e o local de libertação dos mesmos, aumentando a eficácia e segurança. A entrega controlada de fármacos permite aumentar a sua solubilidade e estabilidade, oferecendo uma taxa e mecanismo previsível para órgãos/tecidos/células específicos, de acordo com as necessidades terapêuticas de cada paciente, bem como reduzir a necessidade de doses frequentes e minimizar a ocorrência de efeitos secundários, mantendo os níveis do fármaco na faixa terapêutica por tempo prolongado (Adepu & Ramakrishna, 2021). Na Figura 3 estão representadas as curvas farmacocinéticas da concentração de um fármaco no plasma ao longo do tempo, onde se podem observar as diferenças entre os dois tipos de sistemas (Huynh & Lee, 2015).

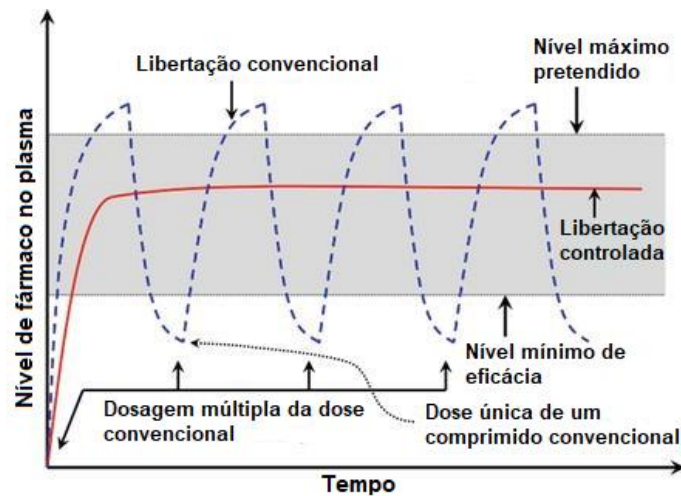


Figura 3- Comparação das variações de concentração de um fármaco no plasma num sistema de libertação convencional e num sistema de libertação controlada. Adaptado (Huynh & Lee, 2015).

Nos últimos anos, tem havido um aumento significativo no desenvolvimento de sistemas poliméricos de administração de fármacos baseados em polímeros naturais e sintéticos, permitindo aumentar a adesão dos doentes, bem como a segurança e a eficácia dos mesmos (Borandeh et al., 2021). Devido às suas vantagens, que incluem a capacidade de ajustar as suas propriedades químicas, físicas e mecânicas, bem como a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, os polímeros são essenciais para o desenvolvimento destes sistemas. Podem ser utilizados para formular matrizes ou

micro/nanopartículas que podem encapsular tanto fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos (Borandeh et al., 2021; Paolini et al., 2019).

Existem três tipos de sistemas de libertação controlada baseados em polímeros, sendo que a escolha do mecanismo mais adequado dependerá das características do fármaco utilizado, do local de ação desejado e dos objetivos terapêuticos. O primeiro engloba os sistemas de difusão onde o fármaco é dissolvido ou disperso numa matriz polimérica, intumescível ou não intumescível, que não se degrada durante o seu período terapêutico. O segundo tipo é representado pelos sistemas ativados por solventes, em que os fármacos são incorporados em hidrogéis, que incham e os libertam. Por fim, o terceiro tipo compreende os sistemas biodegradáveis, nos quais a libertação do fármaco é obtida através da degradação do polímero ao longo do tempo, pois este absorve o solvente aquoso circundante e interage com a água através de interações de carga ou mecanismos de ligação de hidrogénio (Liechty et al., 2010; Srivastava et al., 2016).

1.3. Materiais para sistemas de libertação controlada

De maneira a alcançar a eficácia, segurança e desempenho dos sistemas de libertação controlada, é essencial selecionar cuidadosamente os materiais utilizados, que irão depender das características físicas do princípio ativo e da necessidade de cada tratamento. O desenvolvimento de biomateriais para estes sistemas deve incluir diversas vantagens, como o encapsulamento do fármaco, a sua estabilidade, uma taxa de libertação previsível no período terapêutico, biocompatibilidade e não toxicidade e, por fim, o seu custo de síntese/produção (Adeosun et al., 2020).

Assim, os materiais híbridos surgiram com o objetivo de obter um desempenho melhorado em termos de propriedades de libertação dos compostos ativos. Estes podem ser descritos pela combinação de dois ou mais materiais diferentes, com propriedades e estruturas distintas, que são combinadas numa única estrutura (Hsissou et al., 2021; Rajak et al., 2019). Existem diferentes tipos de matrizes aplicadas no desenvolvimento destes materiais, incluindo as matrizes poliméricas. A aplicação de materiais poliméricos para fins médicos encontra-se em constante evolução e estes têm sido utilizados para sistemas de administração de fármacos, produção de *scaffolds* em engenharia de tecidos, produção de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses e implantes para oftalmologia e odontologia (Gandhi et al., 2012).

Um polímero pode ser definido como uma macromolécula composta por uma longa cadeia de várias unidades repetidas, denominadas monómeros. Os polímeros biodegradáveis

apresentam diversas vantagens, devido à sua inexistente ou baixa toxicidade e biocompatibilidade com tecidos e células biológicas. Estes podem ser classificados como naturais ou sintéticos (Deb et al., 2019).

Os polímeros sintéticos são obtidos a partir de reações de polimerização de monómeros extraídos do petróleo. Apresentam uma boa resistência mecânica, durabilidade e possibilidade de controlo das suas propriedades e são, por exemplo, o álcool polivinílico, polipropileno, polietileno, entre outros (Bhatia, 2016; Deb et al., 2019).

Os polímeros naturais são obtidos a partir de monómeros extraídos de fontes naturais e incluem proteínas e polissacarídeos e são denominados de “biopolímeros”. As suas principais vantagens são a elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, disponibilidade e baixo custo. Exemplos destes são o quitosano, a celulose e o alginato (Deb et al., 2019; Villanova et al., 2010).

1.3.1. Quitosano

O QTS é um polímero natural, que pode ser obtido através da desacetilação alcalina ou enzimática da quitina presente no exoesqueleto de crustáceos, como caranguejos e camarões, bem como em algumas espécies de insetos, artópodes e na parede celular de fungos (Figura 4) (Abd El-Hack et al., 2020). É um polissacarídeo linear constituído por D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, unidos por ligações glicosídicas β -1,4. É considerado um biopolímero muito versátil, pois possui aplicações em diversas áreas, incluindo medicina, agricultura e nas indústrias alimentar, cosmética, têxtil e do papel (Abourehab et al., 2022).

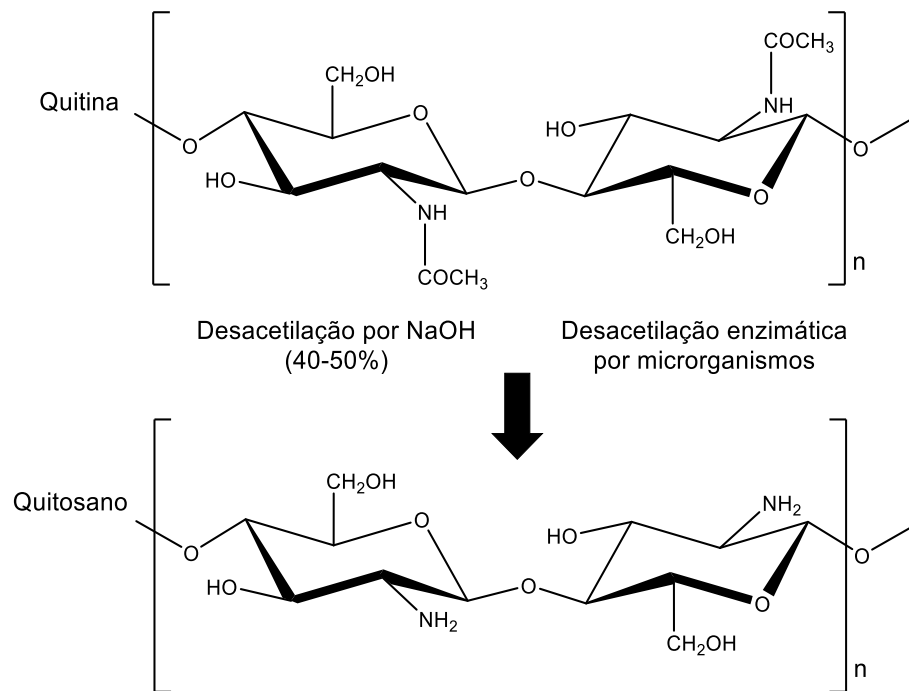


Figura 4- Estrutura química da quitina e do quitosano. Adaptado (Abd El-Hack et al., 2020)

A sua solubilidade depende do grau de desacetilação sendo geralmente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. No entanto, é solúvel em vários meios ácidos aquosos, incluindo ácido acético, ácido fórmico e ácido cítrico (Abourehab et al., 2022). Na área da medicina, tem sido alvo de diversos estudos nos últimos anos, devido às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas, o que o torna muito promissor para o desenvolvimento de novos antibióticos e para curativos de feridas, devido à sua capacidade de promover a cicatrização e reduzir a inflamação. Além disto, também apresenta propriedades antitumorais e antioxidantes (Patrúlea et al., 2015; Zhao et al., 2018).

Na área da biomédica tem sido aplicado em estudos de libertação de fármacos, produção de *scaffolds* para engenharia de tecidos, membranas renais artificiais e terapia genética. Devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e inexistente ou baixa toxicidade, o QTS e os seus derivados são considerados sistemas eficazes e seguros de libertação de fármacos, protegendo-os contra a degradação e permitindo a libertação lenta e controlada. Diferentes sistemas de transporte polimérico, por exemplo, matrizes, filmes, hidrogéis, microesferas, nanopartículas, cápsulas, micelas e *scaffolds* têm sido investigados (Abd El-Hack et al., 2020; Othman et al., 2021; Xia et al., 2022).

1.3.2. Alginato

O ALG é um polissacarídeo natural encontrado em algas marinhas castanhas, como *Ascophyllum*, *Macrocystis* e *Laminaria* e em cápsulas das bactérias *Azotobacter* e

Nesse contexto, os hidrogéis à base de GEL estão a ser amplamente utilizados devido às suas propriedades únicas, como a gelificação, estabilização e texturização (Rashid et al., 2019). Além disso, são capazes de promover a adesão e a proliferação celular, e podem ser utilizados na cicatrização de feridas devido às suas propriedades de absorção de fluidos. De acordo com a literatura, quando a GEL é utilizada como componente de um *scaffold*, melhora significativamente a infiltração, a adesão, e a proliferação das células e a introdução de biopolímeros naturais nestes *scaffolds* tem um efeito benéfico nos sinais de reconhecimento biológico (Jaipan et al., 2017; Sethi & Kaith, 2022; K. Su & Wang, 2015).

1.3.4. Hidroxiapatite

A hidroxiapatite (HA), $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6](\text{OH})_2$, é um mineral composto principalmente por fosfato de cálcio e iões hidróxido e tem uma composição e estrutura química semelhante aos constituintes inorgânicos dos ossos e dos dentes (Hussin et al., 2022; Fiume et al., 2021). Como apresentado na Figura 7, esta é caracterizada por uma estrutura cristalina bastante complexa, do tipo hexagonal que consiste em iões fosfato (PO_4^{3-}), iões hidróxido (OH^-) e iões cálcio (Ca^{2+}) (Fiume et al., 2021).

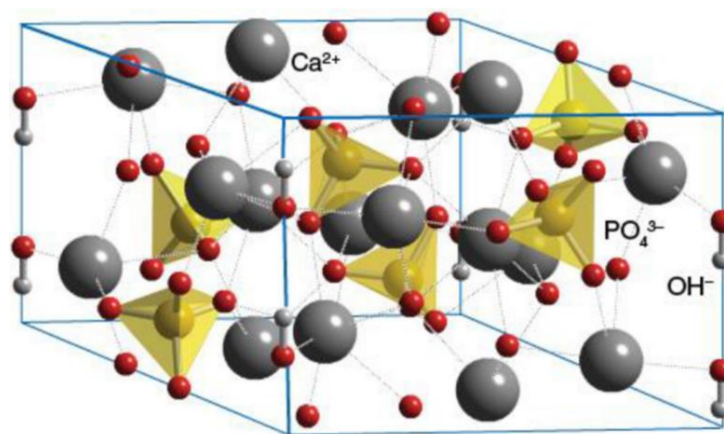


Figura 7- Estrutura cristalina da HA (Fiume et al., 2021).

Existem diversos métodos de síntese da HA, como o método hidrotérmico, reações de estado sólido, processo sol-gel, emulsão, microemulsão e, sobretudo, precipitação química, ou mesmo a extração a partir de recursos naturais, por exemplo ossos de peixe, conchas do mar, cascas de ovos, ossos de bovinos e cascas de camarão. A técnica escolhida deve ser adaptada de acordo com a aplicação final e as propriedades desejadas do material (Hussin et al., 2022; Fiume et al., 2021; Szcześ et al., 2017).

Assim, este composto tem desempenhado um papel crucial no desenvolvimento de biomateriais para diversas aplicações biomédicas, devido às suas vantagens como

bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixo custo, não toxicidade, resistência mecânica e estrutura porosa (Hussin et al., 2022; Szcześ et al., 2017). Para além disso, também apresenta propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteointegrativas (Szcześ et al., 2017).

Devido às propriedades referidas, a HA é amplamente utilizada na regeneração óssea, preenchimento ósseo, reparação de fraturas ósseas, engenharia de tecidos, odontologia e sistemas de administração de fármacos (Fiume et al., 2021; Szcześ et al., 2017). É considerada um material com muito potencial para suporte em aplicações de engenharia do tecido ósseo, pois atua como um excelente substrato que facilita o crescimento, a proliferação e a diferenciação de células. Além disso, a sua estrutura porosa faz com que esta atue como uma matriz para a incorporação e libertação de substâncias bioativas, de forma controlada ao longo do tempo, possuindo uma degradação lenta, permitindo que a libertação do fármaco ocorra ao longo de semanas ou até meses na área afetada (Lin & Chang, 2015; Szcześ et al., 2017).

1.4. Antioxidantes

Antioxidantes podem ser descritos como um grupo de compostos que protege as células contra os danos causados pelos radicais livres e pelas espécies reativas de oxigénio (EROs) (Zehiroglu & Ozturk Sarikaya, 2019). Desempenham um papel fundamental na proteção das células e tecidos contra o stress oxidativo, que ocorre quando existe um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes no organismo. Os radicais livres são espécies altamente instáveis e reativas que podem levar a danos celulares e à ocorrência de diversas doenças, como cancro, doenças crónicas, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas, diabetes e envelhecimento (Sindhi et al., 2013; Yeung et al., 2019; Zehiroglu & Ozturk Sarikaya, 2019).

Alguns antioxidantes são naturalmente produzidos pelo corpo, ao contrário de outros que devem ser obtidos através da alimentação, especialmente através de frutas e vegetais como laranjas, limões, mirtilos, morangos, ameixas, brócolos, tomates, espinafres e leguminosas. Estes são chamados de antioxidantes naturais porque ocorrem naturalmente nos alimentos e entre os mais importantes podem ser destacados o ácido ascórbico e os flavonóides, que desempenham um papel crucial em diversos processos biológicos com potenciais efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e anticarcinogénicos (Sindhi et al., 2013; Yeung et al., 2019; Zehiroglu & Ozturk Sarikaya, 2019).

Neste sentido, o desenvolvimento de biomateriais com propriedades antioxidantes tem sido alvo de estudo para o desenvolvimento de produtos nas áreas alimentar, biomédica, química, cosmética e farmacêutica, devido às suas propriedades biológicas (Pedro et al., 2022). Estes materiais têm sido utilizados em sistemas de administração de fármacos, protegendo o princípio ativo do medicamento contra a oxidação durante a sua libertação; em engenharia de tecidos, pois protegem as células e tecidos em crescimento contra os danos causados pelo stress oxidativo durante o processo de regeneração; e, também para cicatrização de feridas, permitindo reduzir o stress oxidativo no local da lesão, acelerando o processo de cicatrização e reduzindo a sua inflamação. Assim, a incorporação de antioxidantes em biomateriais permite melhorar a biocompatibilidade, reduzir a reatividade com o ambiente biológico e aumentar a eficácia terapêutica (Fadilah et al., 2023; Pedro et al., 2022).

1.4.1. Ácido Ascórbico

Ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, é um composto hidrossolúvel que corresponde a uma forma oxidada da glicose essencial para o organismo humano, descoberta pelo bioquímico húngaro Szent-Györgyi, em 1928 (Abdullah et al., 2022; Zümreoglu-Karan, 2006). Este é muito importante para diversas funções do organismo, incluindo o fortalecimento do sistema imunológico, a síntese de colágeno, a cicatrização de feridas, a absorção de ferro e o combate aos radicais livres (Abdullah et al., 2022).

É importante referir que não é possível gerar AA naturalmente, e, por isso, o seu consumo deve ser feito através da alimentação ou por meio de suplementos. Pode ser encontrado, principalmente em frutas cítricas, como limão e laranja e também em vegetais (Santos et al., 2022). A sua deficiência pode levar a uma série de problemas de saúde, incluindo fraqueza muscular, fadiga, sangramento nas gengivas, anemia e até mesmo escorbuto (Padayatty & Levine, 2016; Sanseverino, 2005).

O AA é um sólido cristalino branco a amarelo-claro, quase inodoro, com um sabor ácido e levemente azedo. A sua fórmula química é $C_6H_8O_6$, e a sua estrutura química (Figura 8) é composta por um anel de lactona, dois grupos hidroxilo enólicos e um grupo álcool primário e um secundário (Santos et al., 2022).

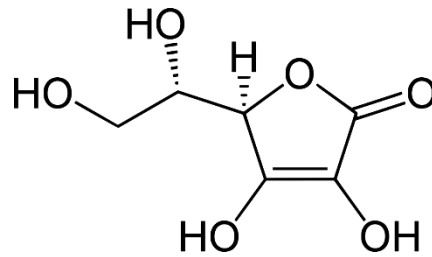


Figura 8- Estrutura química do ácido ascórbico.

Este composto apresenta dois enantiômeros: o ácido L-ascórbico e o ácido D-ascórbico. O primeiro diz respeito à forma ativa da vitamina C, encontrada na maioria dos alimentos e suplementos, ao contrário do ácido D-ascórbico que é uma forma inativa da vitamina C, menos comum na natureza e que apresenta uma atividade anti-escorbútica mais baixa (Pandey & Kant, 2016; Telang, 2013).

O principal desafio no desenvolvimento de produtos à base de AA deve-se à sua elevada instabilidade e reatividade, principalmente em condições adversas como calor, luz e exposição ao oxigênio. A oxidação do AA é um processo complexo no qual este perde elétrons, resultando assim na sua degradação e formação de novos produtos, como o ácido desidroascórbico. Este é uma forma oxidada do AA e representa um estágio intermédio na degradação da vitamina C, oxidando-se, por fim, irreversivelmente em ácido 2,3-dicetogulônico, como pode ser visto na Figura 9, levando assim à perda total das propriedades vitamínicas e antioxidantes (Barra et al., 2019; Yin et al., 2022).

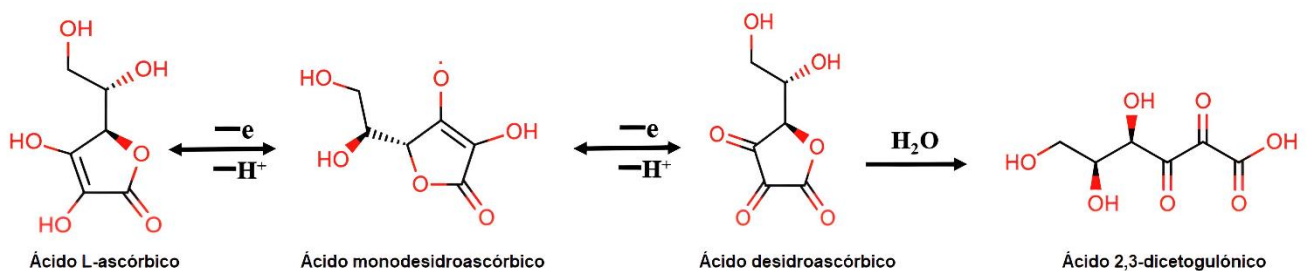


Figura 9- Degradação do ácido L-ascórbico em ácido desidroascórbico e ácido 2,3-dicetogulônico.

Adaptado (Yin et al., 2022).

1.4.2. Quercetina

A quercetina é um composto que pertence à classe dos flavonóides, muito comum na natureza e que pode ser encontrado em muitas plantas e alimentos, como frutas, verduras, grãos e chás e, conseqüentemente, encontra-se muito presente na dieta humana. É considerada um antioxidante e possui propriedades anti-inflamatórias, antivirais,

anticancerígenas, antimicrobianas, neuroprotetoras e cardioprotetoras. Nos últimos anos, tem sido alvo de muitos estudos devido aos seus possíveis benefícios para a saúde (Hosseini et al., 2021; Lakhanpal & Rai, 2007).

Diversos estudos sugerem que a QCT pode ser benéfica para a inibição e tratamento de diversos tipos de cancro, pois não prejudica as células saudáveis e é citotóxica para as células cancerígenas por meio de vários mecanismos, podendo suprimir a transição do ciclo celular e induzir a apoptose em células neoplásicas (Ghafouri-Fard et al., 2021; Shafabakhsh & Asemi, 2019). Possui também propriedades anti-inflamatórias, principalmente por meio da inibição da produção de citocinas, redução da expressão da cicloxigenase e lipoxigenase e manutenção da estabilidade dos mastócitos (Shen et al., 2021).

A QCT (Figura 10) tem como fórmula química $C_{15}H_{10}O_7$, possui uma cor amarela e não liberta cheiro. A sua estrutura química está inteiramente relacionada com as suas propriedades antioxidantes, que inclui grupos hidroxilo presentes nos diferentes anéis (Ozgen et al., 2016).

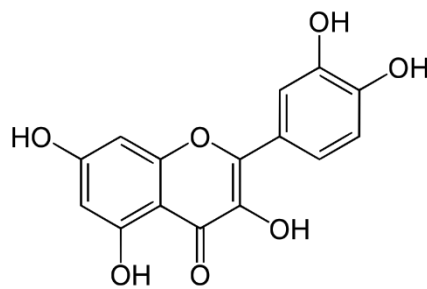


Figura 10- Estrutura química da quercetina.

2. Materiais e Métodos

2.1. Reagentes

O estudo do desenvolvimento de filmes, com potenciais propriedades antioxidantes, e peças 3D iniciou-se com a seleção dos biopolímeros e dos antioxidantes utilizados.

Para a produção dos filmes e das peças 3D foram utilizados QTS, ALG de sódio e GEL, das marcas Sigma, ITW e Labchem, respetivamente, e AA e QCT das marcas VWR Chemical e Acros Organics, respetivamente. A HA foi sintetizada no laboratório. Para os ensaios antioxidantes, o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi adquirido à Alfa Aesar.

2.1.1. Síntese da hidroxiapatite

A síntese da HA foi realizada através do método de precipitação, utilizando acetato de cálcio, acetato de amónio e fosfato de amónio como reagentes. As quantidades utilizadas foram de 1,58 g de acetato de cálcio, 1,54 g de acetato de amónio e 0,89 g de fosfato de amónio, cada um dissolvido em 50 mL de água destilada.

A solução de acetato de amónio foi colocada sob agitação constante, num banho de óleo, a 90 °C. De seguida, foram-se adicionando simultaneamente as duas restantes soluções, mantendo o pH da mistura a 8,5, por adição controlada de hidróxido de amónio, de forma a garantir a pureza e a cristalinidade do produto final.

Após a formação do precipitado branco, filtrou-se sob vácuo, lavando com água destilada. O material obtido foi colocado na estufa a 80 °C por 24 horas (h) e submetido a calcinação numa mufla a 1000 °C por 3 h.

A síntese da HA resultou num produto final de cor branca e a sua caracterização foi realizada através da técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

2.2. Preparação dos filmes

2.2.1. Produção dos filmes de quitosano

Na produção de filmes de QTS foi usada a técnica de *casting*, em placas de Petri de 4,5 cm. Pesou-se 0,2 g de QTS e adicionou-se 10 mL de uma solução de ácido acético 1% (v/v). A mistura foi colocada em agitação até se obter uma solução homogénea. Os filmes foram incorporados com 10% (m/m) dos diferentes compostos antioxidantes. De seguida, estes compostos foram adicionados à solução de QTS sob agitação, e o processo continuou

até que estivessem completamente dissolvidos. Por fim, verteu-se a mistura para uma placa de Petri e colocou-se na estufa a 60 °C, durante 24 h.

2.2.2. Produção dos filmes de alginato

Os filmes de ALG foram produzidos em placas de Petri de 4,5 cm pela técnica de *casting*. Pesou-se 0,2 g de alginato de sódio e adicionou-se 10 mL de água destilada. A mistura foi colocada em agitação até se obter uma solução homogénea. De seguida, os filmes foram incorporados com 10% (m/m) dos diferentes compostos antioxidantes. Estes compostos foram adicionados à solução de ALG sob agitação, até à sua dissolução completa. Por fim, verteu-se a mistura para uma placa de Petri e colocou-se na estufa a 60 °C, durante 24 h.

2.2.3. Produção dos filmes de quitosano e hidroxiapatite

Para a produção dos filmes de QTS e HA foi usada a técnica de *casting*, em placas de Petri de 4,5 cm. Pesou-se 0,2 g de QTS e adicionou-se 10 mL de uma solução de ácido acético 1% (v/v) e a mistura foi colocada em agitação até se obter uma solução homogénea. De seguida, adicionou-se 10% (m/m) de HA, em agitação até se obter uma suspensão homogénea. Os compostos antioxidantes foram incorporados numa percentagem de 10% (m/m) em relação à massa de polímero, com agitação até dissolução completa. A mistura foi transferida para uma placa de Petri e colocada na estufa a 60 °C, durante 24 h.

2.2.4. Produção dos filmes de alginato e hidroxiapatite

Para a produção dos filmes de ALG e HA foi usada a técnica de *casting*, em placas de Petri de 4,5 cm. Pesou-se 0,2 g de ALG e adicionou-se 10 mL de água destilada. A mistura foi colocada em agitação até se obter uma solução homogénea e, de seguida, os filmes foram incorporados com 10% (m/m) de HA, que foi adicionada à solução anterior e continuou em agitação até se obter uma suspensão homogénea. Os compostos antioxidantes foram incorporados numa percentagem de 10% (m/m) em relação à massa de polímero, que foram adicionados à solução de ALG e HA e agitados até à sua dissolução completa. Finalmente, a mistura foi despejada para uma placa de Petri e colocada na estufa a 60 °C, durante 24 h.

2.3. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA%) dos compostos e dos filmes foi avaliada através do método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), um método de captação de radicais simples, rápido e reprodutível.

Baseia-se na capacidade do radical livre DPPH[•], reagir com antioxidantes, provocando uma mudança de cor de roxo para amarelo, através de um mecanismo de transferência do átomo de hidrogênio, resultando na formação de DPPH-H, como apresentado na Figura 11. A absorvância do radical DPPH[•] na zona do visível ocorre entre 515-520 nm, sendo que a intensidade da cor violeta do DPPH[•] é inversamente proporcional à atividade antioxidante das amostras (Sirivibulkovit et al., 2018).

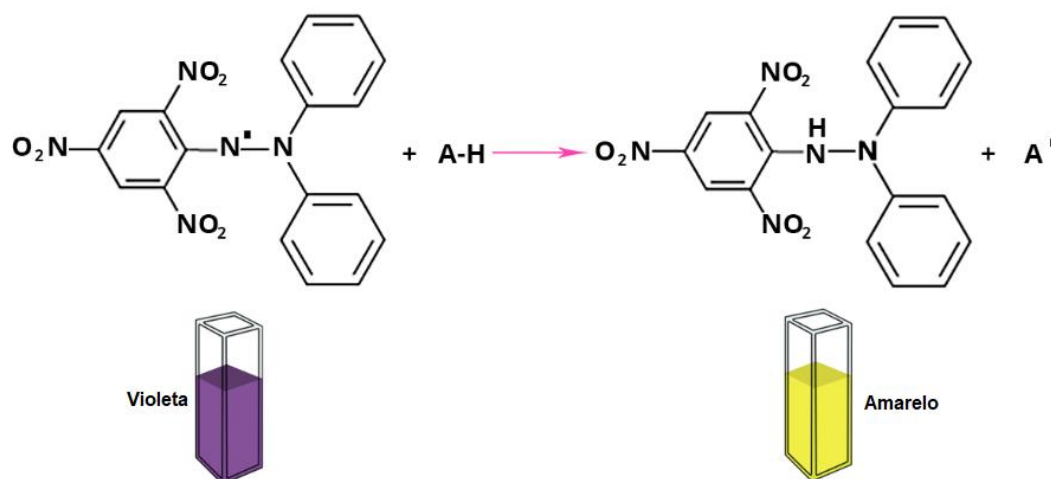


Figura 11- Mecanismo de reação do DPPH.

2.3.1. Avaliação dos compostos antioxidantes

Prepararam-se soluções de DPPH[•] 0,1 mM, QCT 3,3 mM e AA 2,8 mM, em etanol. Retirou-se 200 μ L, 100 μ L, 50 μ L, 20 μ L, 10 μ L e 5 μ L das soluções mãe de QCT e AA para *ependorfs*, perfez-se o volume até 1 mL com etanol e agitou-se no *vortex* para garantir a homogeneidade das amostras. Posteriormente, em cuvets colocou-se 0,2 mL das diferentes soluções diluídas e 1,8 mL da solução etanólica de DPPH[•] 0,1 mM preparada previamente. As cuvets foram colocadas, durante 40 minutos (min), num local escuro e mediu-se a absorvância (Abs), espectrofotometricamente, a 517 nm. A percentagem de atividade antioxidante foi calculada através da expressão 1:

$$AA\% = \frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \times 100 \quad (1)$$

Onde, Abs_{branco} corresponde à absorvância da solução de DPPH^{*} controlo e $Abs_{amostra}$ é a absorvância das amostras de diferentes concentrações. Determinaram-se os valores de EC_{50} (concentração efetiva média) do AA e da QCT através de uma reta de calibração com as diferentes concentrações utilizadas *versus* a AA%. Os ensaios foram realizados em duplicado.

2.3.2. Avaliação da atividade antioxidante dos filmes

Além de se avaliar a atividade antioxidante dos compostos individualmente, é fundamental testar a atividade antioxidante dos filmes produzidos, de forma a avaliar a sua eficácia na libertação dos compostos antioxidantes.

Desta forma, preparou-se uma solução de DPPH^{*} 0,1 mM em etanol e colocaram-se amostras de cada filme em 2,5 mL dessa solução, com agitação e ao abrigo da luz. Retirou-se aliquotas de cada solução em contacto com os filmes a cada 10 min até perfazer 1 h, e a absorvância foi determinada espectrofotometricamente, a 517 nm, de modo a observar-se uma mudança de cor e conseqüente diminuição dos valores de absorvância em relação ao branco.

Calculou-se então a atividade antioxidante, através da expressão 1. Onde, Abs_{branco} corresponde à a absorvância da solução sem adição do filme e $Abs_{amostra}$ a absorvância medida a cada medição. Por fim, foram criados gráficos numa folha de cálculo, para visualizar a atividade antioxidante das diferentes amostras, que permitiram comparar a %AA entre os filmes dopados com antioxidantes e os filmes apenas de polímero. Todas estas etapas foram realizadas em duplicado.

2.4. Espectrofotometria Ultravioleta-Visível

A espectrofotometria Ultravioleta-Visível (UV-Vis) é um método analítico que mede a absorvância e a transmitância de uma substância em função do seu comprimento de onda, e está relacionado com as interações entre a radiação eletromagnética nas gamas do ultravioleta (UV) e visível (Vis) e a matéria. A região UV do espectro eletromagnético abrange aproximadamente a gama de 10-380 nm e a região do visível compreende a gama espectral de 380-750 nm. Uma vez que se baseia na excitação dos eletrões mais exteriores dos átomos envolvidos na formação de moléculas, esta abordagem é frequentemente referida como "espectroscopia eletrónica". Assim, quando a luz passa através de uma solução ou amostra, ela pode ser absorvida pelas moléculas presentes na amostra, resultando numa diminuição na intensidade da luz transmitida em relação à luz incidente. Cada molécula

possui um espectro de absorção característico, influenciado pelo comprimento de onda da luz. Desta forma, é possível determinar a quantidade de composto, uma vez que, de acordo com a Lei de Lambert-Beer a intensidade da luz absorvida é proporcional à quantidade de amostra absorvida no material analisado (Picollo et al., 2019). Neste trabalho foi utilizado um espectrofotômetro da *Agilent Technologies Carry 60 UV-Vis*.

2.4.2. Ensaios de liberação controlada

A liberação dos compostos incorporados nos filmes foi avaliada através da espectrofotometria UV-Vis. Para realizar estes ensaios, foram cortadas amostras de filmes retangulares com dimensões de 1x2 cm e colocados num balão de *Erlenmeyer* contendo etanol, com quantidades variáveis entre 100 mL e 200 mL e utilizou-se 2 amostras de cada filme. De seguida, a absorvância foi medida de 15 em 15 min até perfazer a primeira hora, e, depois de 30 em 30 min até às 4 h, e, seguidamente mediu-se às 24 h e 48 h. Por fim, os dados foram tratados no *Microsoft Excel* de modo a obter a percentagem de liberação dos compostos antioxidantes.

2.5. Microscopia ótica

A observação dos filmes produzidos foi realizada num microscópio ótico Zeiss, com uma lente ocular de 10x e objetivas com ampliação de 100x, de forma a obter informações visuais sobre a morfologia e a estrutura dos filmes.

2.6. Desenvolvimento e otimização de uma impressora 3D por extrusão por seringa

Esta etapa consistiu na criação de uma impressora 3D por extrusão por seringa a partir de uma impressora comercial Anet A8, originalmente destinada ao método FDM (Figura 12). Para isso, desenvolveu-se um módulo de extrusão por seringa que permitiu o fabrico de uma impressora de baixo custo e com materiais acessíveis, para posterior impressão de estruturas de QTS e ALG, adaptada às necessidades encontradas ao longo deste trabalho.

Assim, diversas etapas foram fundamentais, começando pelo desenvolvimento do conceptual do protótipo desejado, pela modelação das peças que iriam fazer parte do módulo da seringa digitalmente no programa de modelação tridimensional SolidWorks até à etapa do fabrico que engloba a sua impressão e montagem, incorporação do módulo criado na impressora e posterior otimização dos parâmetros de impressão.



Figura 12- Impressora 3D Anet A8 (Anet 3D Printer, 2023).

2.6.2. Projeção do módulo de seringa no SolidWorks

O SolidWorks é um software CAD que permite produzir peças e conjuntos. É baseado em computação paramétrica e muito utilizado na área da engenharia, pois permite criar formas 3D através de operações geométricas elementares a partir de um *sketch* 2D (Onwubolu, 2013). Neste trabalho o SolidWorks foi usado para modelar diversas peças e, posteriormente, um conjunto de um módulo de seringa (Figura 13).

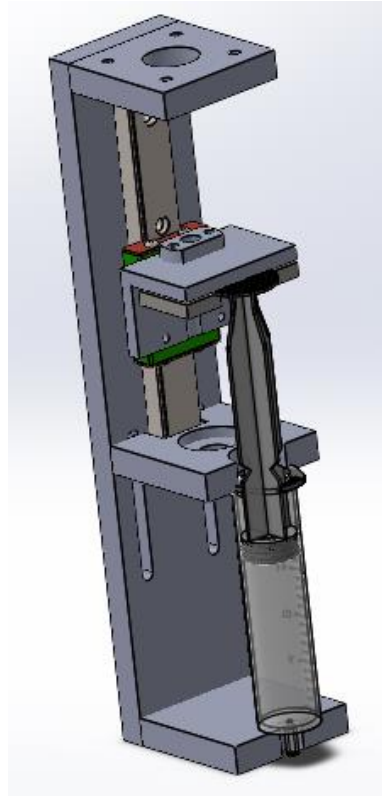


Figura 13- Modelação do módulo de seringa no SolidWorks.

Para o processo de desenvolvimento do módulo de seringa, inicialmente, ocorreu uma fase de pesquisa relacionada à impressão 3D por extrusão por seringa em diversas fontes online, em busca de inspiração e procura por abordagens inovadoras para a criação do *design* do módulo pretendido (Figura 14).

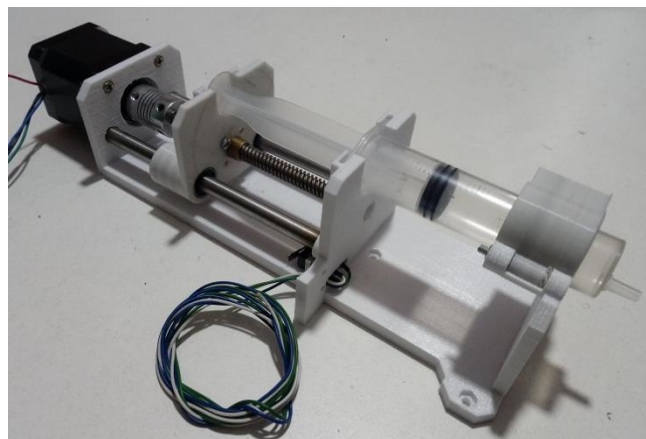


Figura 14- Fonte de inspiração para o módulo de extrusão por seringa (Ulises Gordillo Zapana, 2020).

A partir dessa fase de inspiração e pesquisa, começou-se a modelação digital do módulo de seringa no SolidWorks.

No processo de desenvolvimento do módulo, o foco principal estava na criação de um sistema versátil e flexível. Para isso, desenvolveu-se um sistema de guia, que permitiu uma extrusão mais precisa e controlada. Além disso, o módulo de seringa foi adaptado ao volume desejado, ao permitir a utilização de seringas de diversas dimensões, e também um ajuste da altura de forma a serem utilizadas diversas agulhas, de acordo com as necessidades específicas de impressão. Outra vantagem prende-se no facto do *design* criado ser relativamente compacto, economizando espaço e possibilitando uma montagem fácil na impressora existente. É importante referir que o motor existente da impressora foi reutilizado, o que permitiu reduzir os custos, mantendo assim a eficiência.

Assim, o desenvolvimento do módulo teve início com a criação da peça de trás, que iria servir como uma base que não apenas sustenta todas as outras peças mas também possibilita o encaixe seguro do módulo na estrutura da impressora (Figura 15).

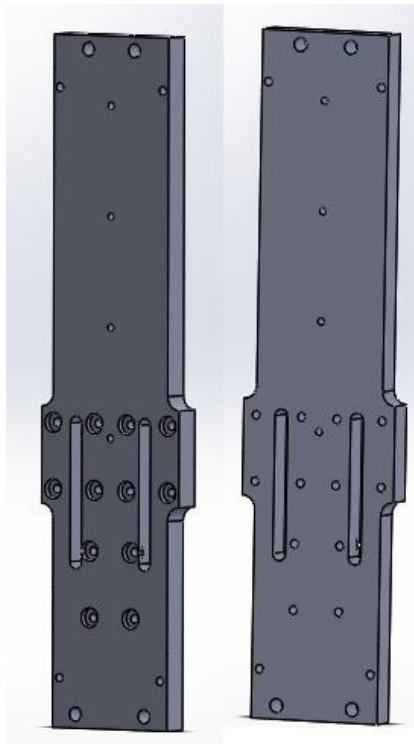


Figura 15- Peça de base do módulo de seringa.

De seguida, foi modelada a peça responsável pela movimentação da seringa, que iria encaixar na guia. Essa peça permite que a seringa se desloque verticalmente, controlando com precisão a deposição do material, garantindo a movimentação do êmbolo da seringa durante o processo de impressão (Figura 16).

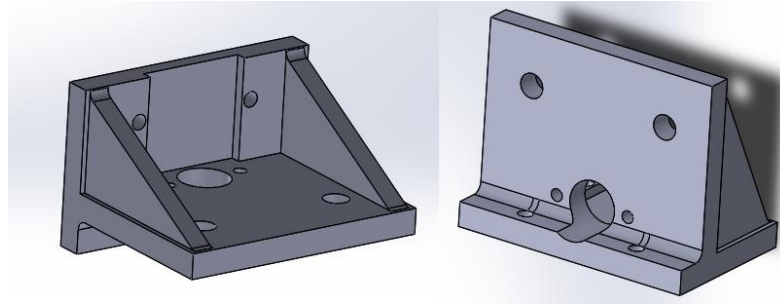


Figura 16- Peça de movimentação na guia do módulo de seringa.

Posteriormente, modelou-se uma peça cilíndrica de forma a fornecer um suporte sólido que segura a seringa firmemente na parte inferior, apresentada na Figura 17.

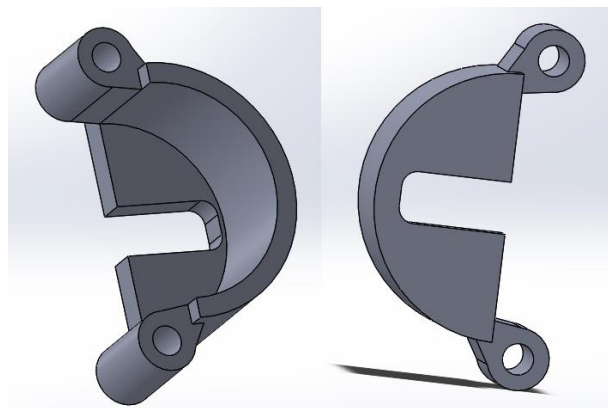


Figura 17- Cilindro de suporte inferior da seringa.

Após o desenho de todas as peças individualmente, e antes da sua montagem, procurou-se em repositórios de peças disponíveis em formato digital, no GrabCAD e sites dos fabricantes alguns componentes comerciais para complementar o conjunto criado, como o acoplador, fuso e rosca, seringa e guia (Figura 18).

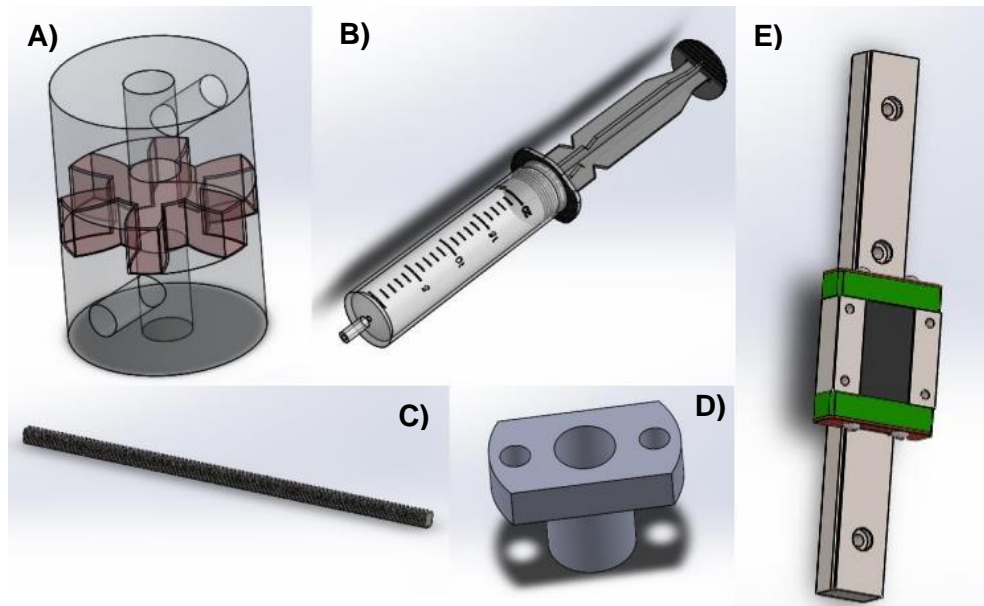


Figura 18- Componentes adicionais para o módulo de seringa. **A)** Acoplador; **B)** Seringa; **C)** Fuso; **D)** Rosca; e **E)** Guia.

Por fim, iniciou-se o processo de montagem no software SolidWorks através do ficheiro *Assembly*, que permitiu juntar todas as peças mostradas anteriormente de forma a criar o conjunto do módulo pretendido digitalmente. Esta é uma parte muito importante do projeto pois a visualização do módulo completo e montado permite perceber se todas as partes encaixam como pretendido e se são necessários ajustes em termos de dimensões para garantir o bom funcionamento do módulo criado. Após a montagem de todas as peças e feitas as alterações necessárias, o conjunto foi finalmente validado e pronto para ser impresso (Figura 19).

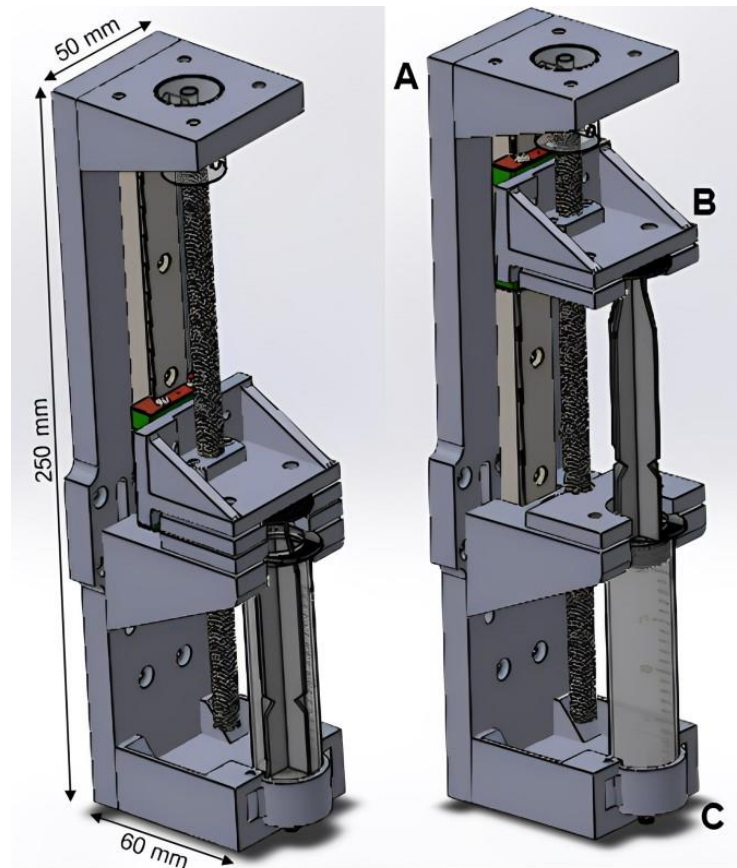


Figura 19- Conjunto montado do módulo de seringa e principais componentes; **A)** Peça de base; **B)** Peça de movimentação na guia e **C)** Cilindro de suporte inferior da seringa.

Para a impressão de todas as peças modeladas, os ficheiros foram guardados como arquivos STL. Posteriormente, esses arquivos foram importados para o software de fatiamento Ultimaker Cura, onde foi possível ajustar as camadas de impressão, a densidade de preenchimento e a velocidade de impressão de forma a otimizar a qualidade e o tempo de impressão de cada uma das peças.

Todas as peças foram impressas utilizando a própria impressora 3D Anet A8, exceto a peça de base que foi impressa numa impressora BigRep Studio, pois esta era maior do que as dimensões máximas da Anet A8. A temperatura utilizada foi 210 °C e foi usado filamento PLA como material de impressão, resultando assim em peças rígidas e com uma boa durabilidade.

Algumas peças precisaram de ajustes adicionais para garantir uma boa montagem, como a rosca em que foi necessário cortar material de forma a garantir que esta encaixasse perfeitamente na peça que faz a movimentação na guia, e, por isso, foi usada a fresadora para ajudar neste processo, como se pode observar na Figura 20.

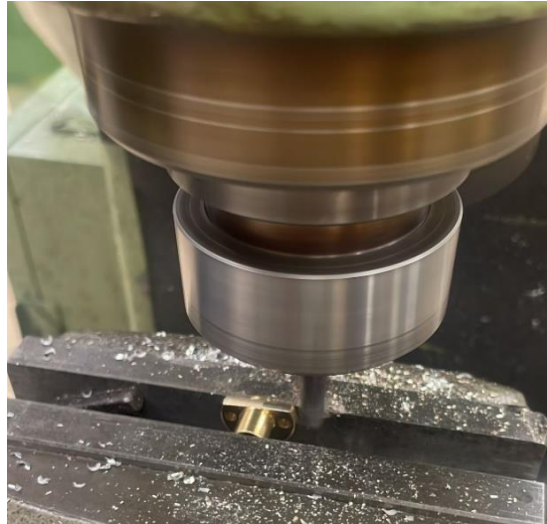


Figura 20- Fresadora usada no corte da rosca.

Posteriormente, com todas as peças impressas e ajustadas, passou-se para a fase de montagem do módulo de seringa, com o uso de parafusos que permitiram um encaixe seguro de todas as peças, e uma seringa de 20 mL foi encaixada no módulo. Finalmente, o módulo existente na impressora foi retirado e substituído pelo módulo construído.

2.6.3. Otimização da impressora 3D e dos parâmetros de impressão

A otimização tanto da impressora 3D utilizada como dos parâmetros de impressão é um passo muito importante que deve ser considerado antes de se começar a realizar qualquer impressão. Estes devem ser ajustados tendo em conta os resultados pretendidos, pois influencia a qualidade, a precisão e a fiabilidade dos resultados.

Inicialmente, após incorporar o módulo de seringa na impressora, foi realizado o zero de forma a mantê-la devidamente alinhada e nivelada para garantir um correto movimento dos eixos. Esse alinhamento adequado contribui para a geometria das peças e para a uniformidade da impressão.

Ao longo de várias impressões, foram realizados diversos ajustes de forma a permitir um melhor funcionamento e uma melhor qualidade das peças impressas. Para isso, foi utilizado o software Ultimaker Cura, onde existem diversos parâmetros que foram sendo otimizados à medida que se realizavam vários testes de impressão, de forma a perceber os parâmetros que iriam dar origem a uma melhor peça. Dentro desses parâmetros, aqueles que foram ajustados para obter melhores resultados são os seguintes:

- *Nozzle diameter*: Tamanho do bocal através do qual o material é extrudido, afetando a precisão e o detalhe do objeto impresso;

- *Print speed*: Velocidade à qual é realizada a impressão, afeta o tempo total da impressão e a qualidade da mesma;
- *Infill density*: Quantidade de material utilizado para preencher o interior do objeto, afeta a resistência do objeto e a quantidade de material gasto;
- *Infill pattern*: Padrão utilizado para o preenchimento do interior do objeto, sendo que diferentes padrões podem afetar a resistência do material;
- *Layer height*: Espessura de cada camada impressa, que determina a resolução e o detalhe do objeto;
- *Top/Bottom layers*: Número de camadas na parte superior e inferior do objeto, afeta a resistência e o acabamento da superfície.
- *Top/Bottom thickness*: Espessura das camadas superior e inferior da impressão, que tem impacto na durabilidade e no aspecto das superfícies do objeto.
- *Retraction distance*: Comprimento do material retraído durante um movimento de retração, reduzindo a formação de gotas.
- *Retraction speed*: Velocidade com que o material é retraído durante um movimento de retração.

Além disso, a calibração do fluxo foi uma etapa crucial antes do início do processo de impressão, na qual se avaliou cuidadosamente o movimento do motor e o volume extrudido pela impressora. Este processo foi realizado na ordem de grandeza de menor escala de uma pipeta de 5 mL, envolvendo uma série de testes iterativos, onde se ajustou o software da máquina de forma a garantir que a quantidade de material extrudido correspondesse ao desejado, ou seja, até se obter um desvio considerado mínimo entre o volume extrudido e o volume desejado. Isto resultou numa calibração precisa da impressora que garantiu a qualidade e consistência de todas as impressões realizadas.

Assim, o equilíbrio ideal entre estes parâmetros foi sendo otimizado ao longo do desenvolvimento do trabalho, percebendo aqueles que mais se adequavam e davam origem a melhores resultados. Os parâmetros utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Parâmetros de impressão utilizados.

Parâmetros de Impressão	Especificações
<i>Nozzle diameter</i>	0,84-1,0 mm
<i>Print speed</i>	10-30 mm/s
<i>Infill density</i>	20%
<i>Infill pattern</i>	<i>Lines, Grid</i>
<i>Layer height</i>	0,5 mm
<i>Top/Bottom layers</i>	0
<i>Top/Bottom thickness</i>	0 mm
<i>Retraction distance</i>	40 mm
<i>Retraction speed</i>	100 mm/s

2.7. Preparação das misturas para impressão 3D

Para o desenvolvimento das misturas para impressão, inicialmente utilizou-se unicamente o biopolímero (ALG ou QTS), no entanto, rapidamente se percebeu que era necessário adicionar outro material que conferisse consistência, para que as peças mantivessem a sua forma durante a extrusão. Desta forma, a GEL foi o material escolhido o que permitiu aumentar a viscosidade da mistura, e melhorar substancialmente o processo de impressão.

2.7.2. Produção da mistura de alginato e gelatina

Começou-se por pesar 0,4 g de ALG e acrescentou-se 10 mL de água destilada. Essa mistura foi mantida em aquecimento a 80 °C. De seguida, num copo separado, pesou-se 0,4 g de GEL e adicionou-se 10 mL de água destilada, mantendo essa mistura a 60 °C. Após a dissolução juntaram-se as duas misturas e, de forma a obter uma gelificação e consistência ideal deixou-se em agitação a 60 °C durante aproximadamente 30 min, para assegurar a homogeneidade. Antes do processo de impressão, a mistura foi aquecida a 37 °C, para que se mantivesse a viscosidade desejada, garantindo que a mistura fluísse de maneira consistente durante a extrusão.

2.7.3. Produção da mistura de quitosano e gelatina

Pesou-se 0,4 g de QTS e adicionou-se 10 mL de solução de ácido acético 1% (v/v), a 55 °C até à dissolução completa. Na solução de QTS, adicionou-se 0,4 g de GEL e manteve-se a mistura em aquecimento durante aproximadamente 30 min, até se obter a

homogeneidade. Por fim, deixou-se a mistura arrefecer à temperatura e ambiente e aqueceu-se a 37 °C antes da impressão.

2.7.4. Processo de *Crosslinking*

O processo de *crosslinking* é a última etapa para o desenvolvimento das peças, e é muito importante pois envolve a formação de ligações entre as moléculas do material, resultando assim numa estrutura com mais estabilidade e resistência. Assim, é importante ajustar as concentrações e os tempos de exposição das soluções utilizadas de forma a alcançar os resultados desejados. Para a mistura de ALG, o cloreto de cálcio (CaCl_2) foi usado como agente de *crosslinking* e para a mistura de QTS foi utilizado o hidróxido de sódio (NaOH).

Foram preparadas duas soluções de CaCl_2 , com concentrações de 100 mM e 500 mM. No final da impressão, a peça de teste foi borrifada com a solução de 100 mM e imersa nessa mesma solução por 2 h, permitindo que as ligações iónicas se formassem gradualmente e fortalecessem a estrutura. Para o *scaffold*, borrifou-se com a solução de 500 mM e, de seguida, imergiu-se o *scaffold* impresso por 15 min nessa mesma solução, de forma a acelerar o processo de *crosslinking* e tentar obter uma estrutura mais rígida. O facto de borrifar as peças no final da sua impressão ajudou a solidificar a sua estrutura para que fosse possível removê-las da mesa de impressão e mergulhar nas respetivas soluções.

Para a mistura de QTS, o processo de *crosslinking* foi realizado usando primeiro uma solução de NaOH de 500 mM e, posteriormente, uma solução de 1 M, durante 15 min. Como para a primeira concentração não foi obtida a solidificação necessária, decidiu-se aumentar a concentração, no entanto, os resultados obtidos continuaram a não ser os desejados. A dificuldade em solidificar os *scaffolds* pode ser influenciada, por exemplo, pelas propriedades específicas dos materiais utilizados.

2.8. Impressão das peças 3D

Para o processo de impressão das peças utilizou-se primeiramente o SolidWorks para o seu *design*, o Ultimaker Cura para o fatiamento das peças e, por fim, o Repetier-Host, que permite controlar a impressora 3D através do computador, por meio de conexão USB. Neste programa é possível monitorizar a impressão em tempo real e realizar ajustes necessários, como pausar a impressão, ajustar a temperatura e controlar o movimento dos eixos (Figura 21).

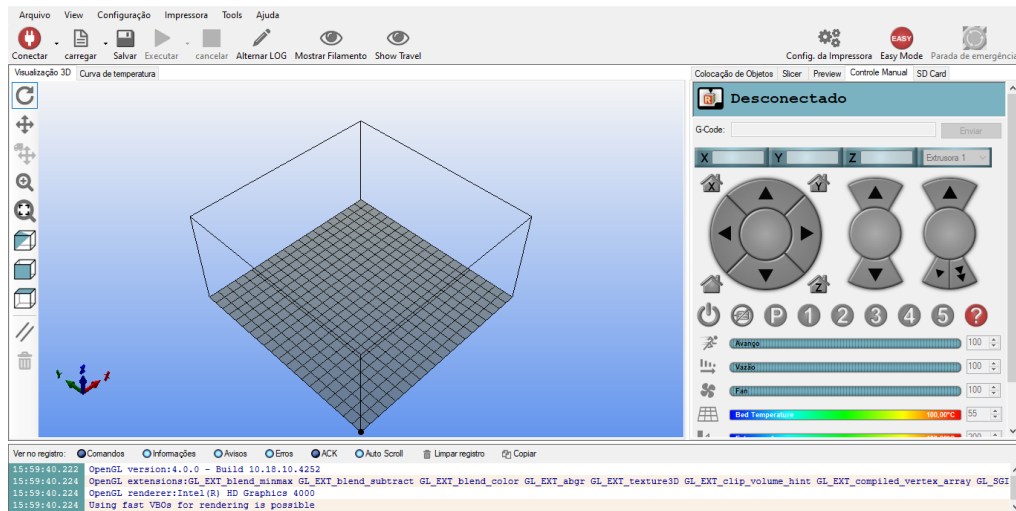


Figura 21- Interface do software Repetier-Host.

De forma a iniciar a impressão, começou-se por desenhar um paralelepípedo de dimensões 24x24 mm e uma altura de 5 mm, com uma parede externa com 2 mm, visto na Figura 22A.

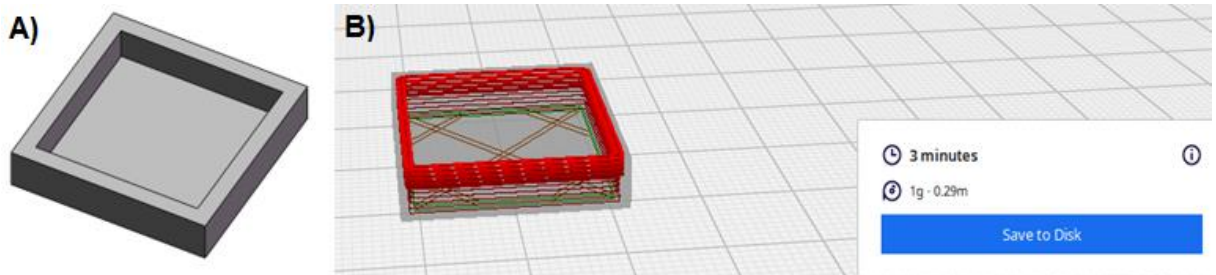


Figura 22- Modelo do paralelepípedo de 24x24x5 mm **A)** criado no SolidWorks e **B)** Preparado no Ultimaker Cura para impressão.

De seguida, o ficheiro SolidWorks foi convertido em formato STL e importado para o Ultimaker Cura, onde se selecionou os parâmetros pretendidos e o tempo de impressão foi estimado (Figura 22B). A partir dessas configurações, este software gerou o arquivo *Gcode*, que contém todas as instruções necessárias para a impressora 3D construir a peça.

Assim, o ficheiro *Gcode* foi aberto no Repetier-Host, conectou-se o computador à impressora e foram dadas instruções para começar a impressão. Ao tentar imprimir este paralelepípedo, perceberam-se as dificuldades provavelmente devido ao seu tamanho reduzido e ao número de camadas, pois o material depositado começava a fluir e não produzia a altura desejada.

Para resolver esse problema, desenhou-se então um paralelepípedo com dimensões de 60x60 mm e uma altura de 2 mm, apresentado na Figura 23A. De seguida realizou-se o mesmo processo, ou seja, gravou-se o ficheiro em STL, abriu-se no software de fatiamento,

onde foram escolhidos os parâmetros desejados e foi gerado o ficheiro *Gcode* (Figura 23B). Posteriormente, este foi aberto no Repetier-Host para conexão à impressora. O novo *design* do paralelepípedo de 60x60x2 mm assemelha-se a um *scaffold* devido ao seu tamanho e geometria, e permitiu um espaço maior entre as camadas depositadas durante a impressão.

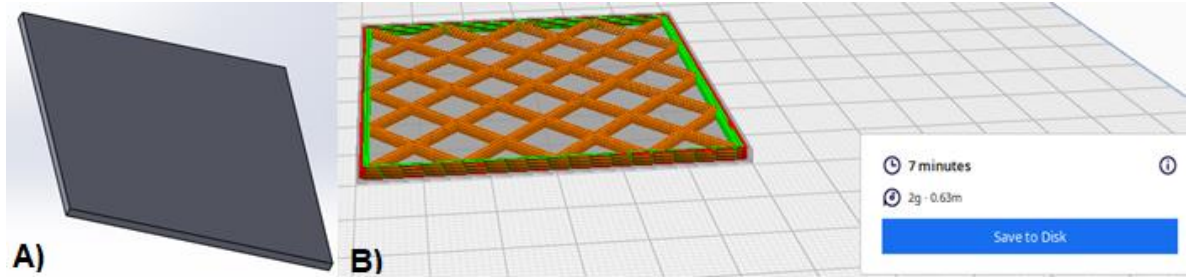


Figura 23- Modelo do paralelepípedo de 60x60x2 mm **A)** criado no SolidWorks e **B)** Preparado no Ultimaker Cura para impressão.

3. Resultados e Discussão

3.1. Preparação e caracterização dos filmes

Os filmes produzidos para este trabalho foram realizados com dois biopolímeros, quitosano (QTS) e alginato (ALG) e um constituinte mineral, a hidroxiapatite (HA), obtendo-se 4 matrizes distintas, nomeadamente QTS, ALG, QTS:HA (90:10 m/m) e ALG:HA (90:10 m/m). As misturas foram dopadas com 10% (m/m) de ácido ascórbico (AA) e quercetina (QCT), como compostos antioxidantes, e referenciados de acordo com as siglas apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Filmes poliméricos produzidos.

Filmes		
Base	Antioxidante	Designação
Quitosano	-	QTS
	10% de QCT	QTS-QCT
	10% de AA	QTS-AA
Alginato	-	ALG
	10% de QCT	ALG-QCT
	10% de AA	ALG-AA
Quitosano e Hidroxiapatite	-	QTS:HA
	10% de QCT	QTS:HA-QCT
	10% de AA	QTS:HA-AA
Alginato e Hidroxiapatite	-	ALG:HA
	10% de QCT	ALG:HA-QCT
	10% de AA	ALG:HA-AA

3.1.1. Filmes de quitosano

Os filmes de QTS foram produzidos de acordo com a metodologia descrita no ponto 2 – Materiais e Métodos. O filme controlo apresentou-se transparente e com uma aparência homogénea (Figura 24A). Os filmes incorporados com os compostos, apresentaram um aspeto opaco com coloração intensa, esverdeada para o filme QTS-QCT (Figura 24B) e amarelo-torrado para o filme de QTS-AA (Figura 24C), consequência da presença dos compostos. Todos foram produzidos com uma espessura muito fina (0,05 mm) e apresentavam alguma flexibilidade, mas pouca elasticidade.

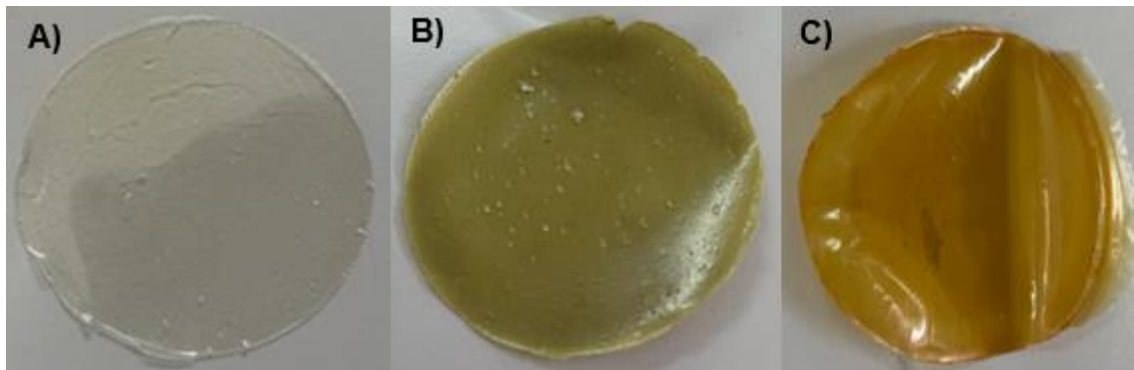


Figura 24- Filmes de A) QTS; B) QTS-QCT e C) QTS-AA.

3.1.2. Filmes de alginato

Os filmes de ALG foram produzidos de acordo com a metodologia descrita no ponto 2 – Materiais e Métodos. O filme controlo exibiu uma aparência transparente e homogênea (Figura 25A). Nos filmes dopados a presença de QCT conferiu ao filme ALG-QCT (Figura 25B) um aspeto opaco e amarelo, enquanto que com a presença de AA o filme ALG-AA se manteve a transparência e um ligeiro tom amarelado (Figura 25C). Os filmes produzidos apresentaram uma espessura muito fina (0,05 mm), e com alguma flexibilidade, mas menos elasticidade que os filmes anteriores.

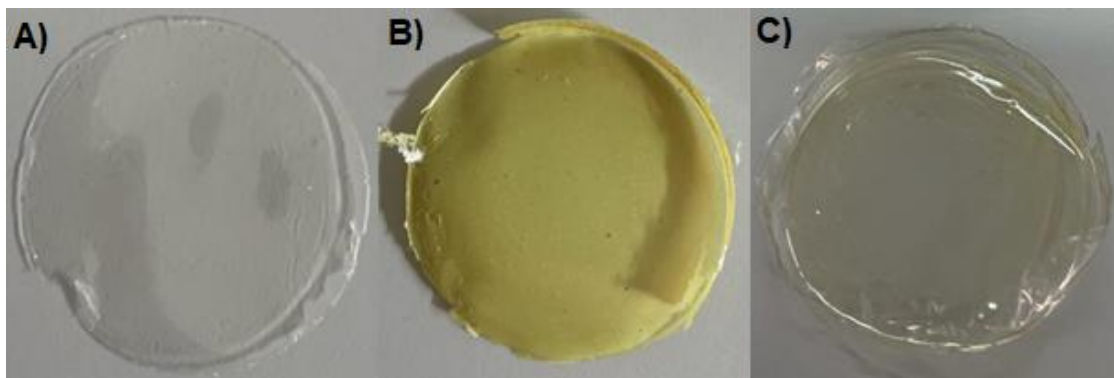


Figura 25- Filmes de A) ALG; B) ALG-QCT e C) ALG-AA.

3.1.3. Filmes de quitosano e hidroxiapatite

Os filmes de QTS:HA foram produzidos de acordo com a metodologia descrita no ponto 2 – Materiais e Métodos. De acordo com o esperado a introdução de HA retirou a transparência do filme controlo (QTS:HA), apresentando-se opaco e de cor branca (Figura 26A). Para os filmes dopados, uma vez que já se apresentam opacos, o efeito de perda de transparência não foi tão evidente. Os filmes de QTS:HA-QCT e QTS:HA-AA apresentaram tonalidades muito semelhantes aos filmes de QTS dopados, como pode ser observado nas

Figuras 26B e 26C, respetivamente. Os filmes apresentavam uma espessura de 0,05 mm e a adição de HA traduziu-se num aumento da rigidez e fragilidade, pois estes filmes apresentavam porosidade.

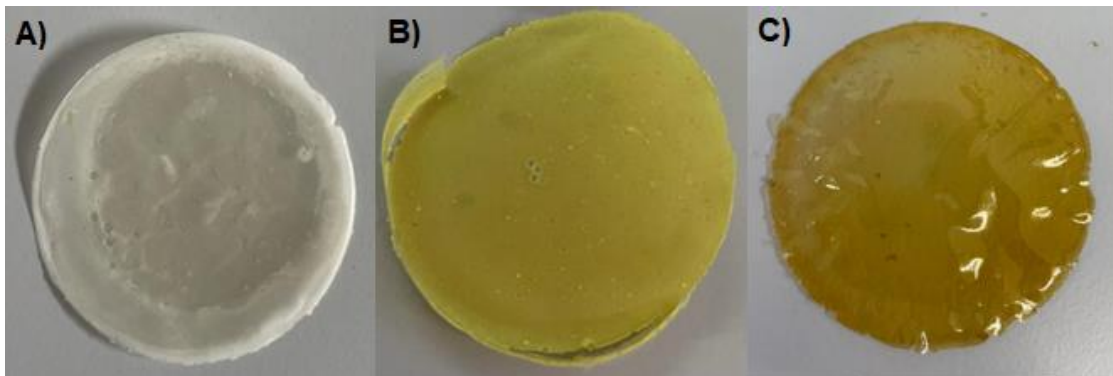


Figura 26- Filmes de **A)** QTS:HA; **B)** QTS:HA-QCT; **C)** QTS:HA-AA

3.1.4. Filmes de alginato e hidroxiapatite

Os filmes de ALG e HA foram produzidos de acordo com a metodologia descrita no ponto 2 – Materiais e Métodos. De acordo com o esperado o filme controlo (ALG:HA) apresentou-se opaco e branco (Figura 27A), ao contrário da transparência do filme controlo de ALG, devido à adição de HA, insolúvel na matriz. Os filmes dopados ALG:HA-QCT e ALG:HA-AA, apresentam um aspeto semelhante aos filmes de ALG dopados, sendo evidente a falta de dispersão da HA especialmente para o ALG:HA-AA (Figuras 27B e 27C). Os filmes apresentaram uma espessura de 0,05 mm e revelaram-se mais quebradiços que os de ALG.

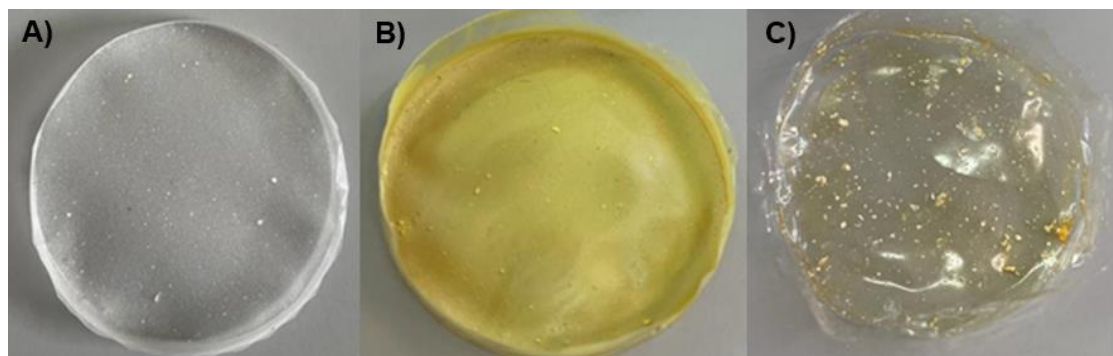


Figura 27- Filmes de **A)** ALG:HA; **B)** ALG:HA-QCT; **C)** ALG:HA-AA.

3.2. Avaliação da atividade antioxidante

3.2.1. Compostos em estudo

De forma a avaliar a atividade antioxidante dos compostos utilizados foram determinados os valores de EC_{50} pelo método do DPPH, que se apresentam na Tabela 3.

Tabela 3- Atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH dos compostos QCT e AA, expressa em valores de EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

Compostos	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
QCT	85,34
AA	57,42

De acordo com o esperado, os valores obtidos de EC_{50} quer para a QCT quer para o AA, pelo método do DPPH confirmaram o seu elevado potencial antioxidante. Ambos os valores sugerem que tanto a QCT quanto o AA são antioxidantes eficazes, capazes de proteger contra os radicais livres e reduzir o stress oxidativo. No entanto, o AA demonstra uma atividade antioxidante ligeiramente superior, uma vez que o valor obtido é menor.

3.2.2. Filmes de quitosano

A análise efetuada focou-se na determinação da AA% ao final de 1 h de reação, dos filmes controlo e dos filmes dopados com os antioxidantes usados. Os resultados obtidos para os filmes de QTS, com e sem adição de HA estão representados nas Figuras 28 e 29.

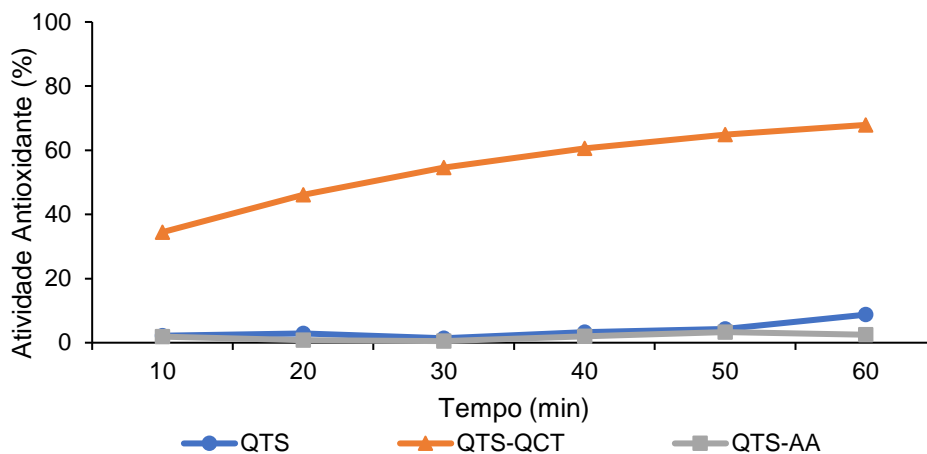


Figura 28- AA% do filme controlo (QTS) e dos filmes dopados (QTS-QCT e QTS-AA), após 1 h de reação no ensaio DPPH.

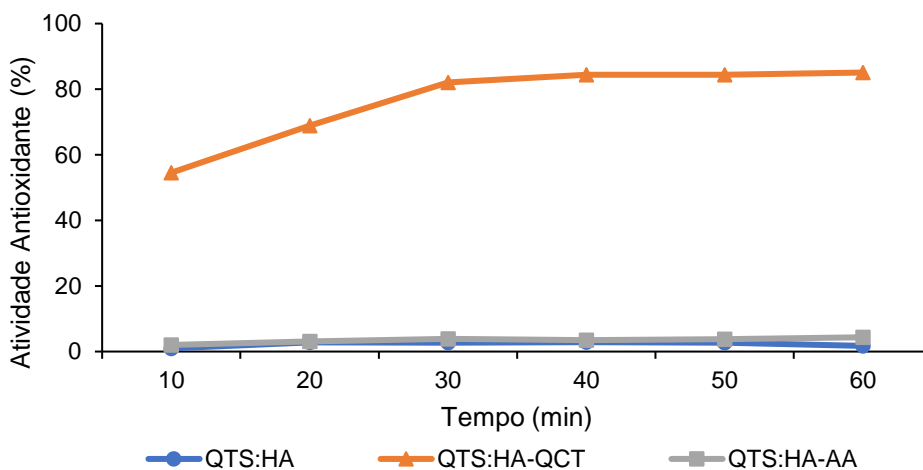


Figura 29- AA% do filme controlo (QTS:HA) e dos filmes dopados (QTS:HA-QCT e QTS:HA-AA), após 1 h de reação no ensaio DPPH.

Os resultados da %AA obtida para cada filme apresentam-se resumidos na Tabela 4.

Tabela 4- Resultados dos ensaios antioxidantes, dos filmes de QTS e QTS:HA, ao final de 1 h.

Filmes	Atividade Antioxidante (%)
QTS	9
QTS:HA	2
QTS-QCT	68
QTS:HA-QCT	85
QTS-AA	2
QTS:HA-AA	4

A análise dos resultados apresentados permite verificar que o filme de QTS não apresenta praticamente atividade antioxidante, uma vez que a redução observada foi de apenas 9% da absorvância inicial. Por outro lado, o filme QTS-QCT apresentou um aumento notável da sua AA% ao longo do tempo, alcançando uma atividade antioxidante de 68% após 1 h, o que indica que a presença de QCT no filme melhorou consideravelmente a capacidade do filme de neutralizar os radicais DPPH. No entanto, o mesmo não aconteceu para o filme QTS-AA, que apenas apresentou uma AA% de 2%, um resultado que não seria de esperar, já que se sabe que o ácido ascórbico tem uma grande capacidade antioxidante.

O filme controlo QTS:HA apresentou uma atividade antioxidante relativamente baixa, com apenas uma redução de 2% na absorvância inicial da solução de DPPH, o que sugere que a presença de HA não contribuiu para a melhoria da atividade antioxidante do filme. Por outro lado, o filme QTS:HA-QCT demonstrou uma %AA de 54% logo nos primeiros 10 min, destacando assim a capacidade da QCT neutralizar os radicais livres. Ao final de 1 h, esse valor aumentou para 85%, revelando assim que a HA trouxe benefícios na melhoria da capacidade antioxidante deste filme, pois na ausência de HA a sua %AA atingiu apenas os 68%. Igualmente ao filme QTS-AA, o filme com a presença de HA exibiu uma %AA muito baixa, de apenas 4%, um resultado inesperado dada a alta capacidade antioxidante o AA, concluindo-se que a presença de HA também não foi benéfica para este filme.

3.2.3. Filmes de alginato

O estudo efetuado focou-se na determinação da AA% ao final de 1 h de reação, do filme controlo e dos filmes dopados com QCT e AA. Os resultados obtidos para os filmes de ALG, com e sem adição de HA estão representados nas Figuras 30 e 31.

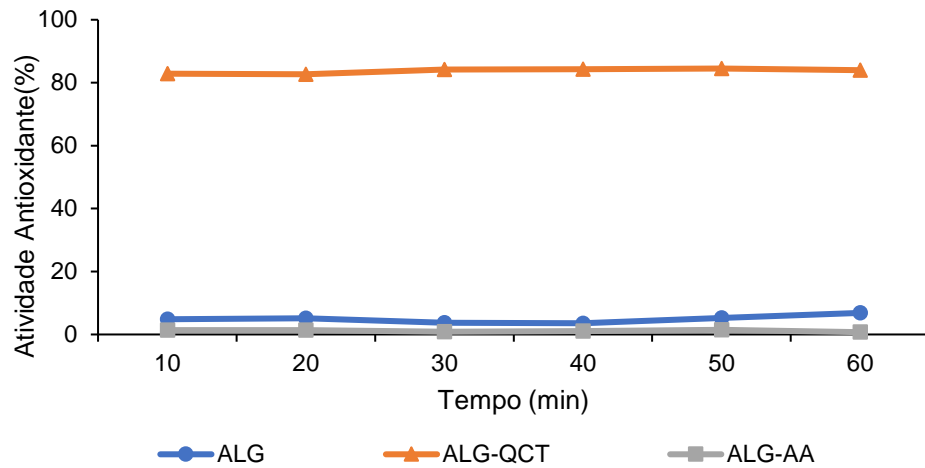


Figura 30- AA% do filme controlado (ALG) e dos filmes dopados (ALG-QCT e ALG-AA), após 1 h de reação no ensaio DPPH.

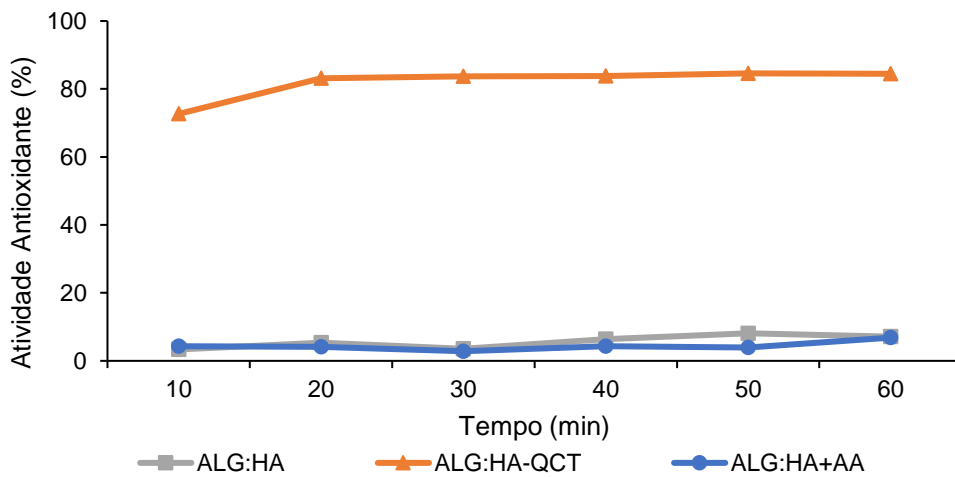


Figura 31- AA% do filme controlado (ALG:HA) e dos filmes dopados (ALG:HA-QCT e ALG:HA-AA), após 1 h de reação no ensaio DPPH.

Os resultados da %AA obtida para cada filme estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5- Resultados dos ensaios antioxidantes, dos filmes de ALG e ALG:HA, ao final de 1 h.

Filmes	Atividade Antioxidante (%)
ALG	7
ALG:HA	7
ALG-QCT	85
ALG:HA-QCT	85
ALG-AA	1
ALG:HA-AA	7

Através dos resultados apresentados pode-se observar que o filme controlo de ALG apresentou uma %AA baixa, de apenas 7%, indicando assim uma capacidade antioxidante limitada. Por outro lado, o filme ALG-QCT demonstrou ter uma excelente %AA, atingindo uma redução de 82% da absorvância inicial passados 10 min, permanecendo alta e atingindo 85% ao final de 1 h, destacando assim a influência positiva que a QCT teve no filme de ALG e a sua capacidade de neutralizar rapidamente os radicais livres. Inesperadamente, o filme ALG-AA apenas apresentou uma %AA de 1%.

Verifica-se também que o filme ALG:HA apresenta uma baixa capacidade antioxidante. Quando ocorre a incorporação de QCT no filme, observa-se uma diferença notável na %AA, pois o seu valor nos primeiros 10 min foi de 73%, alcançando 85% após 1 h. Já o filme ALG:HA-AA apenas apresentou uma atividade antioxidante de 7%. Estes resultados sugerem que os filmes que contêm HA apresentaram uma atividade antioxidante muito semelhante em relação aos filmes sem HA, concluindo-se assim que a sua presença não influenciou positivamente a capacidade antioxidante dos filmes produzidos. Em relação ao filme de ALG-QCT, notou-se que este atinge uma %AA mais elevada nos primeiros 10 min do que o filme de ALG:HA-QCT.

3.2.4. Análise comparativa dos resultados dos ensaios antioxidantes

Ao analisar os resultados obtidos dos ensaios de atividade antioxidante dos filmes produzidos com diferentes materiais, incluindo QTS, ALG e HA, bem como os antioxidantes QCT e AA pode-se afirmar que a QCT mostrou manter as suas propriedades antioxidantes quando incorporada nos filmes, ao contrário do AA que não manteve a sua estrutura e consequentemente perdeu as suas propriedades antioxidantes.

Como esperado, os filmes controlo apresentaram uma atividade antioxidante irrelevante. Os resultados apresentados mostram que a adição de QCT em qualquer uma das base poliméricas permite a produção de misturas poliméricas com propriedades antioxidantes. No que se refere à adição de HA, esta não acrescentou melhorias quando incorporada nos filmes, à exceção do filme de QTS:HA-QCT, que aumentou para 85% comparativamente ao filme sem HA, com 68%.

3.3. Análise morfológica por microscopia ótica

Conforme referido, neste trabalho foram produzidos filmes de QTS e ALG, sem e com incorporação dos diferentes antioxidantes em estudo, designadamente a QCT e o AA. Ao visualizar os filmes no microscópio, não foram notadas diferenças significativas em relação à

incorporação dos compostos. Para uma melhor e eficaz avaliação morfológica da estrutura superficial e aspetos topográficos dos diversos filmes, pretende-se que as amostras possam ser visualizadas futuramente à escala nanométrica num microscópio eletrónico de varrimento.

3.3.1. Filmes de quitosano

Ao observar os filmes de QTS através de um microscópio ótico, é possível notar a presença de alguns defeitos e rugosidades na sua superfície, que não são visíveis à vista desarmada. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na morfologia entre os filmes controlo e os filmes dopados com os antioxidantes. A presença de HA parece ter alterado ligeiramente a morfologia dos filmes, conforme pode ser observado na Figura 32.

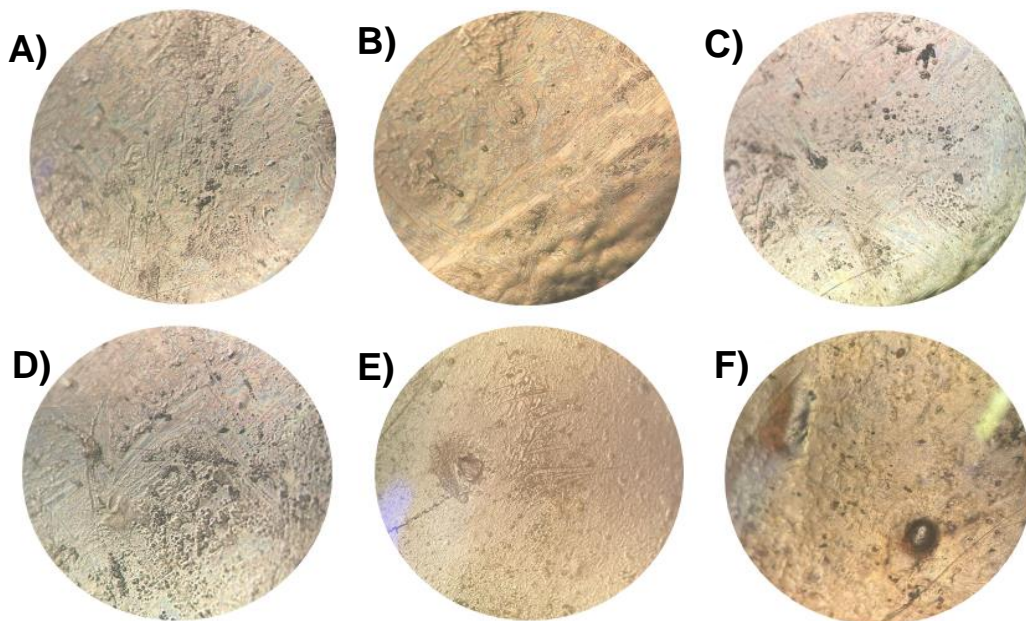


Figura 32- Imagens microscópicas dos filmes de QTS com uma ampliação de 100x; **A)** QTS; **B)** QTS-QCT; **C)** QTS-AA; **D)** QTS:HA; **E)** QTS:HA-QCT e **F)** QTS:HA-AA.

3.3.2. Filmes de alginato

Através da Figura 33 podem ser observados os filmes de ALG analisados por um microscópio ótico, onde é possível notar a presença de alguns defeitos e rugosidades na sua superfície, que não são visíveis à vista desarmada. No entanto, com a incorporação da QCT e do AA, não foram observadas diferenças significativas na morfologia em relação aos filmes de controlo. Em relação à presença de HA, esta parece ter alterado a morfologia e a textura dos filmes, aumentando a presença de rugosidades, o que pode indicar uma maior porosidade na superfície desses filmes.

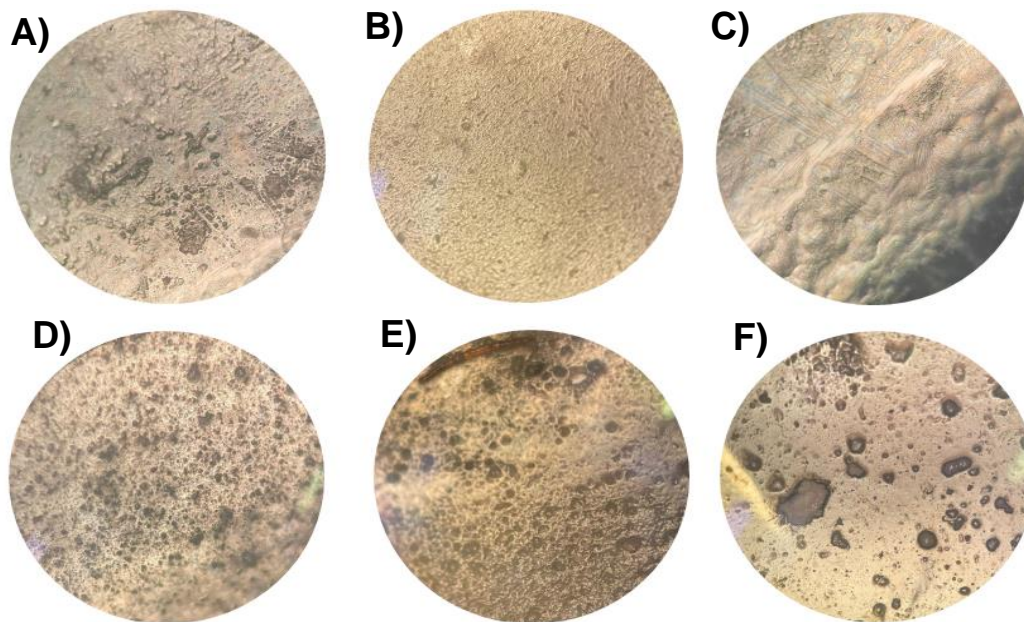


Figura 33- Imagens microscópicas dos filmes de ALG com uma ampliação de 100x; **A)** ALG; **B)** ALG-QCT; **C)** ALG-AA; **D)** ALG:HA; **E)** ALG:HA-QCT e **F)** ALG:HA-AA.

3.4. Ensaios de liberação controlada

De modo a realizar os ensaios de liberação controlada foram obtidos os espectros UV-Vis dos compostos (QCT e AA) incorporados nos diferentes filmes, que se apresentam na Figura 34. Para cada composto foi selecionado o comprimento de onda (λ) onde a absorvância é máxima e os ensaios de liberação, foram realizados, em etanol, a 255 nm e 245 nm, para a QCT e AA, respetivamente.

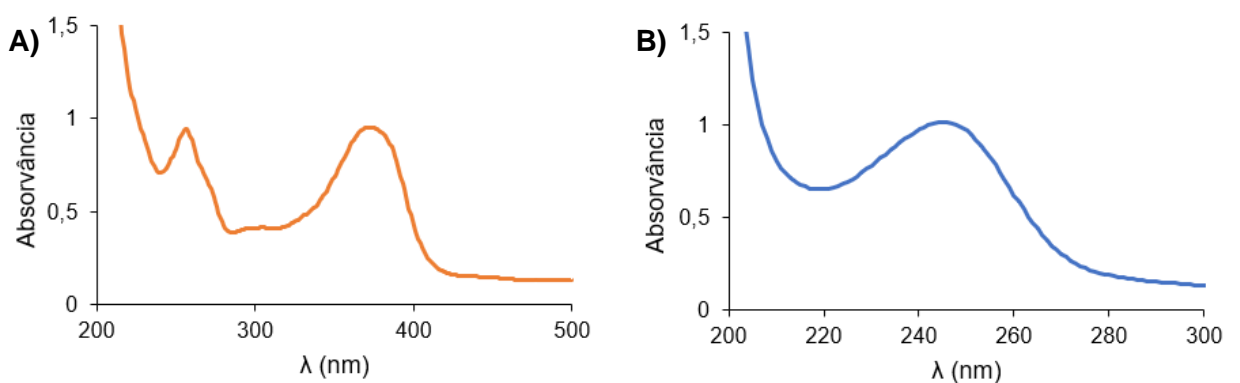


Figura 34- Espectros de UV-vis (em etanol) dos compostos utilizados; **A)** QCT ($3,97 \times 10^{-5}$ mol/L); **B)** AA ($7,5 \times 10^{-5}$ mol/L).

3.4.1. Filmes de quitosano

Os perfis de libertação, em etanol, dos filmes de QTS (QTS-QCT, QTS-AA, QTS:HA-QCT e QTS:HA-AA) foram realizados em etanol, durante 48 h, e os resultados apresentam-se na Figura 35.

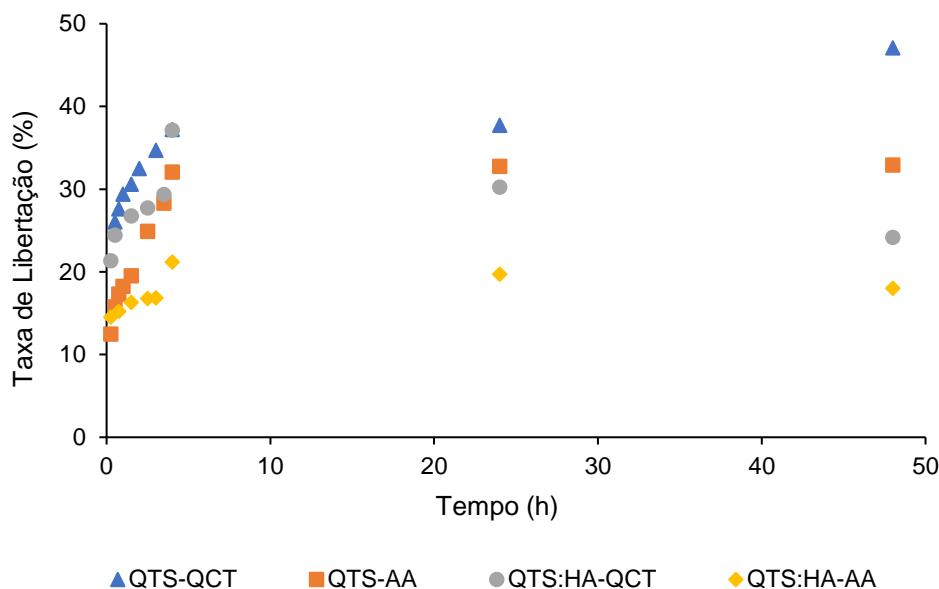


Figura 35- Perfis de libertação dos filmes QTS-QCT, QTS-AA, QTS:HA-QCT e QTS:HA-AA, em função do tempo.

Na Tabela 6 encontram-se sumarizados os valores das taxas de libertação dos diversos filmes de QTS produzidos, ao final de 4 h, 24 h e 48 h de ensaio.

Tabela 6- Resultados da libertação, em etanol, dos filmes de QTS, após 4 h, 24 h e 48 h.

Filmes	Taxa de Libertação (%)		
	4h	24h	48h
QTS-QCT	37	38	47
QTS:HA-QCT	37	30	24
QTS-AA	32	33	33
QTS:HA-AA	21	20	18

A análise dos resultados permite verificar que, nas condições testadas, a libertação de ambos os compostos em estudo ocorre nas primeiras 4 h de ensaio. Os valores de libertação são semelhantes e moderados, tendo-se observado um valor de 37% para a QCT e 32% para o AA ao final de 4 h de ensaio. De registar que, prolongando o ensaio para as 48 h não se observa a alteração na libertação de AA, e o aumento da libertação de QCT é baixo, atingindo

os 47%, facto que sugere que ambos os compostos se mantêm “integrados” na matriz dos filmes de QTS.

Em relação à incorporação de HA nos filmes de quitosano, esta não trouxe vantagens nas taxas de libertação. A análise dos resultados mostra que a libertação dos antioxidantes em questão foi menor, o que sugere que a sua presença, ao contrário do que era esperado, não trouxe um efeito de porosidade mas sim num efeito de absorção ou retenção dos compostos dentro da matriz polimérica, dificultando assim a sua libertação.

3.4.2. Filmes de alginato

Os perfis de libertação, em etanol, dos filmes de ALG (ALG-QCT, ALG-AA, ALG:HA-QCT e ALG:HA-AA) foram realizados em etanol, durante 48 h, e apresentam-se na Figura 36.

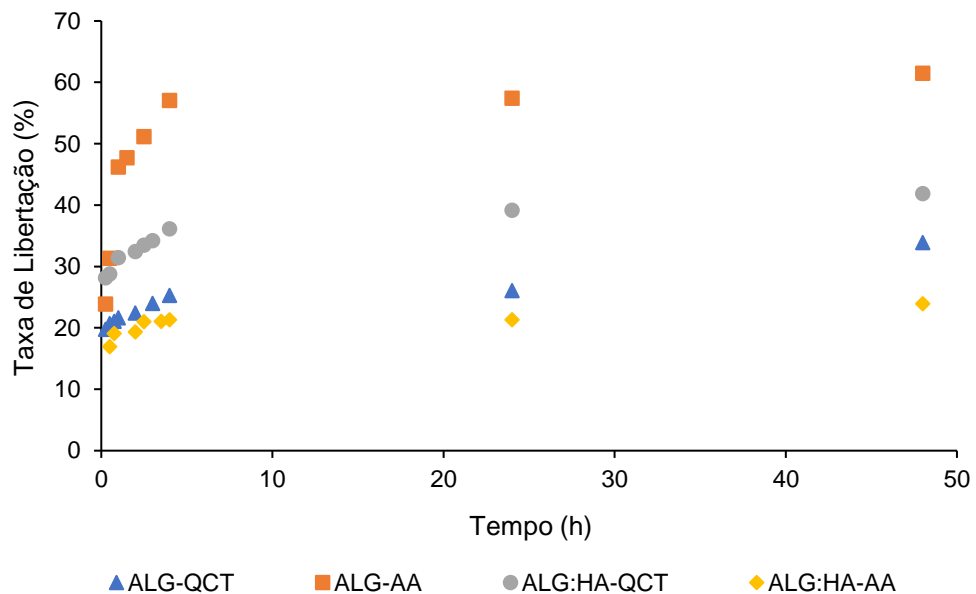


Figura 36- Perfis de libertação dos filmes ALG-QCT, ALG-AA, ALG:HA-QCT e ALG:HA-AA, em função do tempo.

Na Tabela 7 encontram-se sumarizados os valores das taxas de libertação dos diversos filmes de ALG produzidos, ao final de 4 h, 24 h e 48 h de ensaio.

Tabela 7- Resultados da liberação, em etanol, dos filmes de ALG, após 4 h, 24 h e 48 h.

Filmes	Taxa de Liberação (%)		
	4h	24h	48h
ALG-QCT	25	26	34
ALG:HA-QCT	36	39	42
ALG-AA	57	57	61
ALG:HA-AA	21	21	24

Relativamente a estes filmes, os resultados mostram que, nas condições testadas, a liberação dos compostos em estudo ocorre nas primeiras 4 h de ensaio. Para os filmes de ALG, a liberação de AA mostrou-se superior à liberação de QCT, tendo-se observado uma liberação de 57% de AA contra os 25% observados para a QCT nas primeiras 4 h. Também neste caso estes valores não sofreram alterações significativas, subindo ligeiramente para 61% e 34%, ao final de 48 h, para o AA e QCT, respetivamente.

A incorporação de HA nos filmes de ALG conduziu a resultados diferentes com QCT e AA. Efetivamente as taxas de liberação de QCT aumentaram ligeiramente relativamente às observadas nos filmes de ALG, de 36% contra 25% nas primeiras 4 h, enquanto que as taxas de liberação de AA foram significativamente mais baixas, de 57% contra 21% nas primeiras 4 h. Este último resultado está em concordância com o obtido para os filmes de QTS-AA, sugerindo que deverá existir uma relação entre a presença de HA e a retenção de AA nas matrizes de QTS e ALG.

3.4.3. Análise conjunta dos resultados de liberação

Na generalidade, as taxas de liberação obtidas de QCT e AA são relativamente baixas a moderadas nos filmes de QTS e ALG, e não sofrem alterações significativas com a introdução de HA.

Deste modo, os valores obtidos podem dever-se às características dos materiais utilizados nos filmes ou das condições de ensaio. Ainda assim, os filmes produzidos podem encontrar aplicações em situações que pretendam uma liberação dos compostos a longo prazo e em baixas quantidades, como, por exemplo, curativos para cicatrização de feridas.

Apesar dos filmes incorporados com AA terem apresentado resultados de liberação, atingindo no máximo 61% para o filme de ALG, é importante referir que o pico de medição desses resultados foi em torno de 270 nm, não coincidindo com o pico característico do AA.

Estes resultados sugerem uma possível degradação do AA e formação de um novo composto com consequente perda das suas propriedades antioxidantes, o que explica o facto dos resultados dos ensaios antioxidantes terem sido negativos para estes filmes. Para validar estes resultados e identificar o composto formado durante a degradação do AA nos filmes, sugere-se o uso de técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massa (MS).

3.5. Produção de peças 3D

3.5.1. Validação e arranque em funcionamento da impressora por extrusão por seringa

A fase da validação representou um papel fundamental neste trabalho e permitiu confirmar o bom funcionamento da impressora, passando pela montagem do módulo, posterior incorporação na impressora, otimização dos parâmetros de impressão e, por fim, impressão das peças pretendidas.

Desta forma, na Figura 37 estão presentes as diferentes peças impressas, anteriormente modeladas no SolidWorks, e posteriormente impressas pela impressora Anet A8 e BigRep Studio como explicado no ponto 2 – Materiais e Métodos.



Figura 37- Peças impressas.

De seguida, com todas as peças impressas procedeu-se assim à montagem do módulo e à sua montagem na impressora (Figura 38). A validação começou pela verificação de todas as peças montadas, de forma a garantir que estas se encontravam corretamente alinhadas e seguras.

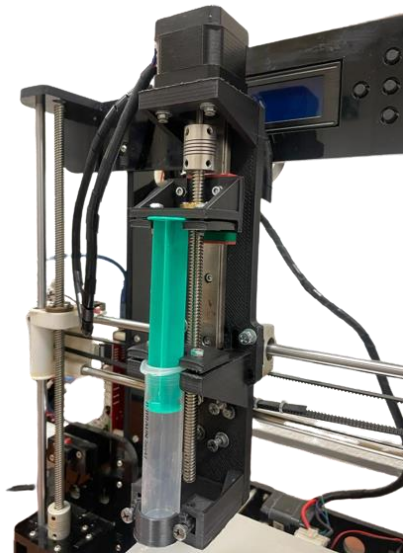


Figura 38- Módulo de seringa montado na impressora.

De seguida, o software da impressora 3D foi configurado de forma a que os parâmetros iniciais, como o fluxo e a velocidade de impressão estivessem de acordo com o pretendido. O

material de impressão, ou seja, a mistura de ALG/QTS e GEL foi colocado na seringa, verificando-se que não existiam obstruções no bico que comprometessem a extrusão do material durante o processo de impressão. Foi realizado o zero da impressora, ou seja, a calibração dos eixos de maneira a garantir que esta se encontrasse completamente alinhada e foi também ajustada a altura da mesa de impressão.

Posteriormente, foi realizada uma peça de teste de um paralelepípedo de dimensões 24x24 mm e uma altura de 5 mm, com uma parede externa com 2 mm, impressa com uma velocidade de 30 mm/s, que pode ser vista na Figura 39.

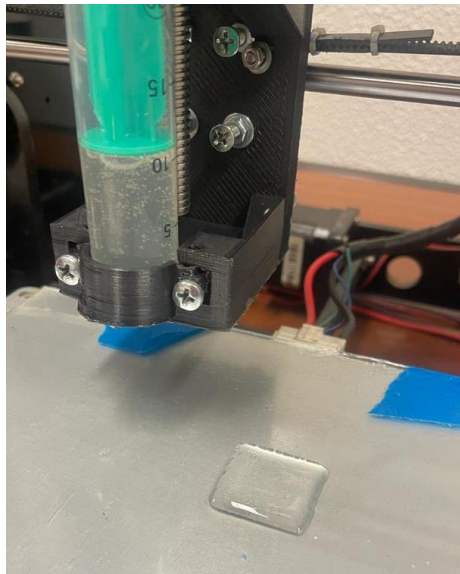


Figura 39- Peça de teste com a mistura de ALG e GEL.

Apesar desta peça não ter ficado com a altura/geometria pretendida, em geral, a impressora revelou um bom funcionamento, demonstrando uma boa capacidade de extrusão controlada.

3.5.2. Impressão e peças 3D obtidas

Após o teste inicial da impressora, colocou-se a peça impressa de ALG e GEL numa solução de CaCl_2 100 mM por 2 h, para que ocorresse o processo de *crosslinking*, obtendo-se uma estrutura relativamente rígida e resistente (Figura 40). No entanto, durante a impressão desta peça, foi evidente que existiam algumas limitações em relação a obter uma altura de 5 mm e uma parede externa de 2 mm, e, por isso, a estratégia adotada passou pela impressão de *scaffolds*.



Figura 40- Peça de teste após 2 h de imersão na solução de CaCl_2 100 mM.

Desta forma, começou-se por efetuar impressões com a mistura de ALG e GEL. Primeiramente, foi selecionado um padrão de enchimento *lines*, e uma velocidade de impressão de 30 mm/s. A peça foi impressa e, de seguida, colocada numa solução de CaCl_2 500 mM durante 15 min, para que se obtesse uma estrutura mais rígida, como explicado anteriormente. Na figura abaixo é possível observar a peça impressa antes (Figura 41A) e depois (Figura 41B) da sua imersão na solução, onde se verificou que em algumas áreas houve falta de deposição do material, o que sugere que havia uma necessidade de melhorar a uniformidade da extrusão.

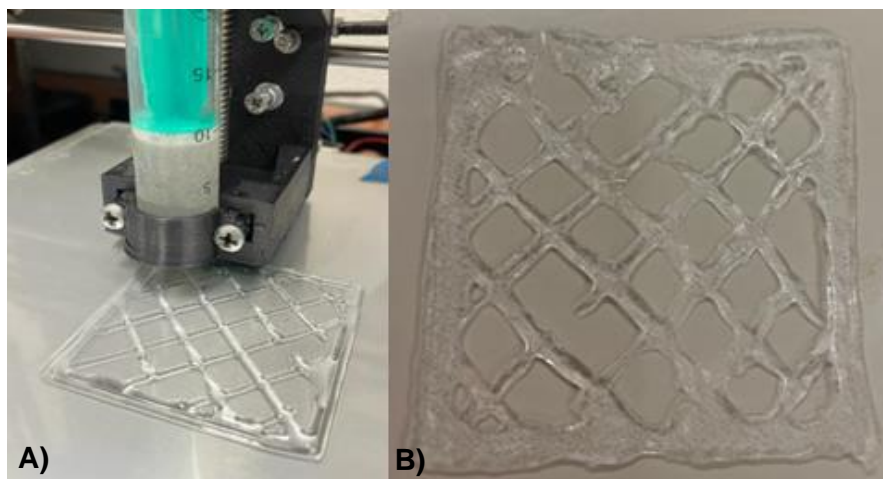


Figura 41- Scaffold de ALG e GEL impresso com $v=30$ mm/s e padrão de enchimento *lines* **A)** antes e **B)** depois da imersão na solução de CaCl_2 500 mM.

Para tentar resolver esse problema, uma agulha com um diâmetro de 0,84 mm foi adicionada à seringa, de forma a melhorar a deposição do material para que esta fosse mais uniforme. Inicialmente, testou-se uma impressão com o mesmo padrão (*lines*) e $v=30$ mm/s mas, durante a impressão verificou-se que o problema de falta de material em algumas zonas continuava (Figura 42) e, por isso, decidiu-se, primeiramente reduzir a velocidade para metade (15 mm/s), onde se notou que ocorreram melhorias significativas da peça final em

relação à deposição do material (Figura 43). No entanto, decidiu-se mudar o padrão de enchimento para *grid* de forma a obter melhores resultados.

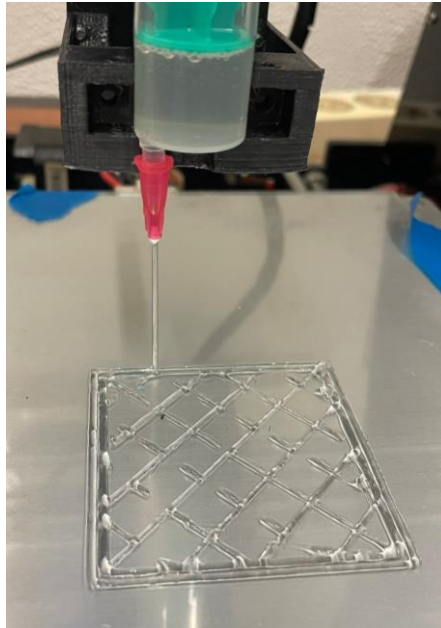


Figura 42- Impressão do *scaffold* de ALG e GEL com agulha, padrão de enchimento *lines* e $v=30$ mm/s.



Figura 43- *Scaffold* obtido de ALG e GEL, após *crosslinking* em solução de CaCl_2 500 mM, com $v=15$ mm/s.

Com um novo padrão selecionado, a velocidade de impressão foi reduzida para 10 mm/s, o que permitiu um controle mais preciso do material durante o processo de deposição do material. As alterações de padrão e adição de agulha à seringa apresentaram uma melhoria significativa no aspecto dos *scaffolds* impressos, no entanto, a redução da velocidade para 10 mm/s piorou significativamente a qualidade das peças impressas, como pode ser visto na Figura 44. Tal como anteriormente, a peça foi impressa e imersa numa solução de CaCl_2 500 mM, durante 15 min, obtendo-se uma estrutura rígida e uniforme (Figura 44B). É possível notar que o *scaffold* obtido, apesar de apresentar uma boa estrutura, demonstrou

uma pequena deformação, que se deve ao processo de remoção da peça da base da impressora para colocar dentro da solução.

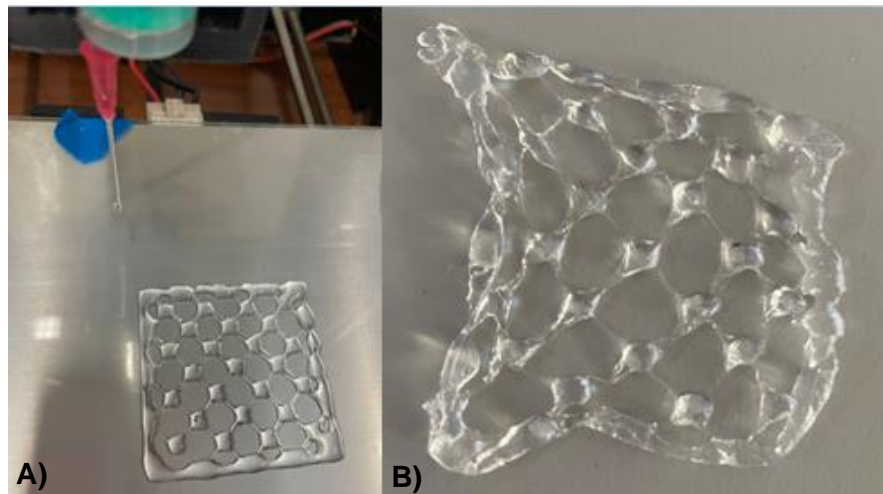


Figura 44- Scaffold de ALG e GEL impresso com $v=10$ mm/s e padrão *grid* **A)** antes e **B)** depois da imersão na solução de CaCl_2 500 mM.

Posto isso, decidiu-se testar a mistura de QTS e GEL com a agulha e com os parâmetros de $v=15$ mm/s e padrão *grid*. Apesar de se obter uma boa estrutura e com uma uniformidade em relação à deposição do material, surgiu um problema em relação à remoção das peças da base da impressora, mesmo após borrifar com a solução de NaOH. Assim, decidiu-se mudar de estratégia e, imprimiu-se diretamente a mistura para uma base de vidro em vez de se imprimir na mesa de impressora, como pode ser visto na Figura 45, permitindo assim que se mergulhasse diretamente o vidro na solução de NaOH.

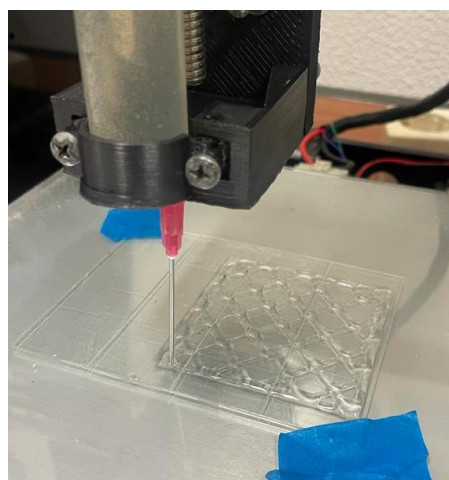


Figura 45- Impressão do scaffold de QTS e GEL com agulha, padrão de enchimento *grid* e $v=15$ mm/s.

Posteriormente, foram feitas tentativas de *crosslinking* da estrutura obtida numa solução de NaOH com concentração de 500 mM, de onde se verificou que as estruturas

impressas se desfaziam, e não ficavam rígidas como era expectável. Por isso, decidi aumentar-se a concentração desta solução para 1 M, mas o problema persistiu.

4. Conclusões e perspetivas futuras

O presente trabalho teve como objetivo a produção de materiais híbridos biocompatíveis, com base em biopolímeros, com potenciais propriedades antioxidantes. Para esse fim foram produzidos com 4 matrizes distintas, designadamente i) quitosano (QTS), ii) alginato (ALG), iii) quitosano e hidroxiapatite (QTS e HA) e iv) alginato e hidroxiapatite (ALG e HA), dopados com dois compostos antioxidantes, a quercetina (QCT) e o ácido ascórbico (AA). Em paralelo foi desenvolvido e otimizado um sistema para impressão 3D por extrusão por seringa.

De forma a avaliar as propriedades antioxidantes dos compostos e filmes produzidos, foram realizados ensaios antioxidantes, com o método do DPPH. Constatou-se que, em geral, a atividade antioxidante foi conseguida pela incorporação da QCT nos filmes, dado que os filmes controlo apresentaram uma atividade antioxidante reduzida, ao contrário dos filmes dopados. No que se refere à incorporação de AA, nenhuma das bases estudadas estabilizou a sua estrutura e este composto degradou-se e perdeu o seu efeito antioxidante. Em relação à HA, esta pareceu não apresentar melhorias significativas nos valores obtidos.

Foram realizados estudos de libertação controlada, em etanol, ao longo de 48 h, por espectroscopia UV-Vis. Verificou-se que os perfis de libertação eram semelhantes, obtendo-se valores baixos a moderados. Nos filmes produzidos com QTS, as taxas de libertação obtidas foram superiores para o composto QCT em relação ao AA, sem a presença de HA, contrariamente aos filmes de ALG, em que a libertação obtida para o filme de ALG-AA atingiu os 61%, o valor mais alto obtido em todos os ensaios. Já com a presença de HA, os valores de libertação obtidos foram reduzidos para os dois compostos nos filmes de QTS, obtendo-se um valor de apenas 18% para o filme de QTS:HA-AA. Para os filmes de ALG, a adição de HA apresentou uma ligeira subida nas taxas de libertação para os filmes dopados com QCT, no entanto, para o AA os resultados diminuíram. Conclui-se assim que, a adição de HA não apresentou melhorias quando incorporada nos filmes, reduzindo as taxas de libertação dos filmes QTS-QCT, QTS-AA e ALG-AA. Conclui-se também que todas as taxas de libertação obtidas foram relativamente baixas, o que pode dever-se às características dos materiais utilizados nos filmes ou das condições de ensaio, sugerindo-se que os filmes produzidos podem ser úteis em situações em que se pretende uma libertação dos compostos a longo prazo e em baixas quantidades.

Verificou-se também que o projeto e a montagem do módulo de seringa foram bem-sucedidos, permitindo a adaptação da impressora 3D existente para uma impressora por

extrusão por seringa, resultando assim numa impressora viável, com materiais acessíveis e de baixo custo. A impressão das estruturas de ALG e QTS apresentou diversos desafios, em relação à viscosidade das misturas, aos parâmetros de impressão e no processo de *crosslinking*.

Após diversos testes, conclui-se que os melhores parâmetros de impressão para os *scaffolds* de ALG e GEL incluíram um *infill pattern* “*grid*”, uma velocidade de impressão de 15 mm/s e uma agulha com um diâmetro de 0,84 mm. Já para a mistura de QTS e GEL, estes parâmetros parecem ter resultado na sua impressão, no entanto, no processo de *crosslinking* não foi possível obter uma estrutura rígida como era expectável, mesmo aumentado a concentração da solução de NaOH, o que leva a concluir que a produção das estruturas de ALG foi mais bem-sucedida do que as de QTS.

Como perspetivas futuras sugere-se ajustar a formulação dos filmes, incluindo a concentração dos antioxidantes e de HA, que pode resultar em resultados de libertação diferentes.

Sugere-se também testar a incorporação de outros compostos com atividade antioxidante comprovada, de forma a comparar os seus perfis de libertação com os obtidos neste trabalho, bem como testar os ensaios de libertação em meio fisiológico (tampão PBS pH 7,4), para validar o modelo de libertação em outros meios.

Outra sugestão passa pela melhoria do *design* de algumas peças do módulo de seringa, bem como ajustes adicionais em termos de viscosidade das misturas desenvolvidas e parâmetros de impressão. A impressão de peças com os antioxidantes estudados e diferentes geometrias, realizando ensaios de libertação controlada, de forma a perceber se a geometria e tamanho podem influenciar na taxa de libertação. Por fim, a produção de misturas com outros biopolímeros para posterior impressão.

Uma parte dos resultados deste trabalho foram apresentados como comunicação em poster numa conferência nacional:

Catarina Paz, Inês Amaral, Ivo Bragança, Ana Catarina Sousa. 2023. "Manufacturing chitosan and alginate films and 3D structures with potential antioxidant activity". CQE Days, 25-26 de maio de 2023.

5. Referências Bibliográficas

Abd El-Hack, M. E., El-Saadony, M. T., Shafi, M. E., Zabermawi, N. M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Abd El-Hakim, Y. M., & Al-Sagheer, A. A. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2726–2744. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.153>

Abdullah, M., Jamil, R. T., & Attia, F. N. (2022). *Vitamin C (Ascorbic Acid)*. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Abourehab, M. A. S., Pramanik, S., Abdelgawad, M. A., Abualsoud, B. M., Kadi, A., Ansari, M. J., & Deepak, A. (2022). Recent Advances of Chitosan Formulations in Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10975. <https://doi.org/10.3390/ijms231810975>

Adeosun, S., O., Ilumuanya, M., O., Gbenebor, O.P., O. Dada, M.O, & Odili, C.C. (2020). Biomaterials for Drug Delivery: Sources, Classification, Synthesis, Processing, and Applications. In *Advanced Functional Materials*. 141-167. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93368>

Adepu, S., & Ramakrishna, S. (2021). Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*, 26(19), 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>

Anet 3D Printer. (2023). *ANET A8 DIY FDM 3D PRINTER*. <https://shop.anet3d.com/>

ASTM International. (2012). *ASTM F2792-12a, Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies*. www.astm.org

Bandyopadhyay, A., Bose, S., & Das, S. (2015). 3D printing of biomaterials. *MRS Bulletin*, 40(2), 108–115. <https://doi.org/10.1557/mrs.2015.3>

Barra, P. A., Márquez, K., Gil-Castell, O., Mujica, J., Ribes-Greus, A., & Faccini, M. (2019). Spray-Drying Performance and Thermal Stability of L-Ascorbic Acid Microencapsulated with Sodium Alginate and Gum Arabic. *Molecules*, 24(16), 2872. <https://doi.org/10.3390/molecules24162872>

Beg, S., Almalki, W. H., Malik, A., Farhan, M., Aatif, M., Rahman, Z., Alruwaili, N. K., Alrobaian, M., Tarique, M., & Rahman, M. (2020). 3D printing for drug delivery and

biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 25(9), 1668–1681. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.07.007>

Bhatia, S. (2016). Natural Polymers vs Synthetic Polymer. In *Natural Polymer Drug Delivery Systems* (pp. 95–118). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41129-3_3

Borandeh, S., van Bochove, B., Teotia, A., & Seppälä, J. (2021). Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 173, 349–373. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.022>

Bruschi, M. L. (2015). *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 15–28). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00002-3>

Chaturvedi, K., Ganguly, K., More, U. A., Reddy, K. R., Dugge, T., Naik, B., Aminabhavi, T. M., & Noolvi, M. N. (2019). Sodium alginate in drug delivery and biomedical areas. In *Natural Polysaccharides in Drug Delivery and Biomedical Applications* (pp. 59–100). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817055-7.00003-0>

Chen, B., Huang, L., Ma, R., & Luo, Y. (2023). 3D printed hollow channeled hydrogel scaffolds with antibacterial and wound healing activities. *Biomedical Materials*, 18(4), 045023. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/acd977>

Chia, H. N., & Wu, B. M. (2015). Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of Biological Engineering*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0001-4>

Deb, P. K., Kokaz, S. F., Abed, S. N., Paradkar, A., & Tekade, R. K. (2019). Pharmaceutical and Biomedical Applications of Polymers. In *Basic Fundamentals of Drug Delivery* (pp. 203–267). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00006-6>

Fadilah, N. I. M., Phang, S. J., Kamaruzaman, N., Salleh, A., Zawani, M., Sanyal, A., Maarof, M., & Fauzi, M. B. (2023). Antioxidant Biomaterials in Cutaneous Wound Healing and Tissue Regeneration: A Critical Review. *Antioxidants*, 12(4), 787. <https://doi.org/10.3390/antiox12040787>

Fang, Y., Guo, Y., Liu, T., Xu, R., Mao, S., Mo, X., Zhang, T., Ouyang, L., Xiong, Z., & Sun, W. (2022). Advances in 3D Bioprinting. *Chinese Journal of Mechanical Engineering: Additive Manufacturing Frontiers*, 1(1), 100011. <https://doi.org/10.1016/j.cjmeam.2022.100011>

Fiume, E., Magnaterra, G., Rahdar, A., Verné, E., & Baino, F. (2021). Hydroxyapatite for Biomedical Applications: A Short Overview. *Ceramics*, 4(4), 542–563. <https://doi.org/10.3390/ceramics4040039>

Gandhi, K.J., Deshmane, S.V., & Biyani, K.R. (2012). Polymers in pharmaceutical drug delivery system: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 14(2), 57–66.

Ghafouri-Fard, S., Shabestari, F. A., Vaezi, S., Abak, A., Shoorei, H., Karimi, A., Taheri, M., & Basiri, A. (2021). Emerging impact of quercetin in the treatment of prostate cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 138, 111548. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111548>

Gokhare, V. G., Raut, D. N., & Shinde, D. K. (2017). A Review paper on 3D-Printing Aspects and Various Processes Used in the 3D-Printing. *International Journal of Engineering Research & Technology*, 6(06), 953-958.

Hariyadi, D. M., & Islam, N. (2020). Current Status of Alginate in Drug Delivery. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2020, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2020/8886095>

Hegde, V., Uthappa, U. T., Altalhi, T., Jung, H.Y., Han, S. S., & Kurkuri, M. D. (2022). Alginate based polymeric systems for drug delivery, antibacterial/microbial, and wound dressing applications. *Materials Today Communications*, 33, 104813. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104813>

Hosseini, A., Razavi, B. M., Banach, M., & Hosseinzadeh, H. (2021). Quercetin and metabolic syndrome: A review. *Phytotherapy Research*, 35(10), 5352–5364. <https://doi.org/10.1002/ptr.7144>

Hsissou, R., Seghiri, R., Benzekri, Z., Hilali, M., Rafik, M., & Elharfi, A. (2021). Polymer composite materials: A comprehensive review. *Composite Structures*, 262, 113640. <https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2021.113640>

Hussain, S., Malakar, S., & Arora, V. K. (2022). Extrusion-Based 3D Food Printing: Technological Approaches, Material Characteristics, Printing Stability, and Post-processing. *Food Engineering Reviews*, 14(1), 100–119. <https://doi.org/10.1007/s12393-021-09293-w>

Hussin, M. S.F., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., & Wahap, M. A.A. (2022). Extraction of natural hydroxyapatite for biomedical applications—A review. *Heliyon*, 8(8), e10356. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10356>

Huynh, C. T., & Lee, D. S. (2015). Controlled Release. In *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials* (pp. 439–449). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-29648-2_314

Jaipan, P., Nguyen, A., & Narayan, R. J. (2017). Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *MRS Communications*, 7(3), 416–426. <https://doi.org/10.1557/mrc.2017.92>

Jamróz, W., Szafraniec, J., Kurek, M., & Jachowicz, R. (2018). 3D Printing in Pharmaceutical and Medical Applications – Recent Achievements and Challenges. *Pharmaceutical Research*, 35(9), 176. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2454-x>

Jiang, Z., Diggle, B., Tan, M. L., Viktorova, J., Bennett, C. W., & Connal, L. A. (2020). Extrusion 3D Printing of Polymeric Materials with Advanced Properties. *Advanced Science*, 7(17), 2001379. <https://doi.org/10.1002/advs.202001379>

Kabir, I. I., Sorrell, C. C., Mofarah, S. S., Yang, W., Yuen, A. C. Y., Nazir, M. T., & Yeoh, G. H. (2021). Alginate/Polymer-Based Materials for Fire Retardancy: Synthesis, Structure, Properties, and Applications. *Polymer Reviews*, 61(2), 357–414. <https://doi.org/10.1080/15583724.2020.1801726>

Kaur, M., Sharma, A., Puri, V., Aggarwal, G., Maman, P., Huanbutta, K., Nagpal, M., & Sangnim, T. (2023). Chitosan-Based Polymer Blends for Drug Delivery Systems. *Polymers*, 15(9), 2028. <https://doi.org/10.3390/polym15092028>

Lai, J., Wang, C., & Wang, M. (2021). 3D printing in biomedical engineering: Processes, materials, and applications. *Applied Physics Reviews*, 8(2), 021322. <https://doi.org/10.1063/5.0024177>

Lakhanpal, P., & Rai, D. K. (2007). Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2(2), 22-37. <https://doi.org/10.4314/ijmu.v2i2.39851>

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

Li, M., Wang, Y., Chen, Y., & Zhang, S. (2014). A luminescent ionogel based on an europium(iii)-coordinated carboxyl-functionalized ionic liquid and gelatin. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(7), 1025–1030. <https://doi.org/10.1039/c4pp00076e>

Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A. (2010). Polymers for Drug Delivery Systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1(1), 149–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847>

Lin, K., & Chang, J. (2015). Structure and properties of hydroxyapatite for biomedical applications. In *Hydroxyapatite (Hap) for Biomedical Applications* (pp. 3–19). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-033-0.00001-8>

Olmos-Juste, R., Guaresti, O., Calvo-Correas, T., Gabilondo, N., & Eceiza, A. (2021). Design of drug-loaded 3D printing biomaterial inks and tailor-made pharmaceutical forms for controlled release. *International Journal of Pharmaceutics*, 609, 121124. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121124>

Onwubolu, G.C. (2013). *Computer-Aided Engineering Design with SolidWorks*. Imperial College Press. <https://doi.org/10.1142/p761>

Othman, S. I., Alturki, A. M., Abu-Taweel, G. M., Altoom, N. G., Allam, A. A., & Abdelmonem, R. (2021). Chitosan for biomedical applications, promising antidiabetic drug delivery system, and new diabetes mellitus treatment based on stem cell. *International Journal of Biological Macromolecules*, 190, 417–432. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.154>

Ozgen, S., Kilinc, O. K., & Selamoğlu, Z. (2016). Antioxidant Activity of Quercetin: A Mechanistic Review. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 4(12), 1134-1138. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i12.1134-1138.1069>

Padayatty, S., & Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Diseases*, 22(6), 463–493. <https://doi.org/10.1111/odi.12446>

Pandey, I., & Kant, R. (2016). Electrochemical impedance based chiral analysis of anti-ascorbic drug: I -Ascorbic acid and d -ascorbic acid using C-dots decorated conductive polymer nano-composite electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 715–724. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.039>

Paolini, M. S., Fenton, O. S., Bhattacharya, C., Andresen, J. L., & Langer, R. (2019). Polymers for extended-release administration. *Biomedical Microdevices*, 21(2), 45. <https://doi.org/10.1007/s10544-019-0386-9>

Park, B. J., Choi, H. J., Moon, S. J., Kim, S. J., Bajracharya, R., Min, J. Y., & Han, H.K. (2018). Pharmaceutical applications of 3D printing technology: current understanding and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 49, 575-585. <https://doi.org/10.1007/s40005-018-00414-y>

Patrulea, V., Ostafe, V., Borchard, G., & Jordan, O. (2015). Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *97*, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>

Pedro, A. C., Paniz, O. G., Fernandes, I.D.A. A., Bortolini, D. G., Rubio, F. T. V., Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., & Magalhães, W. L. E. (2022). The Importance of Antioxidant Biomaterials in Human Health and Technological Innovation: A Review. *Antioxidants*, *11*(9), 1644. <https://doi.org/10.3390/antiox11091644>

Piccolo, M., Aceto, M., & Vitorino, T. (2019). UV-Vis spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*, *4*(4), 20180008. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0008>

Placone, J. K., & Engler, A. J. (2018). Recent Advances in Extrusion-Based 3D Printing for Biomedical Applications. *Advanced Healthcare Materials*, *7*(8), 1701161. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701161>

Rajak, D. K., Pagar, D. D., Kumar, R., & Pruncu, C. I. (2019). Recent progress of reinforcement materials: a comprehensive overview of composite materials. *Journal of Materials Research and Technology*, *8*(6), 6354–6374. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.09.068>

Rashid, T. U., Sharmeen, S., Biswas, S., Ahmed, T., Mallik, A. K., Shahruzzaman, Md., Sakib, Md. N., Haque, P., & Rahman, M. M. (2019). *Gelatin-Based Hydrogels* (pp. 1601–1641). https://doi.org/10.1007/978-3-319-77830-3_53

Raus, R.A., Nawawi, W. M. F., & Nasaruddin, R. R. (2021). Alginate and alginate composites for biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *16*(3), 280–306. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.10.001>

Sanseverino, J. (2005). Ascorbic Acid. In *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 182–184). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00090-9>

Santos, K. L., Bragança, V. A., Pacheco, L. V., Ota, S. S., Aguiar, C. P., & Borges, R. S. (2022). Essential features for antioxidant capacity of ascorbic acid (vitamin C). *Journal of Molecular Modeling*, *28*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S00894-021-04994-9>

Seoane-Viaño, I., Januskaite, P., Alvarez-Lorenzo, C., Basit, A. W., & Goyanes, A. (2021). Semi-solid extrusion 3D printing in drug delivery and biomedicine: Personalised solutions for healthcare challenges. *Journal of Controlled Release*, *332*, 367–389. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.027>

Sethi, S., & Kaith, B. S. (2022). A review on chitosan-gelatin nanocomposites: Synthesis, characterization and biomedical applications. *Reactive and Functional Polymers*, 179, 105362. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105362>

Shafabakhsh, R., & Asemi, Z. (2019). Quercetin: a natural compound for ovarian cancer treatment. *Journal of Ovarian Research*, 12(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0530-4>

Shen, P., Lin, W., Deng, X., Ba, X., Han, L., Chen, Z., Qin, K., Huang, Y., & Tu, S. (2021). Potential Implications of Quercetin in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12, 689044. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.689044>

Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants – A review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828–835. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>

Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical Sciences*, 34(7), 795–800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>

Srivastava, A., Yadav, T., Sharma, S., Nayak, A., Kumari, A.A., & Mishra, N. (2016). Polymers in Drug Delivery. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4(1), 69–84. <https://doi.org/10.4236/jbm.2016.41009>

Su, A., & Al'Aref, S. J. (2018). History of 3D Printing. In *3D Printing Applications in Cardiovascular Medicine* (pp. 1–10). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803917-5.00001-8>

Su, K., & Wang, C. (2015). Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology Letters*, 37(11), 2139–2145. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1907-0>

Szczęś, A., Hołysz, L., & Chibowski, E. (2017). Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.007>

Telang, P.S. (2013). Vitamin C in dermatology. *Indian Dermatology Online Journal*, 4(2), 143. <https://doi.org/10.4103/2229-5178.110593>

Tomić, S. L., Babić Radić, M. M., Vuković, J. S., Filipović, V. V., Nikodinovic-Runic, J., & Vukomanović, M. (2023). Alginate-Based Hydrogels and Scaffolds for Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 21(3), 177. <https://doi.org/10.3390/md21030177>

Ulises Gordillo Zapana. (2020). *3D Printer for Mashed Potatoes*. <https://fabacademy.org/2020/labs/tecsup/students/ulises-gordillo/>

Villanova, J. C., Oréfice, R. L., & Cunha, A. S. (2010). Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros*, 20(1), 51–64. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282010005000009>

Xia, Y., Wang, D., Liu, D., Su, J., Jin, Y., Wang, D., Han, B., Jiang, Z., & Liu, B. (2022). Applications of Chitosan and its Derivatives in Skin and Soft Tissue Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 894667. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.894667>

Yeo, J., Lee, J., Lee, S., & Kim, W. J. (2021). Polymeric Antioxidant Materials for Treatment of Inflammatory Disorders. *Advanced Therapeutics*, 4(4), 2000270. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000270>

Yeung, A. W. K., Tzvetkov, N. T., El-Tawil, O. S., Bungău, S. G., Abdel-Daim, M. M., & Atanasov, A. G. (2019). Antioxidants: Scientific Literature Landscape Analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–11, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8278454>

Yin, X., Chen, K., Cheng, H., Chen, X., Feng, S., Song, Y., & Liang, L. (2022). Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology. *Antioxidants*, 11(1), 153. <https://doi.org/10.3390/antiox11010153>

Zehiroglu, C., & Ozturk Sarikaya, S. B. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 4757–4774. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03952-x>

Zhang, Y., Jarosinski, W., Jung, Y.G., & Zhang, J. (2018). Additive manufacturing processes and equipment. In *Additive Manufacturing* (pp. 39–51). Butterworth-Heinemann. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812155-9.00002-5>

Zhao, D., Yu, S., Sun, B., Gao, S., Guo, S., & Zhao, K. (2018). Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles. *Polymers*, 10(4), 462. <https://doi.org/10.3390/polym10040462>

Zümreoglu-Karan, B. (2006). The coordination chemistry of Vitamin C: An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 250(17–18), 2295–2307. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.002>

Anexos

Anexo 1. Desenho técnico do módulo de seringa.

The technical drawing includes three views of the syringe module: a front view with dimensions 250 (height) and 50 (width), a side view with dimensions 60 (width) and 72.9 (base width), and a top view with dimensions 75.5 (height) and 31 (width). The front view is annotated with callouts 5Q, 14, 7, 5, 12, 6, 8, 9, 10, 11, and 13. A 3D perspective view is also shown.

14	AcopladorFull	1				
13	cilindro	1				
12	TrapezoidalScrewTSL-300-8D	1				
11	peca3baixo	2				
10	peca4	1				
9	seringa	1				
8	rosca	1				
7	MGN15 rail	1				
6	MGN15C	1				
5	peca4gua	1				
4	peca3	1				
3	peca2e3baixo	1				
2	peca1	1				
1	peçadetras	1				
NP	DESIGNAÇÃO	QUANT.	NORMA DES. Nº	MATERIAL	MASSA [kg]	OBS.

	ESCALA:	1:2		MÓDULO DE SERINGA		
	TOLERÂNCIA GERAL: TOLERÂNCIAMENTO ISO 8015 ISO 2768-mK ACABAMENTO: ISO 1302	NOTAS:				

SOLIDWORKS Educational Product. For Instructional Use Only.