

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



A impressão 3D na produção de pensos antimicrobianos

Joana Ribeiro Nunes

Monografia orientada pela Professora Doutora Isabel Alexandra Caldeira
Ribeiro Monge da Silva, Professora Associada.

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2024

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



A impressão 3D na produção de pensos antimicrobianos

Joana Ribeiro Nunes

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Isabel Alexandra Caldeira
Ribeiro Monge da Silva, Professora Associada.

2024

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha família e amigos por me apoiarem nesta jornada, por acreditarem mais em mim do que eu própria, sem eles não teria chegado até aqui.

Gostaria de agradecer também à minha orientadora Professora Doutora Isabel Alexandra Caldeira Ribeiro Monge da Silva por todo o acompanhamento ao longo destes meses de desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

A cicatrização é um processo natural do organismo que é auxiliado pelo tratamento mais convencional de feridas, nomeadamente pela utilização de gazes, pensos, ligaduras e adesivos, que protegem a ferida de contaminações externas. No entanto, a utilização deste tipo de tratamento não responde às necessidades particulares de cada doente, uma vez que não são personalizáveis. Existem diferentes tipos de feridas e, portanto, não existe um penso que consiga colmatar as necessidades de todos os doentes e os diferentes tipos de pensos que existem também não conseguem responder a todos os requisitos necessários para uma boa cicatrização.

A impressão 3D é uma tecnologia recente e inovadora que vem dar resposta às lacunas presentes nos tratamentos convencionais de feridas, pois permite a produção de pensos com as características ideais para a promoção da cicatrização de feridas. Os pensos em 3D são produzidos com biomateriais que são biocompatíveis e permitem a veiculação de fármacos e outros componentes ativos que vão atuar sinergicamente na cicatrização de feridas. Em particular, a produção de pensos antimicrobianos em 3D contribui para a diminuição do desenvolvimento de resistência aos antibacterianos atualmente utilizados, uma vez que os tratamentos são direcionados para o local de ação, diminuindo também os efeitos adversos associados.

Os pensos antimicrobianos em 3D atualmente em estudo e abordados neste trabalho são obtidos maioritariamente por extrusão e atuam através da veiculação de fármacos antimicrobianos, de metais ou nanopartículas metálicas ou de outros componentes ativos. Com o desenvolvimento de resistências bacterianas aos antibacterianos atualmente em uso, torna-se pertinente a utilização de outros compostos com ação antibacteriana como é o caso dos metais ou nanopartículas metálicas e de outros componentes ativos com ação antimicrobiana, que demonstram elevada importância para aplicação na prática clínica.

Assim, os pensos antimicrobianos impressos em 3D apresentam características promissoras na cicatrização de feridas, possibilitando a personalização do tratamento e melhorando a qualidade de vida do doente.

Palavras-chave: impressão 3D; pensos; antimicrobiano

Abstract

Healing is a natural process of the body that conventional treatments, such as gauze, dressings, bandages, and adhesives, help support by protecting wounds from external contamination. However, these traditional treatments are not customizable to the unique needs of each patient. Different types of wounds require different care, and no single dressing can meet all these diverse needs, making it challenging to achieve optimal healing.

3D printing technology offers an innovative solution to these gaps in conventional wound treatments. This technology enables the production of customized dressings with ideal characteristics for promoting wound healing. 3D-printed dressings, made from biocompatible biomaterials, can deliver drugs and other active components directly to the wound, acting synergistically to enhance healing.

The 3D antimicrobial dressings currently being studied and described in this study are mainly produced by extrusion and act through the delivery of antimicrobial drugs, metals, metallic nanoparticles, or other active components. With the rise of bacterial resistance to commonly used antibacterials, alternative compounds with antimicrobial properties, such as metals and metallic nanoparticles, are becoming increasingly important. These alternatives can effectively target bacteria, demonstrating significant potential for application in clinical practice by reducing resistance and minimizing adverse effects.

Thus, 3D-printed antimicrobial dressings present promising characteristics in wound healing, enabling the personalization of treatment and improving the patient's quality of life.

Keywords: 3D printing; wound dressing; antimicrobial

Abreviaturas

AT - com ácido tânico

CMB - Concentração Mínima Bactericida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FS - fibroína de seda

GeM - Metacrilato de Gelatina

NP Ag- Nanopartículas de Prata

NP Ca - Nanopartículas de Cálcio

PCL – policaprolactona

PDMS - polidimetilsiloxano

PES - polietersulfona

QL - queratina de lã

Índice

1. Introdução.....	10
2. Objetivos.....	12
3. Método de pesquisa.....	13
4. A impressão 3D na produção de pensos.....	14
4.1. Métodos utilizados na impressão 3D de pensos.....	14
4.1.1. Síntese a laser.....	14
4.1.2. Jato a tinta.....	15
4.1.3. Extrusão.....	15
4.1.4. Estereolitografia.....	16
4.2. Vantagens e desvantagens dos métodos de impressão 3D utilizados na produção de pensos.....	17
5. A impressão 3D de pensos antimicrobianos por extrusão.....	19
5.1. Pensos 3D para a veiculação de fármacos antimicrobianos.....	23
5.2. Pensos 3D para veiculação de metais ou nanopartículas metálicas.....	28
5.3. Pensos 3D para veiculação de outros componentes ativos.....	30
6. Diferentes tipologias de pensos 3D antimicrobianos obtidos por impressão.....	35
7. Perspetivas futuras.....	37
8. Conclusão.....	38
Bibliografia.....	39

Índice de Figuras

Figura 1- Métodos de impressão 3D aplicados na impressão de pensos antimicrobianos.....	16
Figura 2 – a) Protótipo digital de um penso 3D em <i>scaffold</i> , b) e c) Hidrogel em <i>scaffold</i> , adaptado de Long et al.....	35
Figura 3 – a) Hidrogel de alginato, b) Protótipo digital do hidrogel de GeM c) Hidrogel de GeM impresso em 3D, adaptado de Huang et al. e Mirek et al.....	36
Figura 4 – a), b) e c) Penso em 3D constituído por polidimetilsiloxano, nanopartículas de prata e óleo de infusão de polidimetilsiloxano, adaptado de Shi et al.....	36

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos métodos de impressão 3D aplicados na produção de pensos antimicrobianos.....	18
Tabela 2 - Pensos antimicrobianos impressos em 3D por extrusão	21

1. Introdução

A pele constitui a primeira barreira do organismo humano, protegendo-o face a agentes agressores externos, como é o caso das radiações, elevadas temperaturas ou até mesmo infeções[1–3]. Assim, torna-se também um órgão muito suscetível a lesões, dando origem a feridas[1, 4, 5].

O tratamento de feridas é uma área da saúde com elevada relevância, pois afeta milhões de pessoas em todo o mundo e, se as feridas não estão sujeitas ao tratamento adequado, podem surgir complicações graves associadas[1, 4]. Sabe-se que as feridas representam um grave problema para a saúde humana, correspondendo a cerca de metade das despesas anuais em saúde no mundo[1, 4].

A cicatrização é um processo natural do organismo, que tem como objetivo manter a integridade da pele e envolve quatro etapas, nomeadamente a hemostase, a inflamação, a proliferação e a reparação celular[1, 3, 4]. O processo de cicatrização inicia-se logo após o ocorrência da lesão, no entanto, quando uma ferida é infetada por bactérias há um prolongamento da fase inflamatória do processo de cicatrização e a ferida entra num estado inflamatório crónico, que não cicatriza se o tratamento não for direcionado[3, 6–8]. Assim, é necessário recorrer a agentes antimicrobianos eficazes para promover a cicatrização de feridas[3, 6, 9].

Atualmente existem diferentes tipos de pensos disponíveis no mercado, de modo a proporcionar a cicatrização e a regeneração cutânea e ir de encontro às especificações de cada ferida, nomeadamente pensos de gaze, filme transparente, espuma, hidrogel, hidrocolóides e os bioativos[10, 11]. Os pensos em gaze permitem a absorção de exsudados e adicionar outros compostos diretamente na pele, como antibióticos, no entanto causam maceração da ferida quando são trocados[10, 11]. Já os pensos em filme transparente permitem verificar o estado da ferida sem remoção dos mesmos, são permeáveis ao oxigénio e protegem contra bactérias, no entanto apresentam capacidade limitada na absorção de exsudados[10, 11]. Os pensos em espuma apresentam elevada capacidade de absorção de exsudados, permitem a passagem de oxigénio e o amortecimento e isolamento térmico do ambiente exterior, não sendo indicados em feridas secas[10, 11]. Já os hidrogéis permitem manter o ambiente da ferida húmido e são facilmente removidos, no entanto pela elevada permeabilidade podem originar proliferação bacteriana[10, 11]. Os hidrocolóides são constituídos por materiais coloidais, como a gelatina,

que absorvem moderadamente os exsudados da ferida e formam um gel, permitindo as trocas de água e oxigénio[10, 11]. Para além disso, proporcionam isolamento térmico e um ambiente húmido para as feridas, permitem a remoção sem dor e previnem a contaminação bacteriana, no entanto não estão indicados em feridas infetadas, uma vez que apresentam propriedades oclusivas[10, 11]. Por fim, os pensos bioativos são constituídos por biomateriais e apresentam como características a biocompatibilidade e biodegradabilidade, permitindo a veiculação de componentes bioativos para acelerar a cicatrização, no entanto podem originar resposta imunológica[11]. Existe uma grande variedade de pensos, mas porque também existe uma grande diversidade de tipos de feridas e, por isso, torna-se difícil encontrar uma solução ideal para todas, uma vez que existem, por exemplo, feridas mais secas e outras mais exsudativas e, até à data, também não existe um tratamento de feridas que possua a capacidade de atuar em todas as fases do processo de cicatrização[1, 5, 12].

Assim, tornou-se imprescindível desenvolver um tratamento inovador que respondesse às lacunas existentes no tratamento convencional de feridas, com o objetivo de procurar novas abordagens e melhorar a eficácia das opções terapêuticas atualmente utilizadas[1, 5]. A alternativa ao tratamento convencional de feridas são os pensos impressos em 3D, que permitem uma utilização por períodos prolongados, fornecem ação biológica intrínseca, pela capacidade de modificar a libertação de componentes bioativos, e possibilitam o transporte e libertação de princípios ativos[1, 4, 5]. Os pensos impressos em 3D foram desenvolvidos com o intuito de colmatar as falhas dos tratamentos convencionais de feridas, recorrendo a matérias-primas biocompatíveis e a um *design* flexível e respirável, proporcionando as condições adequadas para a cicatrização mais rápida e de uma forma personalizada [1, 4, 5, 12]. Assim, para ir de encontro a estes requisitos, os pensos impressos em 3D podem adquirir formatos de hidrogel, espuma, filme transparente e *scaffold*[13].

2. Objetivos

O objetivo desta monografia é demonstrar como é que as inovações que a impressão 3D proporciona podem ser utilizadas na produção de pensos antimicrobianos e as vantagens que apresentam associadas para aplicação na prática clínica. A singularidade desta tecnologia permite responder positivamente às lacunas atualmente existentes nos tratamentos convencionais para o tratamento de feridas, oferecendo uma alternativa terapêutica mais eficaz e eficiente para estes doentes. Ao longo deste trabalho serão referidos vários estudos já realizados com resultados promissores nesta área.

3. Métodos de pesquisa

A pesquisa para esta monografia foi realizada através de fontes bibliográficas digitais, nomeadamente *Science Direct* e *Pubmed*, durante o período de Janeiro a Junho de 2024. Foram selecionados artigos atuais, cujas datas de publicação encontram-se entre 2017 e 2024, uma vez que a impressão 3D aplicada aos pensos antimicrobianos é uma área recente.

4. A impressão 3D na produção de pensos

A impressão 3D é uma tecnologia aditiva que permite produzir objetos físicos, a partir de um protótipo digital, com recurso a uma impressora especializada[14–16]. O processo de fabrico propriamente dito é a impressão por sobreposição, onde os materiais impressos são adicionados camada sobre camada, de acordo com o *design* pretendido e o tipo de impressão 3D escolhido[1, 4, 14].

Dada a versatilidade da impressão 3D, é possível a produção de estruturas porosas a partir de materiais biodegradáveis, bioabsorvíveis e bioativos, que quando em contacto com a pele permitem a proliferação celular e a entrada de nutrientes e oxigénio, de forma a promover a regeneração cutânea[4, 5]. Este tipo de estrutura porosa permite também a veiculação de matérias-primas ativas, possibilitando a personalização do tratamento[4, 5, 17, 18]. Assim, torna-se numa ferramenta promissora para aplicação na impressão 3D de pensos antimicrobianos[4, 5, 17].

4.1. Métodos de impressão 3D utilizados na produção pensos

Existem vários métodos de impressão 3D, no entanto a finalidade do produto final produzido e a escolha dos materiais e/ou matérias-primas ativas que constituem o penso vão determinar a seleção do método de impressão[1]. Os pensos podem ser impressos pelos métodos de síntese a laser, jato a tinta, extrusão e estereolitografia, que são descritos em seguida[19].

4.1.1 Síntese a laser

Esta técnica de bioimpressão recorre a um laser para fundir as matérias-primas e adicioná-las gota a gota ao substrato pretendido, permitindo a formação de uma camada após arrefecimento (Figura 1a)[1, 19].

Este método de impressão foi utilizado por Sorkio et al. na impressão de tecidos que mimetizam a córnea, a partir de células estaminais humanas[20]. Os resultados demonstraram que a estrutura produzida apresentava propriedades mecânicas adequadas e com características muito semelhantes aos tecidos nativos[20].

4.1.2. Jato de tinta

Neste método o biomaterial está sujeito a alterações térmicas ou piezoelétricas e é depositado gota a gota sobre um substrato, onde irá fundir-se espontaneamente, levando à formação de camadas (Figura 1b)[1, 19].

Este método de impressão 3D foi utilizado por Duffy et al. na elaboração de um hidrogel constituído por poli- ϵ -lisina e goma gelana para a substituição do tecido da córnea[21]. O objetivo deste hidrogel era oferecer uma alternativa terapêutica a estes doentes, uma vez que há escassez mundial nos bancos doadores de tecidos oculares[21]. Assim, a utilização deste método de impressão para produção de tecido da córnea à base de hidrogel poderá ser potencialmente transferido para a produção de pensos 3D à base de hidrogel[21].

4.1.3. Extrusão

Este método de impressão 3D recorre à tecnologia de modelagem por fusão e depósito, que elabora as peças por aquecimento e extrusão de polímeros termoplásticos, e à medida que o material vai arrefecendo solidifica, formando uma camada sólida (Figura 1c)[4, 19]. Há possibilidade de movimentar o dispensador de matéria-prima ou a plataforma de produção, de acordo com as instruções fornecidas, para formar as camadas seguintes e dar a forma pretendida à peça final[1, 19, 22]. Este método de impressão tem vindo a ser o mais utilizado para produção de pensos 3D pela comunidade científica[5, 19].

Este método de impressão foi utilizado por Cui et al. na produção de um penso 3D composto por quitosano e glicerol, cujo objetivo era melhorar a cicatrização de feridas[13]. Os resultados obtidos mostraram que era um penso fácil de obter e com baixos custos, com viabilidade de produção e biocompatibilidade[13]. Para além disso, apresentava atividade antimicrobiana e elevada capacidade de absorção de exsudados, constituindo uma alternativa promissora para uma melhor cicatrização de feridas infetadas[13].

4.1.4. Estereolitografia

Este método de impressão 3D recorre à fotopolimerização de resinas líquidas, que solidificam e formam uma camada[1, 4, 23]. A estrutura tridimensional é construída segundo a incidência do laser ultravioleta, que vai solidificando de acordo com o formato final pretendido (Figura 1d)[1, 4].

Este método de impressão 3D foi utilizado por Tikhonov et al. na elaboração de um hidrogel constituído por diacrilato de polietilenoglicol veiculado com fosfato de cálcio, cujo objetivo era promover a regeneração do tecido ósseo[24]. Este hidrogel apresentou uma estrutura porosa e demonstrou propriedades elásticas, permitindo a sua utilização no preenchimento ósseo[24].

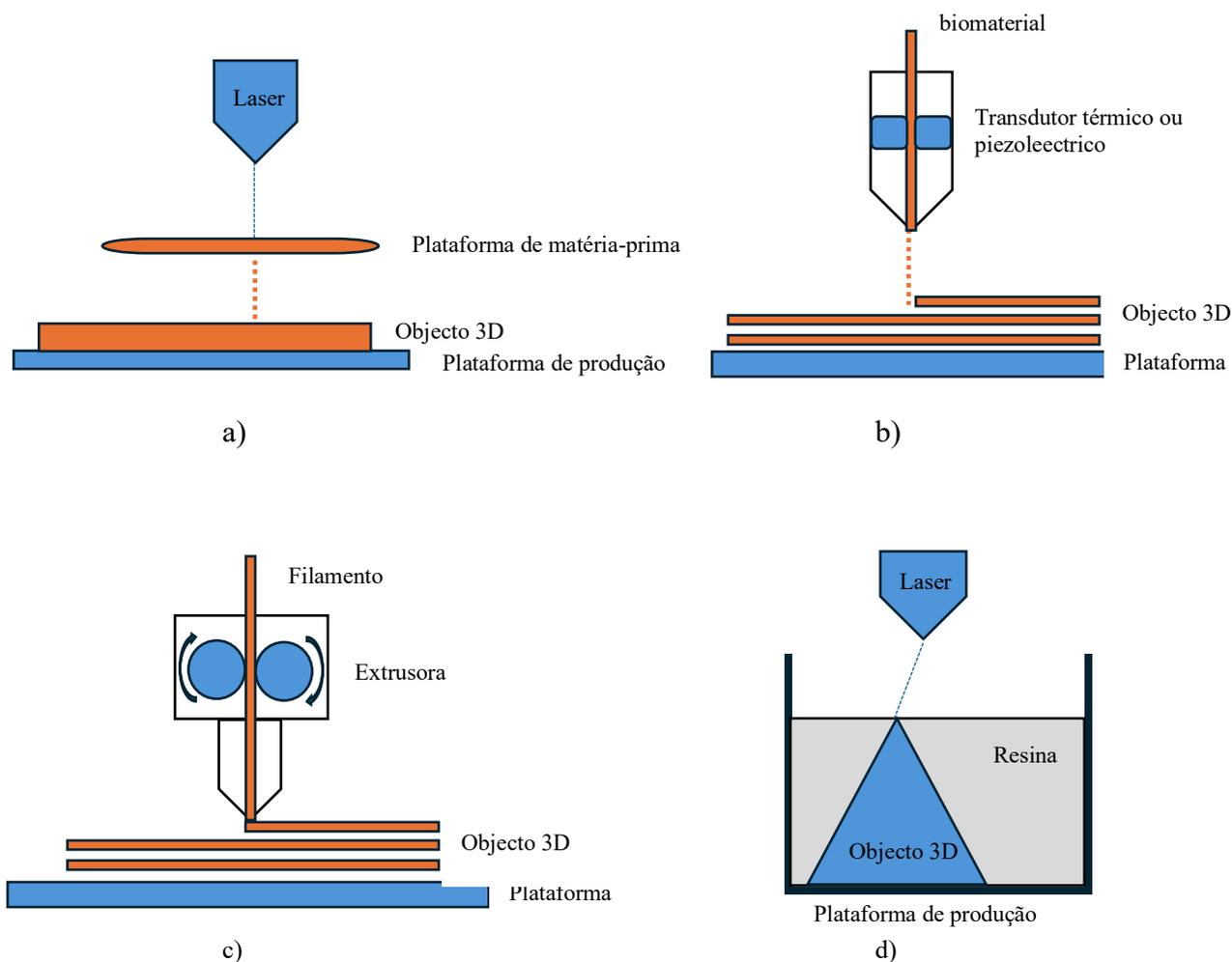


Figura 1 – Métodos de impressão 3D aplicados na impressão de pensos

- a) Síntese a laser, b) Jato a tinta, c) Extrusão, d) Estereolitografia

4.2.Vantagens e desvantagens dos métodos de impressão 3D utilizados na produção de pensos

Dos métodos de impressão 3D mais utilizados na produção de pensos salienta-se em primeiro lugar o de extrusão, constituindo 57% das impressoras 3D comercializadas em todo o mundo, seguindo-se o de jato a tinta, que constitui o segundo método de impressão 3D mais utilizado, com 10% da cota de mercado de impressoras 3D comercializadas mundialmente[5, 19].

A escolha do método a utilizar encontra-se relacionada com as características dos materiais que constituem o penso e com o objetivo terapêutico do mesmo[1]. Para além destes fatores também as vantagens e desvantagens dos métodos em questão devem ser tidas em conta aquando da escolha do método de impressão[1]. Assim, os métodos de impressão 3D utilizados na produção de pensos apresentam vantagens e desvantagens que se encontram sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos métodos de impressão 3D aplicados na produção de pensos

Método de impressão 3D	Vantagens	Desvantagens
Síntese a laser	<p>Permite a utilização de biomateriais com elevada viscosidade[19]</p> <p>Observação em tempo real do produto a ser elaborado[5, 19]</p> <p>Elevada resolução dos materiais impressos[5, 19, 23]</p> <p>Elevada velocidade de impressão[5]</p> <p>Não há risco de bloqueio do bocal durante a impressão[5, 19]</p>	<p>Maior consumo de tempo na preparação da impressão[5, 23]</p> <p>Mais dispendioso do que o método de jato a tinta ou extrusão[5]</p>
Jato a tinta	<p>Boa relação custo-efetividade[4, 5, 19]</p> <p>Elevada velocidade de impressão[4, 5, 19]</p> <p>Boa resolução dos materiais impressos[4, 5]</p> <p>Permite a impressão direta dos materiais[5]</p>	<p>Podem ser necessários passos adicionais para obtenção do produto final[5]</p> <p>Bloqueio no bocal durante a impressão[19]</p> <p>Limitação dos materiais a utilizar[19]</p>
Extrusão	<p>Baixo custo[5]</p> <p>Resolução dos produtos impressos media-alta[5, 23]</p> <p>Versatilidade[19]</p> <p>Flexibilidade[4]</p> <p>Acessibilidade[19]</p> <p>Capacidade de produzir estruturas em larga escala[4, 5, 19]</p>	<p>Baixa resolução[19]</p> <p>Bloqueio no bocal durante a impressão[4, 19]</p> <p>Deformação dos hidrogéis produzidos[19]</p>
Estereolitografia	<p>Elevada resolução dos materiais impressos[4, 5, 23]</p> <p>Rapidez na velocidade de produção[5, 19]</p> <p>Baixo custo[5]</p>	<p>Apesar da velocidade rápida de produção, o produto final é elaborado linha a linha, o que o torna o processo demorado[19, 23]</p> <p>Requer estruturas de suporte para evitar deformação do produto em elaboração[19]</p> <p>Limitação aos materiais sensíveis à radiação ultravioleta[19]</p>

5. A impressão 3D de pensos antimicrobianos por extrusão

De forma a promover uma melhor cicatrização, o penso ideal deverá promover a proteção da ferida, ser biodegradável e biocompatível, não ser tóxico, ser permeável ao oxigênio, não aderir à ferida, possibilitando a sua remoção sem dor, manter a hidratação da ferida e apresentar um custo aceitável[1, 5, 6]. A impressão 3D vem dar resposta a estas exigências, possibilitando o fabrico de pensos com diferentes formas, tamanhos, porosidade e a veiculação de matérias-primas ativas, de acordo com a necessidades de cada doente[1, 5, 18, 25]. Esta tecnologia permite também o ajuste da dose dos materiais utilizados e a possibilidade de conjugar uma ou mais matérias-primas ativas, diminuindo assim o efeitos adversos associados[5].

A impressão 3D é uma ferramenta promissora no fabrico de pensos personalizados e verificou-se um elevado crescimento de interesse nesta área durante a última década[1, 15]. A escolha do(s) polímero(s) é muito importante para a impressão 3D do penso, uma vez que vai influenciar o método utilizado, o *design* e a atividade pretendida[1, 4]. Estes polímeros devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, por isso são frequentemente utilizados os polímeros naturais e sintéticos[1, 4, 26]. Os polímeros naturais são obtidos através de fontes naturais como plantas, animais ou microrganismos e apresentam como características principais a biocompatibilidade, biodegradabilidade, sustentabilidade no abastecimento e apresentam capacidade de mimetizar a matriz extracelular[27–29]. Os polímeros sintéticos são sintetizados quimicamente e apresentam a particularidade de mimetizar as propriedades mecânicas e físicas da pele, oferecendo versatilidade ao produto final produzido[27, 30].

A impressão 3D permite a construção de estruturas biocompatíveis que são essenciais para a regeneração cutânea, como é o caso dos hidrogéis, que são constituído por uma estrutura tridimensional de polímeros hidrofílicos[8, 19, 31, 32]. A estrutura do hidrogel permite mimetizar a matriz extracelular dos tecidos, oferecendo um suporte para as células aderirem e proliferarem e, assim, regenerar o tecido danificado[8, 31, 33]. Para além disso, o hidrogel constitui uma barreira que protege a ferida dos contaminantes externos e de bactérias, proporcionando um ambiente mais limpo de forma a facilitar a cicatrização[8, 31, 34]. Os hidrogéis apresentam um papel muito importante na regeneração cutânea uma vez que são biodegradáveis, biocompatíveis, apresentam propriedades antibacterianas, absorvem os exsudados das feridas, mantendo a humidade ótima para a cicatrização, não aderem à ferida e apresentam uma estrutura mecanicamente flexível[4, 8, 31, 32]. Com estas características, os hidrogéis apresentam um grande potencial na aplicação em feridas infetadas, uma vez que são

bem tolerados pelo organismo humano, diminuindo o risco de reações adversas ou inflamatórias quando aplicados na pele[31, 32].

O processo de cicatrização de uma ferida fica comprometido quando há presença de infecção bacteriana[6, 9, 35]. Assim, se não for aplicado um tratamento antimicrobiano específico pode evoluir para uma infecção grave, afetando inclusive órgãos internos, o que representa uma ameaça para a saúde pública[6, 9]. No entanto, a ampla utilização de antibacterianos no tratamento de infecções levou ao desenvolvimento de resistência bacteriana a estes fármacos, colocando em causa a eficácia dos tratamentos antibacterianos implementados[6, 9, 35].

A impressão 3D de pensos antimicrobianos permite a veiculação de fármacos, mas também de outras matérias-primas ativas, com ação antimicrobiana, que vão atuar de forma direcionada e eficaz na cicatrização das feridas infetadas[4, 9, 18]. Assim, esta tecnologia responde positivamente ao aumento da prevalência das feridas infetadas devido à resistência aos antibióticos atualmente utilizados[4, 9, 36]. Hoje em dia já existem estudos acerca de pensos antimicrobianos impressos em 3D, verificando-se que a técnica mais descrita para impressão é a de extrusão[5, 19]. Isto deve-se à provávelmente ao facto desta técnica permitir a produção de pensos com flexibilidade, adaptando-se ao local de aplicação na pele, é também possível o fabrico de produtos versáteis, com formatos adequados às dimensões da ferida e permite a elaboração de produtos de resolução média-alta com um baixo custo[5, 19, 23]. Neste sentido os estudos aqui apresentados recorrem ao método de impressão 3D por extrusão para a elaboração de pensos, que se encontram sumarizados na Tabela 2 e serão detalhados em seguida.

Tabela 2 – Pensos antimicrobianos impressos em 3D por extrusão

Polímeros	Princípios Activos	Condições de preparação	Aplicação	Resultados	Formato	Ref
Quitosano 2% m/v Pectina 2% m/v	Lidocaína 10% m/m	Hidrogel 4:1 com 0,25 mm de altura Velocidade de 6 mm/s, a 25 °C e 10,7- 15,1 psi A lidocaína foi adicionada à pectina, a temperatura ambiente com agitação magnética durante 10 minutos	Alívio de dor e cicatrização	Elevada absorção de exsudados Flexibilidade do penso e fácil remoção Libertação rápida da lidocaína	Scaffold	[37]
Alginato 5% m/v aditivado com nanopartículas de cálcio (1mg/ml)	Bacitracina 1,25 mg/ml	Velocidade de 20 mm/s Diâmetro do bocal 0,410 mm	Ação antimicrobiana	Biocompatibilidade Espectro de ação para <i>Staphylococcus aureus</i> Libertação mais rápida do princípio ativo quando o pH da pele é mais alcalino	Hidrogel	[38]
GeM 5% Gelatina 11% PCL 5 mg/ml ou PES 5 mg/ml	Ampicilina 0,1 mg/ml	Velocidade de impressão 10 mm/s, 345 kPa Diâmetro do bocal 0,164 mm, formando uma camada com 0,2 mm de altura Temperatura do polímero 28 °C Foi adicionado um fotoiniciador ultra-violeta durante 10 minutos a 0,25%	Ação antimicrobiana <i>in vitro</i>	Biocompatibilidade Espectro de ação para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> quando o hidrogel é veiculado com ampicilina	Hidrogel	[39]
PCL	Iões de zinco (10 e 25% m/m), cobre (10 e 25% m/m) e prata (10% m/m)	Velocidade de impressão 50 mm/s a 170 °C	Inibição do crescimento bacteriano	Espectro de ação para <i>Staphylococcus aureus</i> apenas para os pensos de PCL veiculado com prata (10%) ou cobre (10 e 25%)	Scaffold	[40]

PDMS	Nanopartículas de prata (0,5 e 2,5%)	Na impressão 3D foi utilizada uma agulha com 20 G de ponta plana e obtidos diferentes formatos de penso. Por fim as amostras foram mergulhadas num recipiente com o óleo de PMDS, com uma viscosidade de 5 cSt, durante 18 horas	Inibição da adesão e da atividade bacterianas	Espectro de ação para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> Estudo <i>in vivo</i> demonstraram que as NP Ag a 2,5% apresentam uma cicatrização mais rápida da ferida e uma maior atividade antibacteriana	Penso	[41]
PCL 80%	Lignina 10% Cúrcuma 5% D-pantenol 5%	Velocidade de impressão 10 mm/s a 60 °C Diâmetro do bocal 0,5 mm	Ação antioxidante e antibacteriana	Espectro de ação para <i>Staphylococcus aureus</i> Biocompatibilidade, elevada proliferação de fibroblastos e cicatrização mais rápida (<i>in vivo</i>)	Penso	[42]
Gelatina 30% Glicerina 8%	Mel de Manuka 40%	Velocidade de impressão 30 mm/s a 43 °C e 25 Psi Diâmetro do bocal de 0,28 mm Hidrogel é constituído por 3 camadas, 1 e 3 com gelatina e mel de manuka e a 2 só com gelatina, obtendo uma concentração final de mel de manuka de 27%	Ação antibacteriana e antioxidante	Espectro de ação para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Escherichia coli</i>	Hidrogel	[43]
Fibroína de seda (5%) Queratina de lã (5%)	Ácido tânico 30%	Velocidade de impressão 10 mm/s a 37 °C e 160 kPa Diâmetro do bocal de 18 G	Ação antibacteriana e antioxidante	Biocompatibilidade Espectro de ação para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> Ensaio <i>in vivo</i> mostram um melhor processo de cicatrização	Hidrogel	[44]

Legenda: GeM - Metacrilato de Gelatina, NP Ag – Nanopartículas de Prata, PCL – policaprolactona, PES – polietersulfona, PDMS - polidimetilsiloxano

5.1. Pensos 3D para a veiculação de fármacos antimicrobianos

Os fármacos antimicrobianos são amplamente utilizados na prática clínica no tratamento de infecções bacterianas, porém a prescrição excessiva, a utilização indevida e a própria evolução genética das bactérias tem originado mecanismos de resistência, limitando a eficácia dos tratamentos antimicrobianos atualmente utilizados[3, 6, 45]. Assim, a impressão 3D de pensos antimicrobianos com veiculação de fármacos permite a utilização de sistemas de liberação direcionados para o local pretendido, o que possibilita uma maior concentração do fármaco por um maior período de tempo, evitando assim toxicidade a nível sistêmico e proporcionando um tratamento antimicrobiano eficaz[3, 6, 36].

Um exemplo de pensos 3D para a veiculação de fármacos foram produzidos por Long et al., os autores desenvolveram um hidrogel à base de quitosano e pectina, veiculado com lidocaína de liberação imediata[37]. O objetivo deste estudo era compreender a viabilidade e adequação do hidrogel à impressão 3D, avaliar a liberação do fármaco *in vitro* e as interações moleculares entre o hidrogel, o fármaco e o hospedeiro[37]. Este hidrogel foi obtido através do método de extrusão, que permite a incorporação de matérias-primas ativas sem recurso de calor, o que é especialmente importante na utilização de matérias-primas termosensíveis[37]. Os autores escolheram dois polímeros pelas suas conhecidas propriedades, nomeadamente o quitosano que é um polímero natural com origem em crustáceos, como camarão, lagosta e caranguejo, é biodegradável, não tóxico e biocompatível[6, 28, 37, 46]. Este polímero tem sido amplamente estudado na prevenção do desenvolvimento de infecção de feridas pelas suas propriedades antibacterianas e antifúngicas[28, 37, 46, 47]. O quitosano forma uma película protetora que previne infecções, apresenta também a capacidade de estimular a produção de fatores de crescimento e a formação de novos vasos sanguíneos, que são importantes na regeneração dos tecidos, auxiliando assim a cicatrização[28, 37]. O segundo polímero escolhido foi a pectina que é também um polímero natural obtido através das paredes celulares de plantas, que apresenta biocompatibilidade, mucoadesividade e uma boa capacidade de liberação de matérias-primas ativas[26, 28, 37]. A pectina forma uma película protetora na ferida, que a protege de contaminantes externos, mas permitindo a entrada de oxigénio e nutrientes que auxiliam na cicatrização da ferida[28]. Tendo em conta as propriedades deste polímeros, os resultados obtidos demonstraram que o hidrogel de quitosano e pectina produzido apresentava uma boa capacidade de impressão em 3D, mantendo a sua geometria e integridade mecânica após o processo de extrusão e liofilização, verifica-se também uma elevada flexibilidade,

permitindo atividade física e conforto durante o processo de recuperação e um melhor contacto com a ferida[37]. Os dados obtidos acerca do peso e dimensão das amostras produzidas confirmam a repetibilidade do processo de impressão 3D do hidrogel de quitosano e pectina[37]. Foram produzidas amostras sem princípio ativo e outras com a lidocaína a 10%, permitindo comparar a estrutura obtida, ou seja, o hidrogel de quitosano e pectina com lidocaína originou uma estrutura mais compacta com poros mais reduzidos e com menor capacidade absorção de água, mas ainda assim com uma boa capacidade de retenção de água, demonstrando a sua capacidade de absorção de exsudados nas feridas[37]. Relativamente à adesão do penso à pele, verificou-se que a força de adesão do hidrogel de quitosano e pectina com lidocaína encontrava-se entre 86,5-126,9 g, indicando que o hidrogel apresenta uma boa capacidade de fixação na pele, mas que pode ser facilmente removido sem causar danos nos tecidos[37]. Durante os processos de encapsulamento, formação do gel e liofilização, o processo de recristalização da lidocaína é afetado, no entanto sem perder os grupos funcionais, ou seja, mantém a atividade terapêutica anestésica quando veiculada no hidrogel de quitosano e pectina[37]. A avaliação *in vitro* da libertação da lidocaína concluiu que a estrutura porosa do hidrogel permite uma libertação rápida na primeira hora, proporcionando um alívio eficaz na dor em feridas mais recentes, e uma libertação gradual nas 4 horas seguintes[37]. Devido à sua termosensibilidade, o hidrogel quando entra em contacto com a pele (37 °C) há uma quebra parcial das ligações de hidrogénio entre o quitosano e a pectina, o que leva à dissolução da matriz do hidrogel, facilitando a sua remoção da pele, sem trauma ou dano[37]. Assim, o hidrogel de quitosano e pectina veiculado com lidocaína impresso em 3D constitui uma alternativa viável e biocompatível com vantagens terapêuticas relativamente aos tratamentos convencionais atualmente utilizados na cicatrização de feridas[37]. Neste estudo, apesar de serem referidas as propriedades antimicrobianas do quitosano, não foram avaliadas nos resultados obtidos[37].

Um outro exemplo recente de penso antimicrobiano impresso por 3D foi produzido por Huang et al., os autores desenvolveram um penso de hidrogel à base de alginato com nanopartículas de cálcio (NP Ca) para veicular bacitracina, cujo objetivo era verificar se o penso em condições básicas (pH 7,4) se degradava mais rapidamente e, conseqüentemente, aumentava a libertação de fármaco[38]. O alginato é um polímero natural que é amplamente utilizado em impressão 3D e é obtido essencialmente a partir de algas castanhas [30–32, 48]. Os hidrogéis de alginato apresentam uma vasta aplicação na área biomédica uma vez que são hidrofílicos, biodegradáveis e biocompatíveis[2, 30–32, 48]. Estas características permitem que o alginato

seja utilizado de forma segura na prática clínica, uma vez que minimiza os riscos de reações adversas ou respostas imunológicas associadas[30–32]. Para além disso, os hidrogéis de alginato permitem o ajuste das propriedades mecânicas, oferecendo versatilidade na estrutura a ser produzida[30–32]. As NP Ca foram também testadas como potenciais constituintes de hidrogéis de alginato impressos em 3D, destinados à veiculação de fármacos antimicrobianos para o tratamento de feridas, de forma a modular a libertação de fármaco de acordo com o pH da pele[38]. Para além disso, as NP Ca têm sido alvo de alguns estudos por serem biodegradáveis e biocompatíveis, existindo inclusive alguns dispositivos constituídos por NP Ca já aprovados para utilização na prática clínica na reparação e regeneração óssea[38, 49]. As NP Ca mantêm-se estáveis em condições alcalinas, sem libertar os iões cálcio[38]. No entanto, os iões presentes no organismo como o potássio e o sódio vão substituir alguns dos iões cálcio presentes nos pensos de alginato, originando uma diminuição do número de ligações do hidrogel, rápida degradação do penso e aumento da libertação de fármaco[38]. Por outro lado, em condições ácidas as NP Ca libertam os iões cálcio, que vão manter a estrutura do hidrogel, reduzindo a sua degradação e, conseqüentemente, reduzindo a libertação de fármaco[38]. Verifica-se que a pele quando está saudável o pH encontra-se entre 5,4 e 5,6, no entanto, quando a pele apresenta uma ferida infetada o pH aumenta para valores entre 7,15 e 8,9[38, 50]. As bactérias elegem como pH ótimo valores superiores a 6, portanto quando o pH da pele aumenta é um indicador de presença de infeção[38, 50, 51]. Os ensaios para a avaliação da libertação de fármaco realizados por Huang et al. utilizaram os pensos só com alginato e sem NP Ca como grupo controlo[38]. Os resultados obtidos demonstraram que em todos os pensos os fármacos apresentavam perfis de libertação semelhantes, onde a taxa de libertação é mais elevada durante os primeiros dois dias e vai diminuindo ao longo do tempo[38]. Como esperado, não se verificaram diferenças na libertação de fármacos nos diferentes valores de pH (5,4 e 7,4) quando o penso é constituído apenas por alginato[38]. Por outro lado, quando os pensos são constituídos por alginato e NP Ca os valores de pH influenciam o perfil de libertação de fármacos[38]. Em pH mais ácido verifica-se uma redução da libertação de fármaco, que no caso da rodamina é notável visualmente pela menor intensidade da cor, quando comparada com a libertação de fármaco nos pensos constituídos por alginato e NP Ca em pH alcalino[38]. Assim, é possível utilizar as NP Ca nos pensos de alginato quando queremos controlar a libertação de matérias-primas ativas, como é o caso dos antimicrobianos[38]. De acordo com a literatura, a concentração mínima inibitória (CMI) da bacitracina para *Staphylococcus aureus* encontra-se entre 0,9-25 µg/mL e, de acordo com os dados obtidos, as concentrações de bacitracina libertadas ao longo do estudo encontram-se entre 3-20 µg/mL, ou seja, encontram-

se dentro dos valores desejáveis para apresentar efeito antibacteriano[38]. Foram também realizados testes antibacterianos utilizando as soluções libertadas pelos pensos a pH 7,4 e verificou-se que em todas, do dia 1 ao dia 6, há uma redução significativa da viabilidade da *S. aureus*[38]. No entanto, as soluções analisadas do dia 7 já não mostraram uma redução tão significativa de *S. aureus*, mas pelo ajuste da frequência de troca de penso é possível manter a eficácia terapêutica[38]. Assim, se a troca do penso for efetuada a cada três dias ou então ajustar a quantidade de bacitracina a ser veiculada no penso é possível garantir a eficácia antibacteriana para ir de encontro às necessidades do doente[38]. Por outro lado, a menor velocidade de libertação de bacitracina do penso veiculado com NP Ca a pH 5,5 permite diminuir os efeitos secundários e o risco de toxicidade associados à utilização da bacitracina[38]. Este estudo demonstrou o potencial de utilização dos pensos impressos em 3D com alginato e NP Ca no controlo da libertação de fármacos antimicrobianos, de acordo com o pH existente na pele[38]. Assim, numa ferida infetada, onde o pH é mais alcalino, a libertação de fármaco é mais rápida comparativamente à velocidade de libertação de fármaco na pele saudável, cujo pH é mais ácido, permitindo uma melhor eficácia e um tratamento de feridas infetadas mais direcionado[38, 52].

O último exemplo de pensos 3D com veiculação de fármacos antimicrobianos é o de Mirek et al., os autores desenvolveram um penso de hidrogel impresso em 3D à base de metacrilato de gelatina (GeM) destinado à veiculação de ampicilina em microesferas de polímeros, nomeadamente em PCL ou em PES[39]. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de impressão desta tecnologia, a velocidade de libertação da ampicilina e as propriedades antimicrobianas do hidrogel[39]. A gelatina é um polímero natural obtido pela hidrólise parcial de colagénio, que se encontra em abundância nos ossos, pele e músculos dos mamíferos[27, 39, 53, 54]. A gelatina constitui um polímero biocompatível, biodegradável e apresenta uma estrutura química que se assemelha à matriz extracelular, permitindo mimetizar a estrutura natural dos tecidos do organismo humano[39, 53, 54]. No entanto, apresenta propriedades mecânicas e térmicas débeis, o que dificulta a aplicação na prática clínica[39, 53, 55, 56]. Desta forma, foi produzida uma gelatina modificada com anidrido metacrílico, dando origem ao GeM, de forma a colmatar as falhas presentes neste polímero[39, 55, 56]. Dos polímeros selecionados para a veiculação de fármacos em microesferas salienta-se a policaprolactona (PCL), que é um polímero sintético, semi-cristalino, biocompatível e biodegradável, apresentando também uma degradação lenta *in vivo*, o que se traduz em vantagem quando é necessário uma libertação modificada na formulação, e baixa adesão às células, permitindo

uma remoção do penso sem dor[10, 30, 40, 57]. O segundo polímero utilizados neste estudo na veiculação de fármacos em microesferas foi a polietersulfona (PES), que constitui também um polímero sintético biocompatível com características hidrofóbicas e estabilidade térmica, apresentando elevada resistência e flexibilidade[58–60]. Os ensaios de biocompatibilidade realizados por Mirek et al. demonstraram que os hidrogéis não apresentavam toxicidade para as células, no entanto os hidrogéis com microesferas de PCL ou PES apresentavam maior citocompatibilidade do que os hidrogéis sem microesferas[39]. Os ensaios para avaliar a libertação do fármaco da matriz do hidrogel foram realizados com a rodamina como marcador de substância ativa, verificando-se que em todas as amostras a libertação do fármaco é gradual, o que vai de encontro às características desejáveis para este tipo de sistema de libertação de fármacos[39]. Os resultados demonstraram que o hidrogel com microesferas de PES apresenta uma taxa de libertação mais rápida de rodamina, seguindo-se o hidrogel com microesferas de PCL, com uma taxa duas vezes inferior, e por fim o hidrogel sem microesferas, com a taxa de libertação mais lenta[39]. O hidrogel com microesferas de PES permite aumentar a quantidade de rodamina libertada após 24 horas, cuja concentração de equilíbrio é alcançada após 5 horas, comparativamente às restantes amostras em estudo, cuja concentração de equilíbrio não é alcançada mesmo após as 24 horas[39]. A atividade antimicrobiana foi avaliada com ampicilina para *S. aureus* e *Escherichia coli* e os resultados obtidos demonstraram que todos os hidrogéis veiculados com ampicilina, com e sem microesferas de polímeros, apresentavam maior atividade antimicrobiana para *S. aureus* do que para *E. coli* [39]. Os resultados mostraram também que o hidrogel com microesferas de PES apresentava uma maior atividade antimicrobiana para *E. coli*, comparativamente às restantes amostras[39]. Estes resultados estão em concordância com os dados obtidos na libertação de fármaco analisado anteriormente com a rodamina, onde o hidrogel com microesferas de PES permite uma maior libertação de substância ativa e por isso há uma maior ação antimicrobiana[39]. Assim, este estudo traz uma nova abordagem no fabrico de hidrogéis impressos em 3D com veiculação de fármacos antimicrobianos, utilizando microesferas de PES[39]. Esta formulação apresenta um perfil de libertação de fármaco adequado e com espectro de ação para *S. aureus* e *E. coli*, o que é vantajoso para aplicação na prática clínica em feridas infetadas[39, 61].

5.2. Pensos 3D para veiculação de metais ou nanopartículas metálicas

Com o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos utilizados na prática clínica, torna-se pertinente a utilização de outros princípios-ativos com ação antibacteriana como é o caso dos iões metálicos[4, 35, 40]. Os iões metálicos podem ser adicionados diretamente ao penso impresso em 3D ou então podem ser veiculados através de nanopartículas, constituindo uma ferramenta muito importante na prevenção e tratamento de infeções[8, 35, 62]. As nanopartículas como apresentam um tamanho reduzido, constituem uma boa relação entre a área de superfície e o respetivo volume, tornando-as mais eficazes mesmo em baixas concentrações[35, 62]. A atividade antibacteriana das nanopartículas metálicas ocorre através da formação de espécies reativas de oxigénio (ERO) e da quebra da parede celular bacteriana[3, 31, 62]. Assim, as nanopartículas metálicas conseguem ligar-se às enzimas responsáveis pelo metabolismo bacteriano, inibindo a atividade respiratória, e interceptam o DNA bacteriano, impedindo a sua atividade metabólica[31, 35, 62]. As ERO conseguem interromper a formação do biofilme bacteriano, que constitui um dos principais mecanismos que levam ao desenvolvimento de resistência bacteriana [31, 63]. Os biofilmes são comunidades de bactérias complexas e densamente compactadas, envolvidas por um composto secretado pelas próprias bactérias constituído por proteínas e polissacáridos[10, 64]. Desta forma, as ERO permitem a diminuição da capacidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana[31, 63].

Os principais iões metálicos com ação antibacteriana utilizados na impressão 3D de pensos antimicrobianos são a prata, o cobre e o zinco[45, 65]. As nanopartículas de prata (NP Ag) apresentam elevada relevância clínica pelo seu amplo espectro de ação contra bactérias patogénicas e reduzida toxicidade para as células humanas[5, 8, 49, 66]. As nanopartículas de cobre, à semelhança das nanopartículas de prata, apresentam atividade antibacteriana e antifúngica[45, 66, 67]. O zinco é um composto metálico que sido alvo de alguns estudos pelas suas propriedades demonstradas, nomeadamente, estabilidade química, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana para *S. aureus* e *E. coli*, baixo custo e não apresenta toxicidade para o organismo humano[45, 68]. Para além disso, o zinco regula a migração dos queratinócitos e da autofagocitose, que são cruciais para a cicatrização de feridas[8, 45].

Um exemplo de penso 3D com veiculação de iões metálicos foi produzido por Muwaffak et al., os autores desenvolveram por extrusão um penso constituído por PCL e veiculado separadamente com iões de zinco, cobre e prata[40]. Os resultados demonstraram que a

libertação dos íons de prata foi mais rápida nas primeiras 24 horas (40,69 µg/mL), diminuindo a velocidade nas horas seguintes, mas mantendo-se estável até às 72 horas (44,53 µg/mL)[40]. Esta concentração corresponde ao dobro da CMI e da concentração mínima bactericida (CMB) para os íons prata para *S. aureus* (22,083 µg/mL) descrita na literatura, evidenciando as propriedades antimicrobianas para esta estirpe do penso em estudo[40]. Já os íons de zinco e cobre seguiram o mesmo perfil, no entanto a velocidade de libertação inicial foi mais reduzida que a dos íons de prata[40]. A velocidade de libertação do cobre a 10% foi de 17,756 µg/mL enquanto que a 25% foi de 26,634 µg/mL e, de acordo com a literatura, a CMI e a CMB para o cobre contra *S. aureus* encontra-se entre 3 e 40 µg/mL, portanto o cobre também contribuiu com atividade antibacteriana contra esta estirpe[40]. Relativamente ao zinco as concentrações detetadas não atingiram as CMI descritas na literatura contra *S. aureus*[40]. É a matriz de PCL que permite este tipo de libertação dos íons e constitui uma estratégia para a inibição do crescimento bacteriano e eliminação das bactérias existentes na ferida, uma vez que a libertação dos íons é gradual durante o tratamento[40]. Assim, verifica-se que os pensos de PCL veiculado com prata (10%) ou cobre (10 e 25%) apresentam propriedades bactericidas contra *S. aureus* que é a principal bactéria causadora de infeções na pele. Este penso mostrou também versatilidade nas formas e tamanhos que pode adquirir, permitindo a personalização do tratamento[40]. Assim, este estudo oferece duas estratégias de pensos impressos em 3D constituídos por PCL no combate a infeções bacterianas, tanto pela veiculação de íons de cobre como pelos íons de prata[40]. Como a concentração de zinco detetada no estudo era inferior à CMI descrita na literatura, significa que é necessário ajustar a quantidade de zinco na formulação, para garantir que a quantidade libertada atinge esse valor e seja possível propor uma nova alternativa de pensos antimicrobianos impressos em 3D para o tratamento de feridas[40, 69].

Um outro exemplo recente de penso antimicrobiano impresso por 3D foi produzido por Shi et al. os autores desenvolveram um penso em 3D de polidimetilsiloxano (PDMS) para veicular NP Ag e óleo de infusão de PDMS, que demonstrou biocompatibilidade e permitiu a inibição da adesão e da atividade bacteriana, nomeadamente para *E. coli* e *S. aureus*, melhorando o processo de cicatrização de feridas[41]. O PDMS é um polímero sintético, nomeadamente um silicone, que apresenta elevada flexibilidade, baixo custo, propriedades hidrofóbicas, não-tóxicas e biodegradáveis, constituindo uma alternativa viável para a impressão 3D de pensos antimicrobianos[41, 70]. A introdução do óleo de infusão de PDMS na impressão 3D do penso tem como objetivo impedir a adesão do penso à ferida, evitando assim a dor na troca do

mesmo[41]. Os resultados obtidos por Shi et al. demonstraram que o penso apresentava boa flexibilidade e uma distribuição uniforme das NP Ag em toda a superfície do penso[41]. Os íões de prata foram rapidamente libertados da formulação com uma velocidade de libertação de 0,42 µg/mL no primeiro dia, mantendo a sua libertação mas de uma forma mais lenta pelo menos até ao sétimo dia, demonstrando que a libertação dos íões de prata é prolongada e portanto, mantém a atividade antimicrobiana[41]. Os estudos de citotoxicidade efetuados numa cultura de fibroblastos verificaram que o penso produzido, mesmo em concentrações mais elevadas de NP Ag, não demonstrava citotoxicidade para as células[41]. Os ensaios efetuados para avaliar a adesão bacteriana revelaram que os pensos que apresentavam na sua composição o óleo de infusão de PDMS tinham uma melhor capacidade de evitar a adesão bacteriana, nomeadamente *E. coli* e *S. aureus*, que são duas estirpes conhecidas pela sua resistência a antibióticos[41]. Os pensos com uma maior concentração de NP Ag (2,5%) demonstraram uma maior atividade antibacteriana contra *E. coli* ou *S. aureus* em ensaios *in vitro*[41]. Os estudos *in vivo* em feridas infetadas de ratinhos comprovaram os resultados anteriores, apresentando uma maior atividade antibacteriana no penso com uma maior concentração de NP Ag (2,5%)[41]. Para além disso, promove também uma cicatrização mais rápida da ferida e um maior aumento de tecido epitelial e de granulação, comparativamente aos grupos controlo, o que comprova o potencial desta formulação[41]. Assim, o penso em 3D com NP Ag apresentado constitui uma alternativa à resistência bacteriana que existe atualmente aos antibióticos, pois apresenta biocompatibilidade, espectro de ação para *E. coli* e *S. aureus* e melhora o processo de cicatrização da ferida[41, 71].

5.3. Pensos 3D para veiculação de outros componentes ativos

A resposta inicial do processo de cicatrização é a hemostase, cujo objetivo é o desenvolvimento de uma rede de fibrina, de forma a parar e/ou prevenir o sangramento da ferida[3, 8, 10]. Este processo é mediado pelas citocinas pró-inflamatórias que vão controlar o fluxo sanguíneo existente na zona da ferida e o processo de cicatrização entra na fase inflamatória, onde, simultaneamente, são libertados linfócitos e macrófagos para prevenir e/ou combater a infeção[3, 6, 8]. Quando uma ferida apresenta uma fase inflamatória prolongada é considerada uma ferida com inflamação crónica, o que dificulta o processo de cicatrização[6, 8, 72]. A inflamação crónica das feridas é potenciada pela formação de ERO por parte dos leucócitos e outras células pró-inflamatórias presentes no organismo humano[3, 6, 8, 72]. A produção em

excesso de ERO bloqueia o balanço celular de oxidação e redução, dando origem a danos na matriz extracelular, infecção e diminuição da velocidade da regeneração dos tecidos[3, 6, 8]. Assim, a utilização de agentes antioxidantes permite o controle do *stress* oxidativo das feridas, acelerando o processo de cicatrização[8, 42, 73].

Existem compostos antioxidantes presentes na natureza, como é o caso da curcuma e da lignina, que apresentam simultaneamente atividade antimicrobiana[42, 74]. Neste sentido, Domínguez-Robles et al. desenvolveram um penso impresso em 3D por extrusão à base de lignina, curcuma e D-pantenol combinado com PCL, com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade e as propriedades antioxidantes e antimicrobianas da formulação[42]. A curcuma demonstra em particular propriedades anti-inflamatórias, auxiliando também no processo de cicatrização[42, 51, 74, 75]. Já a lignina pode ser encontrada em plantas superiores e constitui o segundo polímero mais abundante no planeta, depois da celulose, tornando-se um recurso interessante para utilização por exemplo na área da biotecnologia, inclusive já existem alguns estudos com recurso a este polímero[42, 76, 77]. O D-pantenol promove a hidratação da pele, a proliferação dos fibroblastos e o aumento da regeneração e da diferenciação da epiderme, através do aumento da síntese de lípidos[42, 73]. Os ensaios desenvolvidos por Domínguez-Robles et al para avaliação das propriedades antioxidantes utilizaram o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) como agente oxidante e verificou-se que a formulação só com PCL reduzia em 27% a concentração do DPPH após 30 minutos, comparativamente à formulação com PCL e lignina ou PCL, lignina e curcuma que reduzia em 71% e 74%, respetivamente após 15 minutos[42]. Assim, confirmam-se as propriedades antioxidantes destes polímeros, tal como descrito na literatura, apesar da presença adicional da curcuma não apresentar diferenças significativas[42]. Os ensaios de avaliação das propriedades antibacterianas dos pensos com PCL, lignina, curcuma e D-pantenol foram realizados com inóculos *S. aureus* e verificou-se uma redução da adesão bacteriana após 4 horas de 86,9% e após 24 horas de 93,6%, comparativamente ao grupo controlo composto apenas por PCL[42]. Estes resultados encontram-se em conformidade com os dados descrito na literatura, o que demonstra o potencial desta formulação em diminuir o aparecimento de complicações relacionados com infeções persistentes no tratamento de feridas[42]. De acordo com a literatura um material não apresenta citotoxicidade quando a viabilidade celular é superior a 75%[42]. Os ensaios de biocompatibilidade realizados demonstraram citocompatibilidade, baixa toxicidade e elevada proliferação de fibroblastos, inclusive o penso com PCL, lignina, curcuma e D-pantenol demonstrou uma percentagem de viabilidade celular de 147,09% após três dias de incubação,

comparativamente ao grupo controlo[42]. A avaliação da eficácia do penso no processo de cicatrização da ferida foi realizada *in vivo* em ratos albinos adultos e verificou-se que em todos os grupos a ferida fechou completamente após 13 dias de tratamento[42]. A avaliação do processo de cicatrização foi realizada em dois momentos, nomeadamente, após 7 e 13 dias de tratamento e os resultados demonstraram que o penso constituído por PCL, lignina, curcuma e D-pantenol apresentou uma cicatrização mais rápida comparativamente aos restantes pensos, em ambos os momentos de avaliação[42]. Os resultados demonstraram também que os pensos com curcuma na sua composição apresentavam uma cicatrização mais rápida que os restantes grupos, evidenciando o papel desta matéria-prima ativa na formulação[42]. Assim, verifica-se que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura e demonstram a vantagem do penso na cicatrização mais rápida da ferida[42]. Foram também realizadas análises histológicas aos tecidos que revelaram que o penso constituído por PCL, lignina, curcuma e D-pantenol apresentou os melhores resultados no processo de cicatrização, nomeadamente na formação de tecido epitelial, presença reduzida de células inflamatórias infiltradas no tecido de granulação, presença de fibroblastos no tecido de granulação e nos adjacentes e formação de novos vasos[42]. Assim, verifica-se que esta formulação apresenta propriedades promissoras para aplicação na prática clínica em feridas infetadas, uma vez que demonstrou biocompatibilidade, propriedades antioxidantes e antimicrobianas e uma cicatrização mais rápida da ferida[42]. Para além disso, este estudo utilizou amostras *in vivo* para mostrar a evolução do processo de cicatrização, o que constitui uma etapa adicional no processo de investigação comparativamente a outros estudos apresentados[42].

Um outro exemplo de penso em 3D com propriedades antimicrobianas foi produzido por Brites et al., os autores desenvolveram um hidrogel impresso em 3D à base de gelatina e mel de manuka, cujo objetivo era avaliar a atividade antimicrobiana e as propriedades regeneradoras desta formulação[43]. O mel de manuka é produzido pelas abelhas, a partir do néctar da planta *Leptospermum scoparium*, originária da Nova Zelândia[43, 78–80]. O particular interesse neste composto deve-se à atividade antimicrobiana e antioxidante demonstrada[79, 81, 82]. O principal agente antimicrobiano presente no mel de manuka é o metilglioxal, que vai interferir com a morfologia e divisão celular das bactérias, uma vez que consegue ligar-se a proteínas, DNA e RNA, alterando a sua função[78, 83]. Para além disso, o mel de manuka contém polifenóis e flavonóides o que confere as propriedades antioxidantes[78, 79, 81]. Os resultados obtidos por Brites et al. demonstraram que a avaliação da CMI e da CMB do mel de manuka apresentou efeitos bactericidas e bacteriostáticos face a *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,

E. coli e *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores obtidos para as CMI e para as CMB foram de 35,5%, à exceção da CMI para *S. aureus* que apresentou um valor mais baixo, de 17,8%[43]. Para a avaliação da acção antimicrobiana do hidrogel foram utilizadas concentrações de 40% e 27% de mel de manuka, apresentando, em ambos os casos, eficácia contra *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, mostrando-se sem eficácia contra *P. aeruginosa*[43]. Os ensaios de citocompatibilidade *in vitro* demonstraram que o hidrogel com mel de manuka a 40% era tóxico para as células, reduzindo a viabilidade celular para 50-60%, cujo limite é de 70%[43]. Já o hidrogel com mel de manuka a 27% não demonstrou citotoxicidade para as células, inclusive aumentou em 20% a atividade metabólica celular dos fibroblastos, tornando-se uma alternativa segura e eficaz[43]. Foram também realizados ensaios de avaliação da atividade antioxidante contra DPPH, utilizando o ácido ascórbico como controlo positivo, demonstrando atividade antioxidante semelhante[43]. Assim, este hidrogel de gelatina e mel de manuka apresenta resultados promissores relativamente à atividade antimicrobiana e regeneração cutânea, no entanto serão necessários mais estudos para justificar a ineficácia para *P. aeruginosa*, uma vez que o mel de manuka quando utilizado isoladamente apresenta ação contra esta bactéria[43, 84].

O último exemplo a mencionar é o penso 3D produzido por Jafari et al., os autores desenvolveram um penso em 3D à base de fibroína de seda (FS) e queratina de lã (QL) interligadas com ácido tânico (AT), cujo propósito era avaliar o impacto na cicatrização de feridas[44]. A FS constitui uma proteína natural extraída do bicho-da-seda, que apresenta elevada resistência mecânica, biocompatibilidade e elasticidade[85, 86]. Este composto atua como base estrutural que facilita a adesão e proliferação celular e permite o controlo dos processos moleculares, como a regulação de fatores de transcrição e a libertação de fatores de crescimento[86–88]. A QL é uma proteína de origem animal que apresenta elevada capacidade de ligação e proliferação celular[44, 89]. Já o AT é um composto natural obtido a partir de plantas que apresenta propriedades antimicrobianas e antioxidantes[90–92]. Para além disso, este composto é biocompatível e atua como regenerador cutâneo e como agente ligante para polímeros naturais[44, 90, 92]. Os resultados obtidos por Jafari et al. demonstraram capacidade de retenção de água do hidrogel com FS, QL e AT, comparativamente ao grupo controlo constituído um hidrogel de FS e AT, tendo-se verificado que o primeiro apresentava uma taxa de absorção de água 90% superior ao segundo[44]. Verificou-se assim que a QL que conferiu a capacidade de absorção de exsudados existentes nas feridas, permitindo um melhor processo de cicatrização[44]. No ensaio para a avaliação das propriedades antioxidantes deste penso foi

utilizado o DPPH e obteve-se uma taxa de sequestro de 84,4%, confirmando-se a ação antioxidante desta formulação[44]. Como a FS e a QL não apresentam ação antioxidante descrita na literatura, confirmou-se que foi o AT que concedeu esta propriedade[44]. A atividade antibacteriana foi determinada face a *S. aureus* e para *E. coli*, demonstrando que ambos os hidrogéis apresentavam ação antimicrobiana e de forma idêntica[44]. Como a FS não apresenta ação antimicrobiana descrita, as propriedades antimicrobianas foram conferidas também pelo AT, que está presente em ambos os hidrogéis[44]. Já os ensaios de citocompatibilidade revelaram que o penso de FS e QL e AT não demonstrava citotoxicidade para as células, promovendo a proliferação celular e elevada viabilidade celular (93,5%)[44]. Para avaliar o processo de cicatrização *in vivo* foram utilizados ratos, cujos resultados demonstraram que todos sobreviveram sem infecção nas feridas[44]. No entanto, nos casos onde foram aplicados o hidrogel de FS, QL e AT ou o hidrogel com FS e AT verificou-se uma melhor cicatrização, comparativamente ao grupo controlo após 14 dias[44]. Assim, este hidrogel demonstrou elevada capacidade na promoção da cicatrização de feridas *in vivo*, com propriedades antibacterianas e antioxidantes e citocompatibilidade, o que sustenta a aplicação na prática clínica[44]. Este penso apresenta uma formulação que atua de forma sinérgica, no entanto é o TA que lhe confere as propriedades antioxidantes e antibacterianas que são cruciais para a ação terapêutica deste penso[44, 90].

6. Diferentes tipologias de pensos 3D antimicrobianos obtidos por impressão

A impressão 3D permite a obtenção de pensos com estruturas variadas, permitindo ir de encontro às necessidades da ferida e promover a cicatrização[1, 4, 5, 12]. A fase inicial da produção 3D do penso é constituída pelo protótipo digital, que será o molde para o fabrico do penso, como podemos verificar na Figura 2 a) [37]. O exemplo da Figura 2 a) demonstra a matriz utilizada para a elaboração de um hidrogel em *scaffold* e as Figuras 2 b) e c) correspondem à estrutura 3D impressa do hidrogel[37]. Os pensos em formato *scaffold* apresentam uma estrutura porosa, sendo possível personalizar o tamanho dos respetivos poros, são compatíveis com a veiculação de diversos materiais, a estrutura em malha proporciona entrada de oxigénio e o formato esponjoso possibilita a absorção de exsudados da ferida, ao mesmo tempo que mantém um ambiente húmido para a cicatrização de feridas[8, 37].

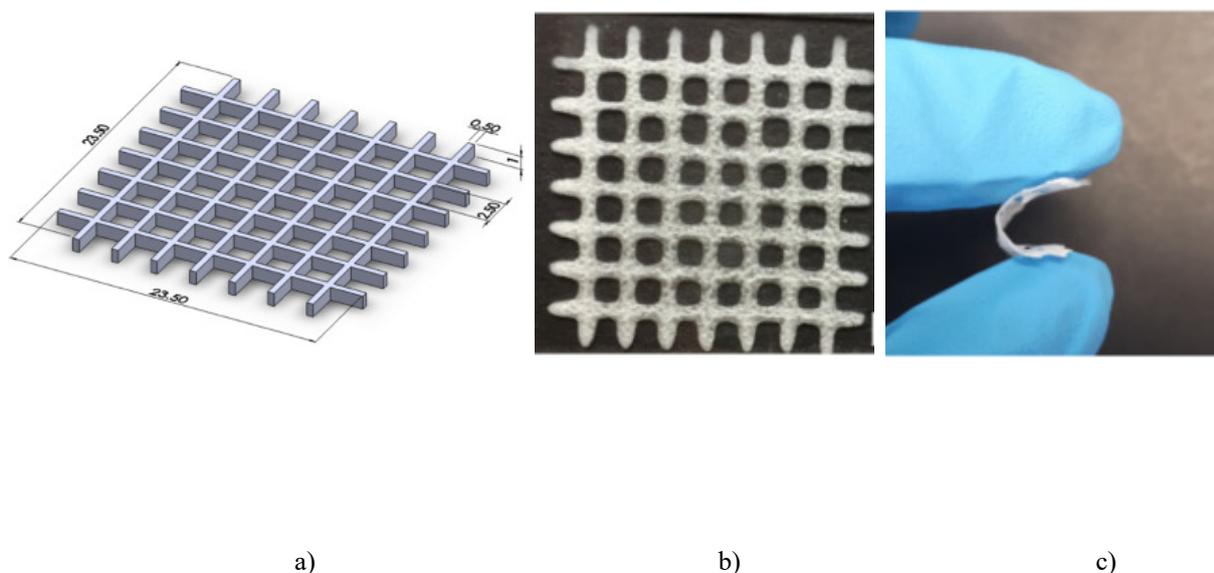


Figura 2 – a) Protótipo digital de um penso 3D em *scaffold*, b) e c) Hidrogel em *scaffold*, adaptado de Long et al.[37]

Os hidrogéis impressos em 3D são pensos com elevada importância na prática clínica porque ao serem constituídos por cadeias hidrofílicas conseguem manter a humidade da ferida, permitem a veiculação de substâncias ativas e apresentam elevada elasticidade e capacidade para absorção de exsudados[3, 52]. Os hidrogéis impressos em 3D podem ser constituídos por

uma diversidade de polímeros, naturais ou sintéticos, na Figura 3 a) encontra-se um hidrogel em 3D constituído por alginato, na Figura 3 b) encontra-se esquematizado o protótipo em 3D do hidrogel de GeM e na Figura 3 c) encontra-se o hidrogel de GeM já impresso em 3D[38, 39].

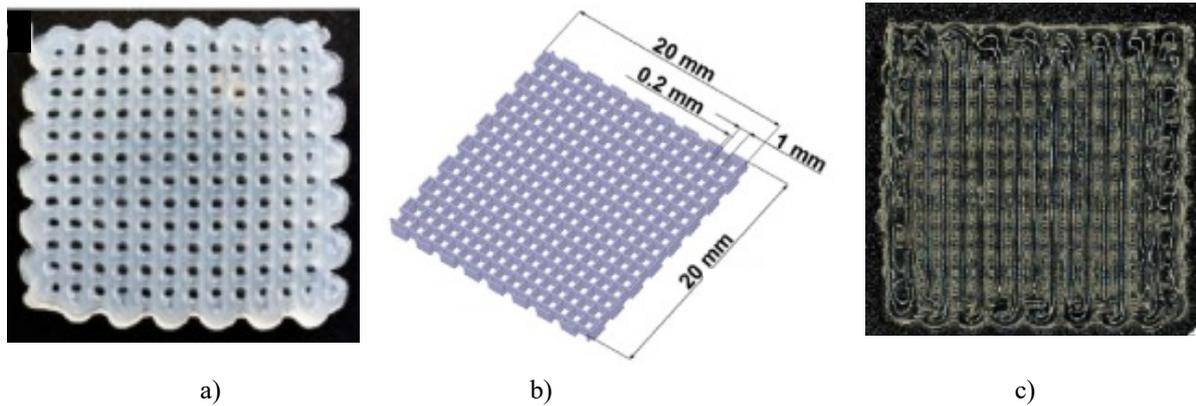


Figura 3 – a) Hidrogel de alginato, b) Protótipo digital do hidrogel de GeM c) Hidrogel de GeM impresso em 3D, adaptado de Huang et al. e Mirek et al.[38], [39]

O último exemplo de tipologia de pensos impressos em 3D referidos nos estudos anteriores foi o penso propriamente dito, que podemos encontrar na Figura 4 e representa o penso em 3D de PDMS para veicular NP Ag e óleo de infusão de PDMS[41]. Este penso é constituído por um polímero hidrofóbico, mas flexível, por isso quando impresso em 3D origina este tipo de penso[41].

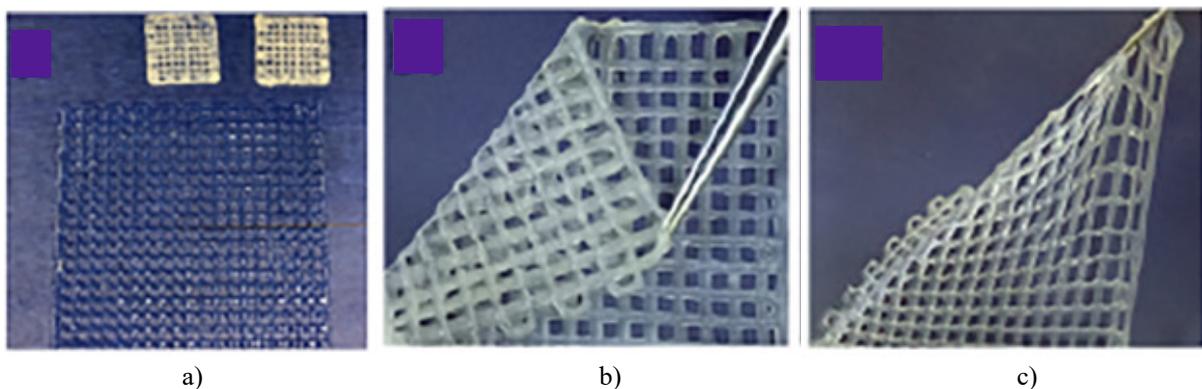


Figura 4 – a), b) e c) Penso em 3D constituído por polidimetilsiloxano, nanopartículas de prata e óleo de infusão de polidimetilsiloxano, adaptado de Shi et al.[41]

7. Perspetivas futuras

Um dos grandes desafios na impressão 3D é a avaliação dos riscos para a saúde humana e para o meio ambiente associados às propriedades ativas dos materiais utilizados na sua produção[1, 5, 12]. Assim, a introdução desta nova tecnologia no mercado apresenta algumas dificuldades, uma vez que as entidades reguladoras requerem dados adicionais acerca das matérias-primas aplicadas[1, 12]. Para além disso, a entidade reguladora visa padronizar todo o processo de impressão 3D, desde o protótipo digital ao produto final produzido, definindo as diretrizes regulatórias e os respetivos sistemas de controlo de qualidade, de forma a garantir que o produto final apresenta a qualidade e segurança necessárias para o fim a que se destina[1, 12, 15]. Assim, apesar de todo este processo garantir a segurança do doente, constitui também um obstáculo ao desenvolvimento tecnológico na impressão 3D[1, 12].

A utilização de polímeros sintéticos na impressão 3D de pensos antimicrobianos permite mimetizar as propriedades mecânicas e físicas da pele, possibilita a libertação controlada de fármacos e oferece versatilidade ao produto final produzido[27]. Porém, os polímeros sintéticos são muitas vezes manuseados com solventes tóxicos, cujas temperaturas de fusão são superiores à temperatura corporal, mantendo-os em contacto com o organismo durante o tratamento[27]. Os polímeros sintéticos apresentam também algumas lacunas na integração de moléculas e/ou estruturas que mimetizem a atividade biológica das células, diminuindo a sua biocompatibilidade[27, 28]. Para além disso, os polímeros sintéticos são constituídos por plásticos termofixos e apresentam uma degradação dificultada, mesmo após a utilização do penso, dando origem a poluição ambiental[93, 94]. Assim, é importante a escolha de materiais sustentáveis que sejam seguros tanto para o doente como para o meio ambiente[93].

Ainda que a impressão 3D constitua um grande avanço tecnológico, já é possível encontrar novas atualizações a este método, designadas como impressão 4D[1, 93–95]. Portanto, a inovação é o facto de permitir que o produto final produzido em 3D seja dinâmico, ou seja, que consiga modificar a sua forma de acordo com um estímulo ambiental, como é o caso da temperatura, pH e/ou da luz[1, 3, 93, 94]. Assim, a particularidade da impressão 4D face à 3D é a utilização de biomateriais que possuem a capacidade de responder a estímulos celulares, permitindo a adaptação do produto final produzido ao ambiente onde se encontra, devolvendo-lhe as condições necessárias para uma melhor cicatrização[1, 93, 94].

8. Conclusão

O tratamento convencional utilizado para a cicatrização de feridas pode não responder às necessidades específicas do doente, uma vez que as feridas apresentam vários tamanhos, formatos e diferentes estádios de gravidade. Assim, esta abordagem padronizada traduz-se muitas das vezes num tratamento ineficaz. A impressão 3D de pensos vem dar uma resposta às lacunas existentes no tratamento convencional utilizado para a cicatrização de feridas. A impressão 3D é uma tecnologia singular, pois permite a adaptação das propriedades mecânicas e físicas do penso, proporcionando as condições adequadas para as diferentes fases de cicatrização de feridas. Assim, é possível produzir um penso personalizado que vai de encontro às necessidades do doente, uma vez que é impresso com a estrutura, o tamanho e a composição ideal para promover a cicatrização da ferida.

A impressão 3D tem demonstrado ser uma ferramenta promissora e versátil, pois permite a elaboração de um produto final, através de diferentes métodos e utilizando uma grande variedade de materiais e princípios ativos na sua construção. Esta nova tecnologia permite a produção de pensos com sistemas de libertação de matérias-primas ativas complexos e personalizados, proporcionando melhores opções terapêuticas e de acordo com as necessidades de cada doente.

O aumento da prevalência de feridas infetadas por bactérias multirresistentes tem sido alvo de elevada preocupação por parte dos sistemas de saúde, uma vez que a eficácia dos tratamentos antimicrobianos usualmente prescritos se encontra diminuída. Assim, a impressão 3D de pensos com a possibilidade de veicular fármacos e outras matérias-primas ativas, controlando a libertação dos mesmos, permite direccionar o tratamento e reduzir o desenvolvimento de resistência aos antibióticos. Para além disso, os pensos impressos em 3D podem permitir uma cicatrização mais rápida, ao oferecer as condições ideais de cicatrização, e diminuir o risco de novas infeções.

Quando o tratamento de uma ferida infetada é personalizado, é possível obter uma melhor eficácia clínica, melhorando assim a qualidade de vida do doente e de uma forma mais eficiente. Uma das grandes vantagens da impressão 3D é a nível económico, porque para além de constituir um método de produção relativamente barato, com um tratamento personalizado é possível diminuir os custos associados, pela diminuição do desperdício de tempo e de recursos utilizados durante todo o processo.

Foram referidos alguns estudos no âmbito da impressão 3D de pensos antimicrobianos para veicular fármacos que apresentam um elevado potencial para aplicação na prática clínica. Um dos exemplos referidos foi o hidrogel desenvolvido por Long et al. composto por quitosano, pectina e lidocaína que constitui uma alternativa viável e biocompatível com vantagens terapêuticas relativamente aos tratamentos convencionais atualmente utilizados na cicatrização de feridas. Já o hidrogel produzido por Huang et al. constituído por alginato, NP Ca e bacitracina demonstrou um elevado potencial de utilização no controlo da libertação de fármacos antimicrobianos, de acordo com o pH existente na pele. Por fim, o hidrogel produzido por Mirek et al. constituído por GeM e ampicilina veiculada em microesferas de PES permite a libertação adequada da ampicilina, de forma a promover a eliminação de bactérias.

Foram também referidos alguns exemplos de impressão 3D de pensos antimicrobianos para veicular metais e nanopartículas metálicas, nomeadamente Muwaffak et al. desenvolveu um penso constituído por Huang e veiculado separadamente com iões de zinco, cobre e prata. Os resultados demonstraram ação antibacteriana nos pensos com veiculação de iões de cobre e de prata. Um outro exemplo foi produzido por Shi et al. que desenvolveu um penso em 3D de PDMS veiculado com NP Ag e óleo de infusão de PDMS, que demonstrou biocompatibilidade e permitiu a inibição da adesão e da atividade bacteriana, melhorando o processo de cicatrização de feridas.

Os pensos em 3D com ação antimicrobiana podem também veicular outros componentes ativos, para além dos referidos anteriormente, salientando-se o penso 3D produzido por Domínguez-Robles et al. constituído por lignina, curcuma, D-pantenol e PCL, que demonstrou biocompatibilidade e propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Um outro exemplo de penso em 3D foi produzido por Brites et al., que desenvolveram um hidrogel à base de gelatina e mel de manuka, cujos resultados foram promissores relativamente à atividade antimicrobiana e regeneração cutânea. Por fim, Jafari et al. desenvolveu um penso em 3D à base de FS e QL interligadas com AT, cujos resultados demonstraram elevada capacidade de cicatrização de feridas *in vivo*, citocompatibilidade e propriedades antibacterianas e antioxidantes.

Bibliografia

- [1] D. T. Uchida and M. L. Bruschi, “3D Printing as a Technological Strategy for the Personalized Treatment of Wound Healing,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 24, no. 1, 2023, doi: 10.1208/s12249-023-02503-0.
- [2] T. Zhang *et al.*, “Fabrication and characterization of double-layer asymmetric dressing through electrostatic spinning and 3D printing for skin wound repair,” *Materials & Design*, vol. 218, p. 110711, 2022, doi: 10.1016/j.matdes.2022.110711.
- [3] Z. Aliakbar Ahovan *et al.*, “Antibacterial smart hydrogels: New hope for infectious wound management,” *Materials Today Bio*, vol. 17, 2022, doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100499.
- [4] A. G. Tabriz and D. Douroumis, “Recent advances in 3D printing for wound healing: A systematic review,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 74, no. June, p. 103564, 2022, doi: 10.1016/j.jddst.2022.103564.
- [5] A. T. Yayehrad, E. A. Siraj, M. Matsabisa, and G. Birhanu, “3D printed drug loaded nanomaterials for wound healing applications,” *Regenerative Therapy*, vol. 24, pp. 361–376, 2023, doi: 10.1016/j.reth.2023.08.007.
- [6] Y. Liang, Y. Liang, H. Zhang, and B. Guo, “Antibacterial biomaterials for skin wound dressing,” *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 17, no. 3, pp. 353–384, 2022, doi: 10.1016/j.ajps.2022.01.001.
- [7] L. Miranda-Calderon *et al.*, “Combinatorial wound dressings loaded with synergistic antibiotics in the treatment of chronic infected wounds,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 476, 2023, doi: 10.1016/j.cej.2023.146679.
- [8] M. H. Norahan, S. C. Pedroza-González, M. G. Sánchez-Salazar, M. M. Álvarez, and G. Trujillo de Santiago, “Structural and biological engineering of 3D hydrogels for wound healing,” *Bioactive Materials*, vol. 24, pp. 197–235, 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.11.019.
- [9] B. Jia, G. Li, E. Cao, J. Luo, X. Zhao, and H. Huang, “Recent progress of antibacterial hydrogels in wound dressings,” *Materials Today Bio*, vol. 19, 2023, doi:

- 10.1016/j.mtbio.2023.100582.
- [10] Y. Sun, A. D. Juncos Bombin, P. Boyd, N. Dunne, and H. O. McCarthy, “Application of 3D printing & 3D bioprinting for promoting cutaneous wound regeneration,” *Bioprinting*, vol. 28. 2022, doi: 10.1016/j.bprint.2022.e00230.
- [11] R. Laurano, M. Boffito, G. Ciardelli, and V. Chiono, “Wound dressing products: A translational investigation from the bench to the market,” *Engineered Regeneration*, vol. 3, no. 2, pp. 182–200, 2022, doi: 10.1016/j.engreg.2022.04.002.
- [12] M. Pita-Vilar, A. Concheiro, C. Alvarez-Lorenzo, and L. Diaz-Gomez, “Recent advances in 3D printed cellulose-based wound dressings: A review on in vitro and in vivo achievements,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 321. 2023, doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121298.
- [13] H. Cui, J. Cai, H. He, S. Ding, Y. Long, and S. Lin, “Tailored chitosan/glycerol micropatterned composite dressings by 3D printing for improved wound healing,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 255. 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127952.
- [14] N. Shahrubudin, T. C. Lee, and R. Ramlan, “An overview on 3D printing technology: Technological, materials, and applications,” *Procedia Manufacturing*, vol. 35, pp. 1286–1296, 2019, doi: 10.1016/j.promfg.2019.06.089.
- [15] K. Englezos, L. Wang, E. C. K. Tan, and L. Kang, “3D printing for personalised medicines: implications for policy and practice,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 635. 2023, doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.122785.
- [16] C. Li, D. Pisignano, Y. Zhao, and J. Xue, “Advances in Medical Applications of Additive Manufacturing,” *Engineering*, vol. 6, no. 11. pp. 1222–1231, 2020, doi: 10.1016/j.eng.2020.02.018.
- [17] J. H. Teoh, S. M. Tay, J. Fuh, and C. H. Wang, “Fabricating scalable, personalized wound dressings with customizable drug loadings via 3D printing,” *Journal of Controlled Release*, vol. 341. pp. 80–94, 2022, doi: 10.1016/j.jconrel.2021.11.017.
- [18] M. A. F. Maghsoudi *et al.*, “3D-printing of alginate/gelatin scaffold loading tannic

- acid@ZIF-8 for wound healing: In vitro and in vivo studies,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 265. 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130744.
- [19] A. A. Elhadad *et al.*, “Applications and multidisciplinary perspective on 3D printing techniques: Recent developments and future trends,” *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 156. 2023, doi: 10.1016/j.mser.2023.100760.
- [20] A. Sorkio *et al.*, “Human stem cell based corneal tissue mimicking structures using laser-assisted 3D bioprinting and functional bioinks,” *Biomaterials*, vol. 171. pp. 57–71, 2018, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.034.
- [21] G. L. Duffy, H. Liang, R. L. Williams, D. A. Wellings, and K. Black, “3D reactive inkjet printing of poly- ϵ -lysine/gellan gum hydrogels for potential corneal constructs,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 131. 2021, doi: 10.1016/j.msec.2021.112476.
- [22] A. Aimar, A. Palermo, and B. Innocenti, “The Role of 3D Printing in Medical Applications: A State of the Art,” *Journal of Healthcare Engineering Eng.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/5340616.
- [23] Muskan, D. Gupta, and N. P. Negi, “3D bioprinting: Printing the future and recent advances,” *Bioprinting*, vol. 27, no. May, p. e00211, 2022, doi: 10.1016/j.bprint.2022.e00211.
- [24] A. Tikhonov *et al.*, “Stereolithographic fabrication of three-dimensional permeable scaffolds from CaP/PEGDA hydrogel biocomposites for use as bone grafts,” *Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 110, no. March, p. 103922, 2020, doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103922.
- [25] O. Kammona, E. Tsanaktsidou, and C. Kiparissides, “Recent Developments in 3D-(Bio)printed Hydrogels as Wound Dressings,” *MDPI*, 2024, doi: 10.1007/s00113-012-2207-y.
- [26] N. Li, D. Qiao, S. Zhao, Q. Lin, B. Zhang, and F. Xie, “3D printing to innovate biopolymer materials for demanding applications: A review,” *Materials Today Chemistry*, vol. 20. 2021, doi: 10.1016/j.mtchem.2021.100459.
- [27] M. Deptuła, M. Zawrzykraj, J. Sawicka, A. Banach-Kopec, R. Tylingo, and M. Piķuła,

- “Application of 3D- printed hydrogels in wound healing and regenerative medicine,” *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 167. 2023, doi: 10.1016/j.biopha.2023.115416.
- [28] H. Zhang, X. Lin, X. Cao, Y. Wang, J. Wang, and Y. Zhao, “Developing natural polymers for skin wound healing,” *Bioactive Materials*, vol. 33. pp. 355–376, 2024, doi: 10.1016/j.bioactmat.2023.11.012.
- [29] X. Bi and R. Huang, “3D printing of natural fiber and composites: A state-of-the-art review,” *Materials and Design*, vol. 222. 2022, doi: 10.1016/j.matdes.2022.111065.
- [30] A. Sadeghianmaryan *et al.*, “Advancements in 3D-printable polysaccharides, proteins, and synthetic polymers for wound dressing and skin scaffolding – A review,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 266, no. P1, p. 131207, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131207.
- [31] Y. Iqbal, F. Amin, Y. Usman, and M. Farrukh Sarfraz, “Alginate-Based hydrogels with inorganic Nanomaterials: A promising approach for wound healing and bone tissue regeneration,” *European Polymer Journal*, vol. 212. 2024, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2024.113057.
- [32] H. Baniasadi *et al.*, “Innovations in hydrogel-based manufacturing: A comprehensive review of direct ink writing technique for biomedical applications,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 324. 2024, doi: 10.1016/j.cis.2024.103095.
- [33] A. S. Saraiva *et al.*, “3D-printed platform multi-loaded with bioactive, magnetic nanoparticles and an antibiotic for re-growing bone tissue,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 593. 2021, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.120097.
- [34] A. Sharma, D. Dheer, V. Puri, A. Alsayari, S. Wahab, and P. Kesharwani, “Insights of biopolymeric blended formulations for diabetic wound healing,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 656, no. February, p. 124099, 2024, doi: 10.1016/j.ijpharm.2024.124099.
- [35] S. N. Nandhini *et al.*, “Recent advances in green synthesized nanoparticles for bactericidal and wound healing applications,” *Heliyon*, vol. 9, no. 2. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13128.

- [36] M. T. Doganay *et al.*, “3D printed materials for combating antimicrobial resistance,” *Mater Today*, vol. 67, no. August, pp. 371–398, 2023, doi: 10.1016/j.mattod.2023.05.030.
- [37] J. Long, A. E. Etxeberria, A. V. Nand, C. R. Bunt, S. Ray, and A. Seyfoddin, “A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery,” *Materials Science and Engineering: C*, vol. 104, no. March, p. 109873, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109873.
- [38] T. Huang, Z. Sun, D. E. Heath, N. O’Brien-Simpson, and A. J. O’Connor, “3D printed and smart alginate wound dressings with pH-responsive drug and nanoparticle release,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 492. 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.152117.
- [39] A. Mirek *et al.*, “Gelatin methacrylate hydrogel with drug-loaded polymer microspheres as a new bioink for 3D bioprinting,” *Biomaterials Advances*, vol. 150. 2023, doi: 10.1016/j.bioadv.2023.213436.
- [40] Z. Muwaffak, A. Goyanes, V. Clark, A. W. Basit, S. T. Hilton, and S. Gaisford, “Patient-specific 3D scanned and 3D printed antimicrobial polycaprolactone wound dressings,” *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.077>.
- [41] G. Shi *et al.*, “Biomimicry of oil infused layer on 3D printed poly(dimethylsiloxane): Non-fouling, antibacterial and promoting infected wound healing,” *Materials Science and Engineering C*, vol. 100. pp. 915–927, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.03.058.
- [42] J. Domínguez-Robles *et al.*, “Poly(caprolactone)/lignin-based 3D-printed dressings loaded with a novel combination of bioactive agents for wound-healing applications,” *Sustainable Materials and Technologies*, vol. 35. 2023, doi: 10.1016/j.susmat.2023.e00581.
- [43] A. Brites *et al.*, “Fabrication of antibacterial and biocompatible 3D printed Manuka-Gelatin based patch for wound healing applications,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 632. 2023, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.122541.
- [44] H. Jafari *et al.*, “Tissue adhesive hydrogel based on upcycled proteins and plant polyphenols for enhanced wound healing,” *Materials Today Chemistry*, vol. 33. 2023,

- doi: 10.1016/j.mtchem.2023.101722.
- [45] Z. Asvar *et al.*, “Enhancing antibacterial activity against multi-drug resistant wound bacteria: Incorporating multiple nanoparticles into chitosan-based nanofibrous dressings for effective wound regeneration,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 95, no. February, p. 105542, 2024, doi: 10.1016/j.jddst.2024.105542.
- [46] A. O. Silva, R. S. Cunha, D. Hotza, and R. A. F. Machado, “Chitosan as a matrix of nanocomposites: A review on nanostructures, processes, properties, and applications,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 272. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118472.
- [47] S. Cardoso, F. Narciso, N. Monge, A. Bettencourt, and I. A. C. Ribeiro, “Improving Chitosan Hydrogels Printability: A Comprehensive Study on Printing Scaffolds for Customized Drug Delivery,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 2, 2023, doi: 10.3390/ijms24020973.
- [48] K. Varaprasad, T. Jayaramudu, V. Kanikireddy, C. Toro, and E. R. Sadiku, “Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 236, no. February, p. 116025, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116025.
- [49] M. Nakamura, H. Araki, H. Tsurushima, and A. Oyane, “Fabrication of water-dispersible and cell-stimulating calcium phosphate nanoparticles immobilizing basic fibroblast growth factor,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 230, no. August, p. 113502, 2023, doi: 10.1016/j.colsurfb.2023.113502.
- [50] B. Wang, Y. Lang, C. Li, S. Liu, and M. W. Chang, “Biomimetic 3D composite scaffold with pH-Responsive micropatterns for wound healing,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 485, no. February, p. 149646, 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.149646.
- [51] W. Cao *et al.*, “Antibacterial and antioxidant wound dressings with pH responsive release properties accelerate chronic wound healing,” *Material Today Physics*, vol. 40, no. October 2023, p. 101316, 2024, doi: 10.1016/j.mtphys.2023.101316.
- [52] J. Zhu *et al.*, “Smart bioadhesives for wound healing and closure,” *Bioactive Materials*, vol. 19. pp. 360–375, 2023, doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.04.020.

- [53] D. Kim, J. U. Lee, and G. H. Kim, “Biomimetic gelatin/HA biocomposites with effective elastic properties and 3D-structural flexibility using a 3D-printing process,” *Additive Manufacturing*, vol. 36, no. April, p. 101616, 2020, doi: 10.1016/j.addma.2020.101616.
- [54] S. Nagarajan *et al.*, “Sacrificial mold-assisted 3D printing of stable biocompatible gelatin scaffolds,” *Bioprinting*, vol. 22, 2021, doi: 10.1016/j.bprint.2021.e00140.
- [55] Q. P. Cheng and S. hui Hsu, “A self-healing hydrogel and injectable cryogel of gelatin methacryloyl-polyurethane double network for 3D printing,” *Acta Biomaterialia*, vol. 164, pp. 124–138, 2023, doi: 10.1016/j.actbio.2023.04.023.
- [56] P. Shukla, M. Mitruka, and F. Pati, “The effect of the synthetic route on the biophysiochemical properties of methacrylated gelatin (GelMA) based hydrogel for development of GelMA-based bioinks for 3D bioprinting applications,” *Materialia*, vol. 25, no. April, p. 101542, 2022, doi: 10.1016/j.mtla.2022.101542.
- [57] Í. Soares *et al.*, “Drug Delivery from PCL/Chitosan Multilayer Coatings for Metallic Implants,” *ACS Omega*, vol. 7, no. 27, pp. 23096–23106, 2022, doi: 10.1021/acsomega.2c00504.
- [58] M. S. V. Ferreira and S. H. Mousavi, “Nanofiber technology in the ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem cells,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 14, no. 5, pp. 1707–1718, 2018, doi: 10.1016/j.nano.2018.04.017.
- [59] O. Eskikaya, R. Kucukosman, S. Ozdemir, M. S. Yalcin, K. Ocakoglu, and N. Dizge, “Investigation of the treatment and antibacterial properties of pollutant-containing water using black phosphorus blended polyethersulfone membranes (BP@PES),” *Journal of Water Process Eng.*, vol. 57, no. November 2023, p. 104581, 2024, doi: 10.1016/j.jwpe.2023.104581.
- [60] Y. H. Lim, E. C. Wong, W. C. Chong, A. W. Mohammad, C. H. Koo, and W. J. Lau, “Introducing self-healing properties to polyethersulfone (PES) membrane via poly(vinyl alcohol)/ polyacrylic acid (PVA/PAA) surface coating,” *Chemosphere*, vol. 349, no. November 2023, p. 140772, 2024, doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140772.
- [61] S. Thottathil, Y. M. Puttaiahgowda, and S. Kanth, “Advancement and future

- perspectives on ampicillin-loaded antimicrobial polymers- A review,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 81. 2023, doi: 10.1016/j.jddst.2023.104227.
- [62] S. Sam, B. Joseph, and S. Thomas, “Exploring the antimicrobial features of biomaterials for biomedical applications,” *Results in Engineering*, vol. 17. 2023, doi: 10.1016/j.rineng.2023.100979.
- [63] Y. Pang *et al.*, “Multifunctional Ac@ZIF-8/AgNPs nanoplatform with pH-responsive and ROS scavenging antibacterial properties promotes infected wound healing,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 489. 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.151485.
- [64] I. Anjos, A. F. Bettencourt, and I. A. C. Ribeiro, “Antimicrobial Biosurfactants Towards the Inhibition of Biofilm Formation,” *Urinary Stents Current State and Future Perspectives*, pp. 291–304, 2022, doi: 10.1007/978-3-031-04484-7_23.
- [65] Y. Zhang *et al.*, “Functional carbohydrate-based hydrogels for diabetic wound therapy,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 312, no. November 2022, p. 120823, 2023, doi: 10.1016/j.carbpol.2023.120823.
- [66] G. R. Tortella *et al.*, “Silver, copper and copper oxide nanoparticles in the fight against human viruses: progress and perspectives,” *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 42, no. 3, pp. 431–449, 2022, doi: 10.1080/07388551.2021.1939260.
- [67] G. Kumar, F. G. Khan, M. I. Abro, U. Aftab, and A. W. Jatoi, “Development of cellulose acetate/CuO/AgNP nanofibers based effective antimicrobial wound dressing,” *Composites Communications*, vol. 39, no. January, p. 101550, 2023, doi: 10.1016/j.coco.2023.101550.
- [68] C. Wang, S. Zainal Abidin, N. M. P. Toyong, W. Zhu, and Y. Zhang, “Mildew resistance and antibacterial activity of plywood decorated with ZnO/TiO₂ nanoparticle,” *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 28, no. 4, p. 101877, 2024, doi: 10.1016/j.jscs.2024.101877.
- [69] W. J. Chong *et al.*, “Additive manufacturing of antibacterial PLA-ZnO nanocomposites: Benefits, limitations and open challenges,” *Journal of Materials Science and Technology*, vol. 111. pp. 120–151, 2022, doi: 10.1016/j.jmst.2021.09.039.

- [70] L. Jiang, Y. Huang, X. Zhang, and H. Qin, "Electrohydrodynamic inkjet printing of Polydimethylsiloxane (PDMS)," *Procedia Manufacturing*, vol. 48. pp. 90–94, 2020, doi: 10.1016/j.promfg.2020.05.024.
- [71] Y. Jiang, J. Huang, X. Wu, Y. Ren, Z. Li, and J. Ren, "Controlled release of silver ions from AgNPs using a hydrogel based on konjac glucomannan and chitosan for infected wounds," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 149. pp. 148–157, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.221.
- [72] L. Su, Y. Jia, L. Fu, K. Guo, and S. Xie, "The emerging progress on wound dressings and their application in clinic wound management," *Heliyon*, vol. 9, no. 12, p. e22520, 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e22520.
- [73] R. Padalkar, A. Madgulkar, R. Mate, A. Pawar, A. Shinde, and S. Lohakare, "Investigation of curcumin nanoparticles and D –panthenol for diabetic wound healing in wistar rats: Formulation, statistical optimization and in-vivo evaluation," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 93, no. September 2023, p. 105390, 2024, doi: 10.1016/j.jddst.2024.105390.
- [74] P. T. Le, S. H. An, and H. H. Jeong, "Microfluidic Tesla mixer with 3D obstructions to exceptionally improve the curcumin encapsulation of PLGA nanoparticles," *Chemical Engineering Journal*, vol. 483, no. August 2023, p. 149377, 2024, doi: 10.1016/j.cej.2024.149377.
- [75] Z. Liu *et al.*, "3D printing of curcumin enriched Pickering emulsion gel stabilized by pea protein-carrageenan complexes," *Food Hydrocolloids*, vol. 146, no. PA, p. 109170, 2024, doi: 10.1016/j.foodhyd.2023.109170.
- [76] J. Yang *et al.*, "Lignin: A multi-faceted role/function in 3D printing inks," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 267, no. P2, p. 131364, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131364.
- [77] Z. Wan, H. Zhang, M. Niu, Y. Guo, and H. Li, "Recent advances in lignin-based 3D printing materials: A mini-review," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 253, no. P1, p. 126660, 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126660.

- [78] A. Ullah *et al.*, “Manuka honey incorporated cellulose acetate nanofibrous mats: Fabrication and in vitro evaluation as a potential wound dressing,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 155. pp. 479–489, 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.237.
- [79] E. M. Halawani, “Potential effects of Saudi Shaoka (*Fagonia bruguieri*) honey against multi-drug-resistant bacteria and cancer cells in comparison to Manuka honey,” *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 28, no. 12. pp. 7379–7389, 2021, doi: 10.1016/j.sjbs.2021.08.055.
- [80] H. Wu, J. Chen, P. Zhao, M. Liu, F. Xie, and X. Ma, “Development and Prospective Applications of 3D Membranes as a Sensor for Monitoring and Inducing Tissue Regeneration,” *Membranes (Basel)*, vol. 13, no. 9, 2023, doi: 10.3390/membranes13090802.
- [81] L. Živković *et al.*, “Manuka honey attenuates oxidative damage induced by H₂O₂ in human whole blood in vitro,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 119. pp. 61–65, 2018, doi: 10.1016/j.fct.2018.05.034.
- [82] A. Scalzone *et al.*, “Valuable effect of Manuka Honey in increasing the printability and chondrogenic potential of a naturally derived bioink,” *Materials Today Bio*, vol. 14, no. May, p. 100287, 2022, doi: 10.1016/j.mtbio.2022.100287.
- [83] B. Khataybeh, Z. Jaradat, and Q. Ababneh, “Anti-bacterial, anti-biofilm and anti-quorum sensing activities of honey: A review,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 317. 2023, doi: 10.1016/j.jep.2023.116830.
- [84] S. Wang, Y. Qiu, and F. Zhu, “An updated review of functional ingredients of Manuka honey and their value-added innovations,” *Food Chemistry*, vol. 440, no. July 2023, p. 138060, 2024, doi: 10.1016/j.foodchem.2023.138060.
- [85] F. Norouzi, F. Bagheri, and S. Hashemi-Najafabadi, “Alendronate releasing silk fibroin 3D bioprinted scaffolds for application in bone tissue engineering: Effects of alginate concentration on printability, mechanical properties and stability,” *Results in Engineering*, vol. 22, no. May, p. 102186, 2024, doi: 10.1016/j.rineng.2024.102186.
- [86] F. Agostinacchio, V. Fitzpatrick, S. Dirè, D. L. Kaplan, and A. Motta, “Silk fibroin-

- based inks for in situ 3D printing using a double crosslinking process,” *Bioactive Materials*, vol. 35, no. October 2023, pp. 122–134, 2024, doi: 10.1016/j.bioactmat.2024.01.015.
- [87] D. González-Restrepo, A. Zuluaga-Vélez, L. M. Orozco, and J. C. Sepúlveda-Arias, “Silk fibroin-based dressings with antibacterial and anti-inflammatory properties,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 195. 2024, doi: 10.1016/j.ejps.2024.106710.
- [88] J. Li *et al.*, “The silk fibroin nanofibrous membrane loaded with polyhexamethyl biguanide for promoting infected wound healing,” *European Polymer Journal*, vol. 202. 2024, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2023.112666.
- [89] E. Ranjit, S. Hamlet, R. George, A. Sharma, and R. M. Love, “Biofunctional approaches of wool-based keratin for tissue engineering,” *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, vol. 7, no. 1. 2022, doi: 10.1016/j.jsamd.2021.10.001.
- [90] M. Wekwejt *et al.*, “Hyaluronic acid/tannic acid films for wound healing application,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 254. 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128101.
- [91] X. Wang *et al.*, “New plant polyphenol-derived tannic acid-based chromium-free tanning agent for sustainable and clean leather production,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 268. 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131682.
- [92] R. Sharma and R. Dhamodharan, “Tannic acid crosslinked chitosan-guar gum composite films for packaging application,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 260, no. P1, p. 129317, 2024, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.129317.
- [93] M. Y. Khalid, Z. U. Arif, R. Noroozi, M. Hossain, S. Ramakrishna, and R. Umer, “3D/4D printing of cellulose nanocrystals-based biomaterials: Additives for sustainable applications,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 251. 2023, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126287.
- [94] C. Alvarez-Lorenzo, A. Goyanes, and A. Concheiro, “Cyclodextrins in 3D/4D printing for biomedical applications,” *Additive Manufacturing*, vol. 84. 2024, doi: 10.1016/j.addma.2024.104120.

- [95] A. Mahmood, T. Akram, C. Shenggui, and H. Chen, “Revolutionizing manufacturing: A review of 4D printing materials, stimuli, and cutting-edge applications,” *Composites Part B: Engineering*, vol. 266. 2023, doi: 10.1016/j.compositesb.2023.110952.

