

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA
MESTRADO PROFISSIONAL**

ANDREA ROSSETTO DA LUZ

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE BIOIMPRESSORA 3D E HIDROGEL DE
ALGINATO/GELATINA PARA PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS 3D**

CURITIBA

2021

ANDREA ROSSETTO DA LUZ

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE BIOIMPRESSORA 3D E HIDROGEL DE
ALGINATO/GELATINA PARA PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS 3D**

**Development And Validation Of 3D Bio Printer And Alginate / Gelatin Hydrogel
For 3D Scaffold Production**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Como requisito para obtenção do título “Mestre em Ciências” – Area de Concentração Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Dr. João Antônio Palma Setti

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto

CURITIBA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite o download e o compartilhamento da obra desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-la ou utilizá-la para fins comerciais.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Ponta Grossa



ANDREA ROSSETTO DA LUZ

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE BIOIMPRESSORA 3D E HIDROGEL DE
ALGINATO/GELATINA PARA PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS 3D**

Trabalho de pesquisa de Mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Biomédica.

Data de aprovação: 08 de dezembro de 2021.

Prof. Joao Antonio Palma Setti, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Profa. Roberta Targa Stramandinoli, Doutorado - Complexo Hospitalar do Trabalhador
Prof. Sergio Leandro Stebel, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 08/12/2021.

Dedico este trabalho ao Universo!

AGRADECIMENTOS

Desde já ressalvo que não irei atender a todas as pessoas que passaram por mim nesta fase de minha vida, e provavelmente não estarão citadas entre as próximas palavras, mas em algum momento elas fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

Agradeço o coordenador Prof. Dr. Gilson Sato por suas respostas assertivas.

Agradeço o meu orientador Prof. Dr. João Antônio Palma Setti pela grande paciência e entender as coordenadas certas.

Agradeço também aos meus colegas de pesquisa pelo compartilhamento de opiniões e das suas próprias pesquisas que resultaram em informações relevantes para o delineamento desta pesquisa.

Agradeço a minha mãe

Agradeço ao meu pai

Agradeço minha filha Eloiza

Agradeço ao Luiz Rogério;

Agradeço a minha irmã Aline;

Agradeço ao meu irmão Gustavo;

Agradeço não porque foi perfeito, mas foi do jeito que Deus permitiu!

Só podemos alcançar o impossível,
Se acreditarmos que é possível!
(Lewis Carroll, 1865)

RESUMO

O elevado custo das bioimpressoras, gera oportunidades de pesquisas e de projetos de adaptação de impressoras 3D para aplicação em biomateriais. Neste trabalho, investigou-se o potencial de uso de uma impressora 3D, de baixo custo, customizada com adaptação para seringas comerciais descartáveis, que permitiu a deposição controlada de hidrogel personalizado. Além disso, foi proposto um protocolo de utilização da bioimpressora para produção de scaffolds de hidrogel. Para tanto, foi necessária uma adaptação de uma impressora 3D de extrusão por filamento de baixo custo para impressão com embolo, foi adaptada uma impressora Graber I3 , após a adaptação, foi possível simular e avaliar a bioimpressão 3D com a formulação de hidrogel composto por alginato/gelatina. As conclusões foram que o sistema de movimentação x, y, z da impressora estavam com incertezas dentro dos padrões adequados, a velocidade de impressão ideal foi de 5 mm/s e o multiplicador de extrusão de 0,10mm³ com refrigeração 100% e mesa fria. Em relação ao hidrogel, o melhor resultado foi para uma formulação de 1,8% de alginato de sódio com 3% de gelatina. O protocolo para utilização da bioimpressora 3D com o hidrogel de Alginato/gelatina foi avaliado e validado com base nos parâmetros de qualidade.

Palavras-chave: Bioimpressão. Impressão 3D. Hidrogel. Baixo custo. Alginato/gelatina.

ABSTRACT

The high cost of bioprinters creates opportunities for research and projects to adapt 3D printers for application in biomaterials. In this work, we investigated the potential of using a low-cost 3D printer, customized with adaptation for commercial disposable syringes, which allowed for the controlled deposition of a customized hydrogel. Furthermore, a protocol for using the bioprinter for the production of hydrogel scaffolds was proposed. Therefore, it was necessary to adapt a low-cost 3D filament extrusion printer for printing with a plunger, a Graber I3 printer was adapted, after the adaptation, it was possible to simulate and evaluate the 3D bioprinting with the hydrogel formulation composed of alginate /gelatin. The conclusions were that the printer's x, y, z movement system had uncertainties within the adequate standards, the ideal print speed was 5 mm/s and the extrusion multiplier was 0.10 mm³ with 100% cooling and a cold table. In relation to the hydrogel, the best result was for a formulation of 1.8% sodium alginate with 3% gelatin. The protocol for using the 3D bioprinter with the Alginate/gelatin hydrogel was evaluated and validated based on quality parameters

Keywords: Bioprinting. 3D printing. Hydrogel. Low cost. Alginate/gelatin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Nuvem de palavras da base Scopus..... | 17 |
| Figura 2 - Nuvem de palavras da base Web of Science | 18 |
| Figura 3 – Etapas do processo de AM | 25 |
| Figura 4 - Obtenção de modelo geométrico 3D..... | 26 |
| Figura 5 - Relógio Comparador | 33 |
| Figura 6 - Relógio comparador posicionado no eixo x. | 33 |
| Figura 7 - Relógio Comparador no eixo z..... | 34 |
| Figura 8 - Relógio comparador no eixo y. | 34 |
| Figura 9 - Exemplo de gel livre de bolhas | 35 |
| Figura 10 - Bioimpressora 3D (A): vista lateral direita (a) fonte de alimentação (b)interruptores; (B) vista lateral esquerda: (i)caixa de controle; (C) vista frontal: (c) painel de controle, (d)mesa,(e) eixo y, (f)cabeçote,(g) eixo z, (h) eixo x. | 37 |
| Figura 11 – (A) cabeçote de impressão com o suporte das seringas aberto: a)motores,b)guias lineares, c)rosca d) suportes, e) imãs f)carrinho. (B) cabeçote com suporte das seringas fechado: a)seringas, b)suporte de fixação, c) bicos extrusores | 39 |
| Figura 12 - Tela principal do programa indicando com setas numeradas. Seta 1: local para importar e ou remover os objetos a serem impressos. Seta 2: opção editar processos, Seta 3: o ícone/engrenagem do lado direito da tela para acesso ao painel de controle da máquina e seta 4 opção para preparar para imprimir. | 41 |
| Figura 13 - Painel de controle aberto na aba controle de movimento. a)eixo x e y, b)eixo z, c)retrair (movimento do carrinho do cabeçote),d)posição atual dos eixos x,y,z, e) botão de emergência. | 42 |
| Figura 14 – Janela de Configurações FFF | 44 |
| Figura 15 - Configurações da aba Velocidades..... | 46 |
| Figura 16 - Configurações da aba camada | 47 |
| Figura 17 - Configurações da aba Adições | 48 |
| Figura 18 - Configurações da aba Preenchimento | 49 |
| Figura 19 - Configurações da aba suporte | 50 |
| Figura 20 - Configurações da aba Temperatura..... | 51 |
| Figura 21 - Configurações da aba Refrigeração..... | 52 |
| Figura 22 - Configurações da aba G-Code | 53 |
| Figura 23 - Configurações da aba Script..... | 54 |
| Figura 24 - Configurações da aba Outros | 55 |
| Figura 25 - Configuração da aba avançado | 56 |
| Figura 26 - Configurações em preparar para imprimir..... | 57 |
| Figura 27 – Impressão rectilinear de hydrogel de alginato/gelatina | 59 |
| Figura 28 - Impressão Hobneycomb com velocidade 5mm/s..... | 59 |
| Figura 29 - impressão wiggle com velocidade 5mm/s | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Palavras-chave do autor | 17 |
| Tabela 2 – Autores, periódicos e citações..... | 18 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL | 14 |
| 1.1.1 Objetivos específicos: | 14 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 15 |
| 2.1 PROTOCOLO GERAL DA REVISÃO SISTEMÁTICA | 15 |
| 2.1.1 Formulação da questão chave..... | 15 |
| 2.1.2 Desenho do estudo:..... | 15 |
| 2.1.3 Resultados Esperados:..... | 15 |
| 2.1.4 Forma de publicação: | 15 |
| 2.1.5 Coleta de dados..... | 16 |
| 2.2 REVISÃO SISTEMÁTICA | 19 |
| 2.3 MANUFATURA ADITIVA POR EXTRUSÃO | 24 |
| 2.3.1 Etapas de planejamento dos processos de Manufatura Aditiva (MA)..... | 25 |
| 2.3.2 Tecnologias de baixo custo baseados na extrusão de material..... | 26 |
| 2.4 SCAFFOLDS | 27 |
| 2.5 HIDROGEIS BASEADOS EM BIOPOLÍMEROS | 28 |
| 2.5.1 GELATINA | 29 |
| 2.5.2 ALGINATO..... | 29 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 3.1 ADAPTAÇÃO DA IMPRESSORA 3D PARA BIOIMPRESSORA..... | 31 |
| 3.2 PROTOCOLO DE IMPRESSÃO | 32 |
| 3.3 AVALIAÇÃO METROLÓGICA; | 32 |
| 3.4 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS DE DEPOSIÇÃO DE MATERIAL PARA SIMULAÇÃO DE BIOIMPRESSÃO..... | 35 |
| 3.5 SELEÇÃO DO HIDROGEL | 35 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 4.1 PRINCIPAIS PEÇAS/COMPONENTES DA BIOIMPRESSORA..... | 36 |
| 4.2 VALIDAÇÃO METROLÓGICA DOS EIXOS X, Y, E Z | 39 |
| 4.3 PROPOSTA DE PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO DA IMPRESSORA 3D | 39 |
| 4.3.1 Recomendações iniciais | 40 |
| 4.3.2 Conhecendo a tela principal dos comandos operacionais da máquina | 40 |
| 4.3.2.1 Painel de controle da máquina..... | 41 |
| 4.3.2.2 Editar processo | 43 |
| 4.3.2.3 Preparar para imprimir | 56 |
| 4.3.3 Processo básico de impressão 3D na bioimpressora | 57 |
| 4.4 SIMULAÇÃO DE BIOIMPRESSÃO COM HIDROGEL ALGINATO/GELATINA..... | 58 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 60 |
| REFERÊNCIAS..... | 61 |

1 INTRODUÇÃO

A impressão 3D progrediu significativamente na última década e se tornou uma abordagem de biofabricação potencialmente poderosa para impressão de tecidos e órgãos. A bioimpressão tridimensional 3D é um campo emergente com um potencial significativo para criar construções vivas personalizadas e específicas do paciente usando imagens médicas e material biológico personalizado. A bioimpressão é uma tecnologia de expansão rápida com a capacidade de fabricar tecidos tridimensionais (3D) *in vitro*, camada por camada. (JI, S. et al. 2020).

Conforme a FIOCRUZ (2018), em até 20 anos as tecnologias 3D/4D *bioprinting* certamente propiciarão:

- produção sob demanda de órgãos e tecidos paciente específicos totalmente funcionais para serem implantados em humanos;
- reparação de lesões *in situ* utilizando as próprias células dos pacientes;
- modelos de testes de drogas/ medicamentos que atendam requerimentos de testes de toxicidade;
- modelos de doenças humanas que atendam requerimentos de pesquisa;
- superação de desafios científicos e tecnológicos, como: desenvolvimento de biotintas, bioimpressoras e *scaffolds* de alta performance; vascularização de tecidos e órgãos bioimpressos e escalabilidade de modelos bioimpressos de baixo custo para pesquisa pré-clínica e laboratorial.

Infelizmente, os altos custos associados às bioimpressoras disponíveis no mercado limitam severamente o acesso à tecnologia, inviabilizando experimentos de prova de conceito ou fins educacionais (HONIBALL et al., 2021; KRIEGE et al., 2021).

As bioimpressoras 3D disponíveis comercialmente custam na faixa de \$4.000 a > \$ 200.000 dólares e são normalmente concebidas em código fechado difíceis de modificar. Devido ao alto custo, poucos grupos de pesquisa têm tido acesso a essa tecnologia (HONIBALL et al., 2021). As bioimpressoras de baixo custo são normalmente baseadas em impressoras 3D FDM (*Fused Deposition Modeling*) Rep-Rap (KRIEGE et al, 2021), o que reduz significativamente o seu custo, tal como mostrado por Reid, J. A. et al., (2019) que relataram a necessidade de desenvolver

modelos *in vitro* 3D para investigar o controle microambiental das células cancerosas utilizando uma bioimpressora 3D de código aberto e acessível com uso de gel de colágeno I. A bioimpressora foi usada para padronizar modelos de ensaios de cultura de células epiteliais 3D.

O elevado custo das bioimpressoras gera oportunidade de pesquisa e de projetos de adaptação de impressoras 3D para aplicação em biomateriais. Por outro lado, além dos projetos e máquinas outra lacuna em pesquisas é a necessidade de se ter um protocolo padronizado a ser seguido nas bioimpressoras de baixo custo, pois a maioria dos trabalhos não considera um protocolo para o usuário.

Neste trabalho, investigou-se o potencial de uso de uma impressora 3D de baixo custo customizada com adaptação para seringas comerciais descartáveis, que permitiu a deposição controlada de hidrogel personalizado. Além disso, foi proposto um protocolo de utilização da bioimpressora de baixo custo, visando o seu uso para bioimpressão com biomateriais de forma a contribuir com pesquisas em manufatura aditiva, podendo trazer contribuições e inovação na área biomédica.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar uma bioimpressora 3d e hidrogel de alginato/gelatina para produção de scaffolds 3d.

1.1.1 *Objetivos específicos:*

- Avaliar as variáveis metrológicas da bioimpressora 3D;
- Definir as variáveis de processamento, velocidade de deslocamento e multiplicador de extrusão ideal para a deposição do hidrogel de Alginato/gelatina;
- Elaborar proposta de protocolo de utilização da bioimpressora 3D com hidrogel de Alginato/gelatina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo foi dividido em 5 partes. A primeira parte abordará o protocolo geral da revisão sistemática, depois segue-se com a revisão sistemática propriamente dita. O subitem 2.3 é uma revisão narrativa acerca da manufatura aditiva e o subitem 2.4 é uma revisão narrativa a cerca de *scaffolds* e a última parte uma explanação a respeito do hidrogel de alginato-gelatina.

2.1 PROTOCOLO GERAL DA REVISÃO SISTEMÁTICA

Aqui foram relatados os passos seguidos para a tomada de decisões com relação aos artigos utilizados na revisão sistemática.

2.1.1 *Formulação da questão chave*

Qual é o estado da arte sobre o uso de bioimpressoras 3D de baixo custo adaptadas para uso de gel?

2.1.2 *Desenho do estudo:*

Foram indicados artigos originais língua inglesa nos anos de 2019 à 2021. A preferência foi para estudos com revisões sistemáticas.

2.1.3 *Resultados Esperados:*

Relatar artigos com resultados de trabalhos que descreveram o desenvolvimento de bioimpressoras para imprimir gel e trabalhos de biomateriais com foco na bioimpressão.

2.1.4 *Forma de publicação:*

Foram incluídos artigos originais em inglês.

Estudos do mesmo autor e assunto foram considerados o mais recente e que apresentou maior quantidade de resultados de citações.

2.1.5 Coleta de dados

Uma revisão bibliométrica e sistemática foi realizada com a utilização das seguintes palavras-chave: *Bioprinting*, *low cost*, e *gel*.

As bases científicas consultadas foram a *Web of Science* e a *Scopus* na data de 10 de julho de 2021.

Os termos escolhidos foram combinados com os operadores booleanos.

A estratégia de organização dos termos na base *Scopus* foi definida da seguinte forma:

```
( TITLE-ABS-KEY ( bioprint* ) AND TITLE-ABS-KEY ( "low cost" ) AND TITLE-ABS-KEY ( *gel ) ) AND PUBYEAR > 2019 AND ( LIMIT-TO ( DOCTYPE , "ar" ) )
```

Por esta busca obteve-se o resultado de 22 artigos originais no total.

A estratégia de organização dos termos na base *Web of Science* foi idêntica ao da base *Scopus* e retornou 14 resultados. O algoritmo ficou da seguinte forma:

```
TÓPICO: (bioprint*) AND TÓPICO: ("low cost") AND TÓPICO: (*gel) AND TIPOS DE DOCUMENTO: (Article). Tempo estipulado: 2019-2021.
```

No total foram obtidos 36 resultados, destes foram excluídos os resultados duplicados, resultando em 23 artigos originais. Destes, nenhum artigo apresentou revisão da literatura com revisão sistemática.

Dos 23 artigos, após leitura do título e resumo, foram selecionados 18 artigos, os quais preencheram o protocolo geral de revisão sistemática deste esforço. O motivo para exclusão de alguns artigos foi por não possuírem foco em bioimpressão.

Com os artigos selecionados para a bibliometria e revisão sistemática pode-se selecionar as 10 palavras-chave dos autores dos artigos mais relevantes para o tema, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Palavras-chave dos autores dos artigos

| | Palavras chave do autor | Artigos |
|----|-------------------------------|---------|
| 1 | <i>Bioprinting</i> | 10 |
| 2 | <i>Hydrogel</i> | 4 |
| 3 | <i>3D Printing</i> | 3 |
| 4 | <i>Additive manufacturing</i> | 3 |
| 5 | <i>Alginate</i> | 2 |
| 6 | <i>3D bioprinting</i> | 2 |
| 7 | <i>Cellulose</i> | 2 |
| 8 | <i>Engineering</i> | 2 |
| 9 | <i>Extrusion printing</i> | 2 |
| 10 | <i>Gelatin</i> | 2 |
| | <i>Methacryloyl(Gelma)</i> | |

Fonte: Autoria Própria, 2021

Uma nuvem de palavras formou-se com as palavras-chave dos artigos da base Scopus (Fig.1) e outra nuvem para base *Web of Science* (Fig.2).

Na base Scopus o termo mais relevante foi *bioprinting*, seguido do termo *hydrogel*. Já na base *Web of Science* o termo em maior evidência foi o *Tissue*.

Figura 1 - Nuvem de palavras da base Scopus



Fonte: Autoria propria,2021

2.2 REVISÃO SISTEMÁTICA

A adaptação de impressoras 3D de extrusão por filamento para uso em bioimpressão 3D tem mostrado a cada ano ser viável para uso em testes de conceitos no ambiente acadêmico e de empresas. Alguns autores focam os estudos em melhorar tanto os equipamentos como testar a viabilidade de novos biomateriais em especial o uso de hidrogéis. Com a utilização das impressoras 3D como bioimpressoras, se obteve sucesso em vários estudos, para diferentes tipos de células. Os conceitos fundamentais por trás da bioimpressão são proporcionais aos da impressão 3D mais comum: o material é adicionado à impressão em camadas progressivas para formar objetos 3D (YENILMEZ et al., 2019).

Para Rajab et al. (2021) a impressão tridimensional é uma das formas avançadas de construção que podem melhorar a qualidade da fabricação em comparação com os métodos tradicionais. A impressão 3D é uma técnica camada por camada que pode ser aplicada juntamente com fármacos, células e moléculas bioativas para fabricar as estruturas impressas em 3D com propriedades biológicas promovidas, que simulam tecidos vivos. Fazer órgãos específicos do paciente, custo-efetividade e a capacidade de ajustar propriedades estruturais e mecânicas são algumas das grandes vantagens da bioimpressão. No entanto, essa abordagem enfrentou diferentes desafios relacionados a biotintas, impressoras 3D, desempenho *in vitro* e clínico e futuro industrial.

Para Huber et al. (2020), a bioimpressão como uma subseção da impressão 3D tem contribuído muito para o desenvolvimento de materiais naturais para impressão 3D e a utilização de biopolímeros, principalmente na forma de hidrogéis. Uma vez que a principal aplicação da bioimpressão tem sido na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa. A maioria das bioimpressoras se baseia na extrusão, que significa que o material de impressão precisa passar por uma mudança de fase de líquido para sólido durante o processo de impressão. Na bioimpressão, isso geralmente envolve um processo de gelificação de uma solução.

Para Reid, et al. (2019), ao utilizar bioimpressoras, a experimentação se torna mais robusta e de alto rendimento. Por outro lado, se requer maior padronização das técnicas de cultura epitelial 3D. Os autores descreveram uma plataforma de bioimpressão de baixo custo projetada para ser acessível a laboratórios de biologia celular básica relatando que o uso deste sistema para o estudo da tumorigênese e

redirecionamento microambiental de células de câncer de mama. Assim, demonstraram que com a bioimpressora foi possível verificar um aumento significativo na formação de tumoróide em géis de colágeno 3D e permitiu geração de matrizes tumoróides .

Os polímeros mais usados na impressão 3D são o ácido polilático (PLA), acrilonitrila butadieno estireno (ABS) e náilon. Porém, a cada ano um número crescente de novos materiais são disponibilizados para uso em impressoras 3D, principalmente materiais baseados em polímeros naturais, impulsionados pela necessidade de práticas mais sustentáveis (HUBER et al., 2020).

Baruffaldi et al. (2021), projetaram e otimizaram três formulações para impressão 3D à base de Carbopol testando a capacidade de impressão deste e sua biocompatibilidade com células epiteliais de câncer de pulmão (A549) e células de fibroblasto pulmonar normal (MRC-5). No estudo, a impressão 3D representou uma oportunidade de obter dispositivos, com estruturas ajustáveis complexas, que imitam a organização do tecido. O estudo concluiu que os avanços da impressão 3D e das biotintas ainda não são suficientes para garantir a coexistência de uma fidelidade de impressão constante aliada à possibilidade de misturar células na tinta.

Rajab et al. (2021) fizeram uma revisão teórica de diferentes métodos para a bioimpressão de biotintas baseados em GelMA, um hidrogel sintetizado pela reação entre gelatina e anidrido de metacrilato (MA). Dentre os métodos para a elaboração do GelMA, o principal foi aquele obtido pela reação entre gelatina e o MA em soro fisiológico tamponado com fosfato. Citaram o potencial uso de GelMA para regeneração cardiovascular, regeneração muscular esquelética, impressões tridimensionais para cicatrização de feridas e regeneração da pele, e ainda estudos para cartilagem.

Xie et al. (2019) mostraram um método de bioimpressão eletro-assistida, utilizando a atração eletrostática no qual micro gotículas de GelMa (uniformes medindo cerca de 100 μm) foram impressas variando parâmetros de impressão (tensões, tamanho do bico, etc.) e medindo seus efeitos. Os autores mostraram que as microesferas impressas podem fornecer um microambiente adequado para células-tronco da medula óssea, possuindo assim um grande potencial de uso em terapia celular, administração de drogas e construção organóide.

Mueller et al. (2020) desenvolveram uma abordagem de bioimpressão de baixo custo com base em uma impressora de extrusão comercial acessível, esta foi otimizada para a utilização de uma biotinta funcionalizado com DNA. Tal biotinta foi

obtida por uma mistura de gelatina, alginato e agarose, que foi ajustada para ser impressa a 42 °C e solidificar a temperatura ambiente em segundos. Assim, conseguiram estruturas com 20 camadas de impressão que atingem uma altura de 10 mm e permanecem estáveis em forma por pelo menos 10 meses quando seladas dentro de um pequeno recipiente de vidro ou plástico. Observaram que o encolhimento das estruturas de gel devido à secagem ocorreu somente durante as primeiras 24 horas após a impressão.

Robinson et al. (2020), utilizando goma de gel metacrilada (GGMA) e quitosana, desenvolveram uma bioimpressora 3D portátil de baixo custo e um mecanismo de extrusão personalizado para introdução controlada dos materiais através de um bico microfluídico impresso em 3D.

Magalhães et al. (2020) relatam o uso de um sistema estereolitográfico simples e rápido utilizando o diacrilato de polietilenoglicol (PEGDA) e hidrogéis de gelatina metacrilato (GelMA). Assim, conseguiram estruturas impressas tridimensionais e vascularizadas com mais de 5 camadas e resoluções entre 42 e 83 µm.

Honiball et al. (2021) fizeram a descrição de um protocolo de adaptação de uma impressora 3D de extrusão para uso de pasta. Os autores realizaram a impressão tridimensional (3D) de hidrogéis de alginato de sódio carregados de células com o método FRESH (*Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels*) que traduzindo é a impressão de incorporação reversível de forma livre de hidrogéis suspensos. Tal método tem a capacidade de incorporar biomateriais macios em um banho de suporte termorreversível em tamanhos que variam de alguns milímetros a centímetros (MIRDAMADI et al., 2020).

Os hidrogéis são estruturas poliméricas reticuladas que incham em solução aquosa e são componentes essenciais para produzir *scaffolds* de engenharia de tecidos. Os hidrogéis quando combinados com células são conhecidos como biotinta. Os hidrogéis são caracterizados por facilitar o transporte de oxigênio, nutrientes e resíduos. Além disso, muitos hidrogéis podem ser facilmente modificados para incluir ligantes de adesão celular e para aumentar a viscoelasticidade e degradabilidade (VIEIRA et al. 2021).

Os hidrogéis são biocompatíveis e exibem baixa citotoxicidade. Além disso, seu alto teor de água lhes permite adquirir uma estrutura semelhante a matriz extracelular (ECM), no entanto, a aplicação desses hidrogéis para a biofabricação de

estruturas com dimensões clinicamente relevantes pode ser um desafio por causa de problemas na manutenção do formato impresso (VIEIRA et al., 2021).

Uma variedade de biotintas baseados em hidrogel foram desenvolvidos de polímeros sintéticos (como Pluronic e poli (etilenoglicol)), ou naturais (gelatina, ácido hialurônico, alginato, quitosana, colágeno, fibrina e seda), polímeros / macrômeros ou materiais de tecido descelularizado (por exemplo, coração, osso, fígado, pâncreas, etc.) (JI,S et al., 2020).

Vieira et al. (2021), desenvolveram um hidrogel quitosana-ácido hialurônico misturando uma solução de quitosana neutralizada com diferentes soluções e com diferentes concentrações de ácido hialurônico. Os hidrogéis demonstraram potencial para as aplicações em bioimpressão, entretanto sem mostrar na prática a bioimpressão utilizando os hidrogéis .

Mirdamadi et al., (2020) relataram uma prova de conceito com biompressão 3D para mostrar a impressão de órgãos. O método FRESH foi utilizado para construir um modelo (*phantom*) em tamanho real do coração humano adulto utilizando um hidrogel formado por alginato e gelatina.

Huber et al., (2020), desenvolveram um gel de nanocelulose com hidróxido de sódio e ureia, para uma impressão 3D baseada em extrusão, com o objetivo de demonstrarem que com a impressão 3D já é possível obter peças mais complexas. Depois de analisar o comportamento do gel de nanocelulose por reometria, um projeto de experimentos foi aplicado para otimizar as configurações da bioimpressora 3D para imprimir o gel baseado em nanocelulose. As configurações de impressão ideais foram então usadas para imprimir um formato de orelha humana, sem a necessidade de material de suporte (HUBER et al., 2020).

Ji et al., (2020) apresentaram duas formulações com uso de celulose modificada com norborneno, ambas as formulações de biotinta apresentam a propriedade de autogelação na ausência de luz ultravioleta. Utilizaram também células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), fibroblastos NIH 3T3 e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) obtiveram sucesso na bioimpressão. A bioimpressora utilizada neste estudo, foi uma Allevi 2. As formulações de biotinta foram imediatamente transferidas para uma seringa de 10 mL, e a seringa foi montada na impressora. Para testar a capacidade de impressão, a biotinta foi usado para imprimir um *scaffold* de 2 camadas em forma de grade de 15 mm e 15 mm em uma lâmina de vidro (JI et al., 2020).

Yenilmez et al., (2019) desenvolveram e implementaram uma bioimpressora híbrida de baixo custo usando cabeçotes de impressão a jato de tinta e de extrusão, utilizaram para imprimir metacrilóil gelatina (GelMa) e alginato. O projeto mecânico foi adaptado de uma CNC de três eixos no qual desenvolveram um cabeçote próprio. Assim, realizaram testes com a variante velocidade, imprimindo uma linha de 5 cm testaram de 1mm/s até 7 mm/s. Chegaram a conclusão que quanto menor a velocidade maior é o acúmulo de material, causando ondulações na bioimpressão e quando a velocidade aumenta, a forma do canal obtém a forma reta desejada e seu diâmetro diminui ligeiramente. Em conclusão, escolheram a velocidade de 6mm/s como sendo a ideal para impressão de alginato.

Ioannidis et.al., (2020); Kahl et. al, (2019), descreveram modificações de impressoras 3D para bioimpressoras que chamaram de ultrabaixo custo e ambos também utilizaram alginato e gelatina para comprovar a bioimpressão com hidrogel. A bioimpressão tridimensional (3D) é um novo campo de pesquisa interdisciplinar, que utiliza engenharia da computação, ciência dos materiais, robótica e engenharia biomédica, a fim de fornecer novas aplicações em ciências da vida por meio da engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

Outros estudos interessantes foram Honiball et al.,(2021) e Yenilmez et al.,(2019) descrevem uma adaptação de uma impressora 3D de baixo custo para bioimpressora 3D.

Krige et al., (2021), apresentaram uma modificação de bioimpressão de baixo custo que manteve as capacidades originais da impressora 3D incluindo as instruções de operação da bioimpressora. A modificação foi relativa a utilização de peças impressas em 3D e foi baseada na popular impressora 3D Prusa i3 de código aberto. As modificações foram mantidas o mais simples possível e utilizam *software* de fatiamento padrão, permitindo a instalação por construtores menos experientes. Usaram seringas descartáveis e peças facilmente esterilizáveis. A bioimpressora também permitiu a impressão de 2 componentes, bem como a cura por ultravioleta. As capacidades de bioimpressão e cura foram mostradas imprimindo e curando um biofilme artificial de uma bactéria eletroativa, a *Geobacter sulfurreducens*. Para a avaliação da bioimpressora utilizaram um hidrogel biocompatível à base de 2% de ácido hialurônico.

Para Attalla et al. (2019), um dos principais focos nos últimos anos na engenharia de tecidos tem sido a fabricação e integração de estruturas vasculares em

construções de tecido artificial. Porém, na maioria das metodologias nesse tipo de abordagem não foi possível a criação de condúites concêntricos de várias camadas dentro de matrizes extracelulares naturais (ECMs) e géis que reproduzem com maior fidelidade a arquitetura hierárquica dos vasos sanguíneos biológicos. Para resolver este problema, os autores apresentaram um novo *design* de bico microfluídico capaz de extrusão multiaxial para impressão 3D e estruturas de tubos ocos de duas e três camadas. Com esta técnica conseguiram aumentar a adesão celular e foram capazes de realizar arquiteturas não apenas em aplicações de tecido vascular, mas também em outros tubos ou estruturas semelhantes a fibras, tais como músculo do esqueleto ou condutos nervosos.

O sucesso da bioimpressão está diretamente relacionada com o controle do processo e dos biomateriais utilizados. Com esta revisão foi possível perceber a variedade de estudos que foram alcançados com o uso de impressoras 3D adaptadas para servirem como bioimpressoras e a variedade de materiais e diferentes tipos de cultivo celulares que elas conseguem atender.

2.3 MANUFATURA ADITIVA POR EXTRUSÃO

A manufatura aditiva, popularmente conhecida no Brasil como Impressão 3D, começou no final dos anos 1980 com máquinas produzidas a um custo elevado e limitadas a utilização exclusiva por profissionais (CANESSA, 2013).

Em 2009, a queda da patente de impressão tridimensional por extrusão ou modelagem por fusão e deposição (FDM) de domínio Stratasys Inc.[®] foi um dos marcos para a disseminação da tecnologia, até que em 2014 houve a queda da patente do método impressão por Sinterização Seletiva a Laser – SLS (UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM, 1989). Unido a isso, a partir do término de vigência das patentes pesquisas na área também começaram a crescer e muitas empresas passaram a realocar seus esforços para o desenvolvimento de novas tecnologias de impressão 3D (PITAGORA e ARAUJO, 2017).

“As tecnologias de impressão 3D também se beneficiam do movimento do código aberto (para software e hardware Arduino) e do compartilhamento gratuito de arquivos digitais pela Internet” (CANESSA, 2013).

Um exemplo são as impressoras RepRap. O termo RepRap é abreviação de *Replicating Rapid-prototyper* (Prototipagem Rápida Replicadora) no qual possibilita que máquinas fabriquem novas máquinas, este é o legado deixado por este projeto *open source*.

2.3.1 Etapas de planejamento dos processos de Manufatura Aditiva (MA)

A primeira etapa do processo de manufatura aditiva é a obtenção do modelo geométrico 3D, que depois passa para planejamento do processo, a fabricação propriamente e se necessário uma etapa de pós-processamento, chegando à etapa de manufatura da peça final. Ainda no planejamento do processo existem subprocessos que são eles, orientação, posicionamento e escala da peça a ser impressa, seguido da verificação acerca da necessidade de base e estruturas de suporte, o fatiamento da peça, e por fim, o planejamento da trajetória ou geometria do contorno (Fig.3) (VOLPATO et al.,2017).

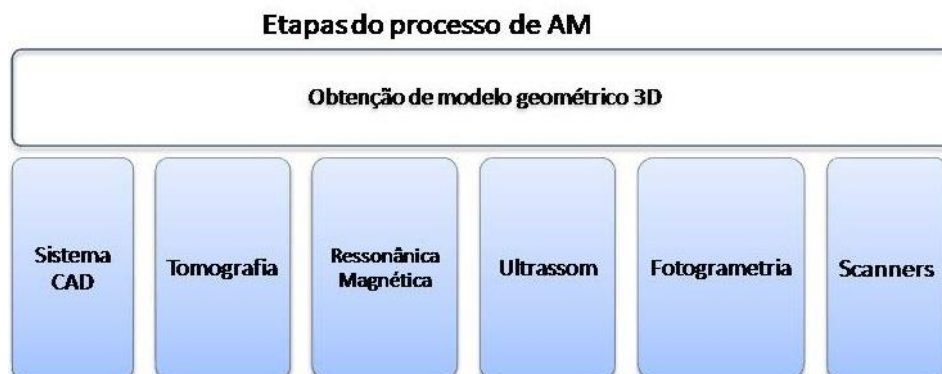
Figura 3 – Etapas do processo de MA



Fonte: Adaptado de Volpato,2017

O modelo geométrico tridimensional pode ser obtido de diversas fontes: “sistemas CAD ou arquivos vindos de tomografias ou ressonâncias magnéticas ou ultrassom, bem como scanners 3D e fotogrametria”, e os arquivos oriundos destas tecnologias são sempre convertidos para o formato *.STL (*STereoLithography*) (Fig.4) (VOLPATO et al.,2017).

Figura 4 - Obtenção de modelo geométrico 3D



Fonte: Autoria própria, 2021

O processo de deposição normalmente é lento, pois o material deve passar por um bico de diâmetro da ordem de décimos de milímetros, assim o tempo necessário para imprimir conforme a área aumente será maior, o que torna seu uso ideal para peças de baixa escala e ou produtos personalizados (VOLPATO et al., 2017).

2.3.2 Tecnologias de baixo custo baseados na extrusão de material

A maioria das tecnologias de baixo custo surgidas recentemente é baseado no princípio de extrusão de material com uso de filamento. Grande parte das adaptações foram possíveis graças a projetos *open source* deixados por instituições de pesquisa. Um deles foi o projeto do *Fab@home*, cuja adaptação possibilitou extrudar vários tipos de materiais em pasta como por exemplo o uso de silicone, chocolate, massa de modelar etc. (VOLPATO et al., 2017).

Atualmente há uma grande variedade de equipamentos que podem ser adquiridos montados ou desmontados em sites na internet com preços acessíveis.

Também hoje é possível desenvolver as próprias adaptações devido ao grande número de compartilhamento de informações em comunidades, fóruns, blogs na internet. Nesses sites é possível compartilhar experiências práticas sobre parâmetros de processo, problemas e soluções encontrados, também é possível a troca de informações a respeito de melhoramento de *hardware* (SANTANA, 2015).

Porém mesmo tendo aumento na disseminação das impressoras 3D baseadas em código aberto, “ainda há muitas dúvidas sobre a qualidade das peças fabricadas nesses equipamentos, há falta de padronização em relação à calibração dos equipamentos” (SANTANA,2015).

Algumas das diferenças entre as máquinas profissionais e os modelos de baixo custo são apontadas por Fonda (2013) apud Santana (2015): máquinas profissionais dispõem de estruturas sólidas em metal; enquanto equipamentos de baixo custo geralmente são constituídos por peças de plástico fabricadas por impressão 3D, ou de madeira cortada a laser, dificilmente por partes de alumínio ou aço; o software utilizado para operar um equipamento profissional é proprietário (código fechado) e os fabricantes podem organizar treinamentos especializados para os operadores. No caso dos equipamentos de baixo custo, os softwares tendem a ser livres e de código aberto, sendo bastante customizáveis, tornando a evolução rápida; utilizando extensivamente hardwares abertos como por exemplo o Arduino.

2.4 SCAFFOLDS

Feito de biomateriais, um *scaffold* na engenharia de tecidos é usado para apoiar e facilitar o crescimento de células / tecidos e o transporte de nutrientes e resíduos, enquanto se degradam gradualmente durante o processo de cicatrização (CHEN,2019).

A engenharia de tecidos com base em *scaffolds* é um campo interdisciplinar que envolve a aplicação dos princípios das ciências biológicas e engenharia para reparar tecidos e órgãos danificados (CHEN,2019).

A construção de *scaffolds*, por necessitar de geometrias complexas, vem se mostrando como uma evolução natural para aplicação e uso da manufatura aditiva. Também é possível com a manufatura aditiva construir diretamente modelos 3D a partir da deposição de camadas. As regras a serem seguidas para o desenvolvimento de *scaffolds* são:” servir como um substrato de adesão para células, facilitando a localização e distribuição das células quando implantadas; promover suporte

mecânico para o crescimento das células, mantendo a sua estrutura original e guiar o desenvolvimento de novos tecidos com sua função definida (NETO,2013).

Para a impressão de *scaffolds* de hidrogel é necessário inicialmente criar um perfil. Neste, são indicados os parâmetros como o tamanho do bico extrusor, a espessura e largura da camada, a velocidade de impressão. Tal perfil é específico para o hidrogel selecionado, sendo individualizado, pois pode, dependendo do hidrogel, haver viscosidades diversas que resultarão em diferentes padrões de impressão. Uma vez criado o perfil, o *software* deve funcionar para diferentes modelos sem alterações adicionais e o usuário pode controlar a taxa de fluxo relativa do gel.

2.5 HIDROGEIS BASEADOS EM BIOPOLÍMEROS

Diversos tipos de hidrogéis baseados em biopolímeros têm sido utilizados como biotintas para a bioimpressão. A maioria dos biopolímeros fornece alta citocompatibilidade, mas fraca resistência. Crucial para todos os tipos de biotintas são as reações de gelificação que não prejudicam as células, mas levam a construções suficientemente estáveis, no qual as células podem ser cultivadas e manipuladas posteriormente.

Hidrogéis são estruturas poliméricas reticuladas inchadas pela água, produzidas pela simples reação de um ou mais monômeros ou por ligações de associação, como ligações de hidrogênio e fortes interações de van der Waals entre as cadeias (RATNER et al.,1996).

Os hidrogéis têm recebido atenção significativa, especialmente nos últimos 30 anos, devido à sua promessa excepcional em aplicações biomédicas, pois exibem propriedades que os tornam candidatos desejáveis para biomateriais biocompatíveis e compatíveis com o sangue (RATNER et al.,1996).

Uma das primeiras aplicações biomédicas de hidrogéis estava em lentes de contato por causa de sua estabilidade mecânica relativamente boa, favorável índice de refração e alta permeabilidade ao oxigênio (RATNER et al.,1996).

Outras aplicações de hidrogéis incluem materiais para tendões artificiais, bioadesivos para cicatrização de feridas, membranas artificiais renais, cartilagem articular, pele artificial, materiais de reconstrução de órgãos maxilofaciais e sexuais e substituição de corda vocal (RATNER et al.,1996).

Hidrogéis, como matrizes sintéticas, possuem aplicações como biomateriais para cultivo celular. Dentre eles, estão os alginatos, GELLMA (methacriloyl de gelatina), PEGDA (diacrilato polietileno glicol). Esses hidrogéis sensíveis à luz e fotocrosslinkáveis têm interesse científico significativo devido às suas grandes vantagens, como biocompatibilidade, hidrofiliação e capacidade de promover várias funções celulares, tornando-os adequados para aplicações biomédicas, engenharia de tecidos e medicina regenerativa, medicamentos e terapias contra o câncer. Esses tipos de hidrogéis não são tóxicos e apresentam fácil hidratação, combinam bem com outros biomateriais e exibem propriedades adesivas.

2.5.1 GELATINA

A gelatina é um hidrocolóide, seu ponto de fusão é na temperatura do corpo. É o gelificante mais conhecido. Utilizada na indústria alimentícia, da saúde e fotográfica. É composta de 86% de proteína, 2% de sais minerais e 12% água; ela ainda contém 18 aminoácidos diferentes, incluindo 7 dos 8 essenciais para a dieta humana e não contém gorduras nem colesterol (FIB,2013)

A gelatina é um biomaterial natural obtido do colágeno desnaturado. O peptídeo único, arginineglicina-aspartato (RGD) da gelatina pode promover a adesão celular e migração celular (KE et al., 2021). Indústrias fornecem gelatinas em diversas faixas de tamanho de partículas que vão desde malhas grossas até pós extremamente finos. A vantagem da gelatina em comparação a outros hidrocolóides, ela não forma grumos facilmente nem requer pré-misturas com outros pós para o seu uso. Simples de aplicar somente requer água ou líquidos quentes para dissolver e não necessita de ajustes de pH (FIB,2013).

2.5.2 ALGINATO

Alginato é um polissacarídeo não ramificado com boa biocompatibilidade e ligações cruzadas facilmente com íons divalentes como cálcio. Os alginatos de sódio são amplamente utilizados na engenharia de tecidos e outros campos biomédicos devido às suas vantagens de fonte abrangente, baixo custo e boa biocompatibilidade e baixa citotoxicidade (JING, Y et al., 2021).

O alginato disponível comercialmente é tipicamente extraído de algas marrons (Phaeophyceae), incluindo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum*, e *Macrocystis pyrifera* por tratamento com soluções alcalinas aquosas, normalmente com hidróxido de sódio. O extrato é filtrado, e cloreto de sódio ou cálcio é adicionado ao filtrado para precipitar alginato. Este sal de alginato pode ser transformado em ácido algínico por tratamento com ácido clorídrico diluído. Após purificação e conversão adicionais, solúvel em água o pó do alginato de sódio é produzido (LEE e MOONEY, 2012).

2.6 HIDROGEL ALGINATO/GELATINA

A utilização de formulações baseadas em polímeros naturais trazem grandes vantagens tais como biocompatibilidade. Entre estes, as formulações à base de alginato (ALG) e gelatina (GEL) estão cada vez mais ganhando popularidade (SOMASEKHARAN, L. et al., 2021).

Alginato é um polissacarídeo não ramificado com boa biocompatibilidade no entanto, as células de mamíferos não podem interagir especificamente com o alginato e, portanto, a modificação da superfície é necessária para permitir adesão celular.

A gelatina é um biomaterial natural obtido do colágeno desnaturado. O peptídeo único, arginineglicina-aspartato (RGD) da gelatina pode promover a adesão celular e migração celular (KE et al., 2021).

Ioannidis et.al., (2020) e Kahl et. al., (2019) utilizaram composições de alginato e gelatina com suas bioimpressoras de baixo custo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ADAPTAÇÃO DA IMPRESSORA 3D PARA BIOIMPRESSORA

A estrutura a qual foi montada a bioimpressora é original de uma impressora 3D modelo Graber i.3.

Os suportes de display, case da fonte, case da placa e a parte superior onde ficam os rolamentos foram projetados e impressos com PLA 1.75mm preto.

A bioimpressora possui uma Placa Maker base MKS GEN 1.0L. Os drivers para os motores são do modelo 8.8.2.5 e possui resolução 1 para 32 passos.

Também possui um *display* LCD, o qual permite até 20 caracteres por coluna e 4 linhas. Fonte de alimentação bivolt 12v 30 amper. Os Motores são do tipo NEMA17 HS4401S.

Para a movimentação dos eixos x e y, são utilizadas correias de 6mm. Para acoplamento dos motores são utilizadas polias GT2 20 6mm

A impressora também conta com guias lineares de 8 mm com rolamentos LM8mm, ou seja, de 8mm. São distribuídos 4 rolamentos para eixo y, e mais dois de cada lado para o eixo z.

O cabeçote está utilizando 4 rolamentos com guia de perfil 8mm em aço inox

O cabeçote é para duas seringas. A seringa de base para o projeto do cabeçote foi a modelo SR com 5ml, ela é menor e mais achatada.

Para facilitar a troca de seringas foram utilizados ímãs de neodímio no total de 8, sendo quatro para cada extrusor.

Para a movimentação do embolo, utilizando seringa, foi desenvolvido na parte do embolo, um carrinho com utilização de guias de 6mm para poder acompanhar o eixo na parte de subida e descida, e na parte da rosca(fuso) foram acoplados entre o eixo do motor sobre o cabeçote para baixo um acoplador e uma barra de $\frac{1}{4}$. Na barra de $\frac{1}{4}$ fica preso o carrinho. Para esta movimentação foi utilizado uma porca rebite.

Para polimerização dos materiais está disponível uma fita de LED ultravioleta em forma de fita de 12V. A impressora também tem resfriamento com cooler radial modelo 5015 12v.

O *Firmware* utilizado para programação foi o *open source* Marlin na versão 1.9.

3.2 PROTOCOLO DE IMPRESSÃO

A metodologia base para o desenvolvimento do protocolo de impressão deste trabalho foi definida de acordo com o trabalho de Volpato et al., (2017) citado no capítulo 2 item 2.3.1.

Para a etapa da obtenção do modelo geométrico 3D foi utilizado o software Tinkercad através da criação de um cubo de 20mm por 20 mm. A partir deste cubo foram aplicados os processos descritos no protocolo de utilização da bioimpressora descritos no item 4.4.

Para o planejamento do processo foi utilizado o software Simplify 3D, novamente seguindo o item 4.4. Mas antes do início dos testes na bioimpressora foi realizada a identificação visual das partes dela e avaliação dos deslocamentos dos eixos conforme os itens mostrados a seguir 3.1 e 3.2. Foram testadas algumas formulações de hidrogel alginato-gelatina para simular uma impressão na bioimpressora 3D de baixo custo.

A etapa de pós-processamento não foi necessário na peça. Entretanto se deve ressaltar a necessidade de limpeza dos êmbolos e outras partes da máquina, onde houve contato com o hidrogel, para que não ocorra entupimento do bico extrusor, para um próximo uso.

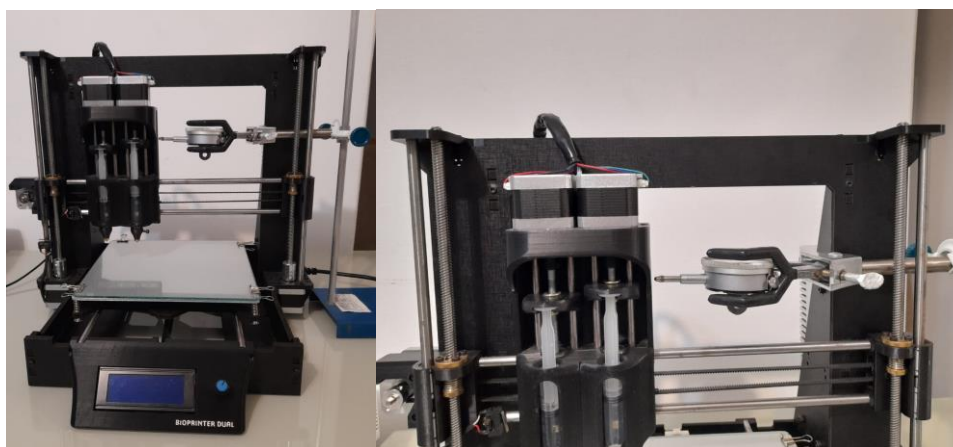
3.3 AVALIAÇÃO METROLÓGICA;

Os deslocamentos dos eixos x, y, z da impressora foram medidos e para a avaliação metrológica do deslocamento dos eixos x, y, z foi utilizado um relógio comparador da marca Mitutoyo que permite medições na resolução de 0,01 a 10 mm (Fig. 5)

Figura 5 - Relógio Comparador

Fonte: Autoria própria,2021

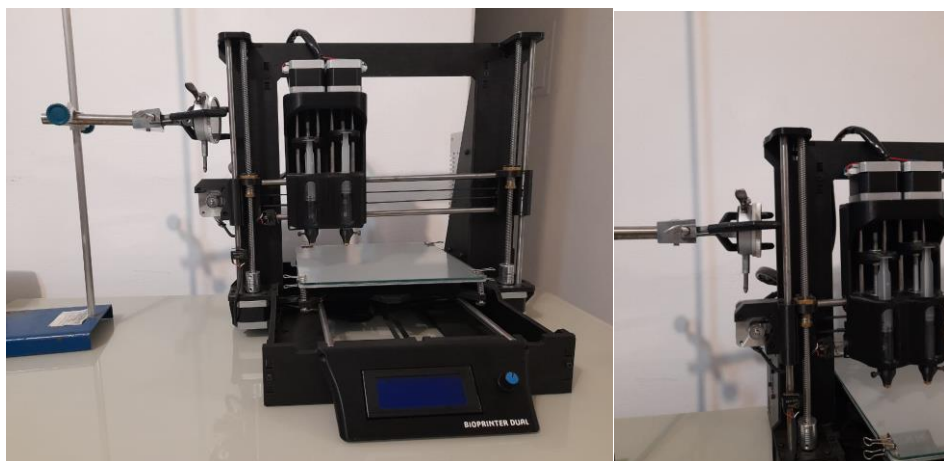
Iniciou-se com a validação metrológica pelo eixo x, um tripé, com uma garra acoplada, segurando o relógio comparador foi posicionado do lado direito da impressora (Fig.6) na posição horizontal ao lado do cabeçote de impressão. Em seguida com o auxílio do programa *Simplify3D* foram executados os comandos para deslocamento do cabeçote (eixo x), no painel de controle da máquina, controle de movimentos. Foram realizadas vinte vezes as medições de 0.1 mm, depois foram medidas mais vinte vezes 1 mm no mesmo eixo e por último 20 vezes a medida de 10 mm.

Figura 6 - Relógio comparador posicionado no eixo x.

Fonte: Autoria própria, 2021

Passou-se então para as medições com o eixo z. O tripé e a garra foram posicionados no lado esquerdo da bioimpressora e o relógio comparador colocado na posição vertical conforme Fig.7 e com auxílio novamente do *software Simplify 3D* foram realizadas vinte medições de 0.1 mm, depois vinte medições de 1mm e por fim as medições de 10mm.

Figura 7 - Relógio Comparador no eixo z.



Fonte: Autoria própria, 2021

O eixo y corresponde a mesa da bioimpressora, para tanto novamente com o auxílio de um tripé e uma garra, o relógio comparador foi posicionado na frente da mesa (Fig.8) Com auxílio do *software simplify3D* foram executados os comandos para deslocamento no eixo y. Foram realizadas 20 medições com 0.1mm, depois mais vinte medições com 1mm e por fim as medições com 10mm.

Figura 8 - Relógio comparador no eixo y.



Fonte: Autoria própria,2021

3.4 DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS DE DEPOSIÇÃO DE MATERIAL PARA SIMULAÇÃO DE BIOIMPRESSÃO

Após a seleção do hidrogel adequado, que está descrito na próxima seção, foi observado que o extrusor depende dos parâmetros definidos em um perfil de processo, nesse contexto foram avaliadas as seguintes variáveis: velocidade, multiplicador de extrusão.

3.5 SELEÇÃO DO HIDROGEL

Foi testado uma mistura de 1,8% alginato de sódio e 3% de gelatina, dissolvidos em água deionizada. A gelatina da marca gelita® possui 280bloom e 30 mesh. O alginato de sódio da marca Êxodo científica®.

Esta mistura foi dissolvida e colocada em banho-maria por mais de 24 h, e após esfriamento em temperatura ambiente atingiu a viscosidade ideal depois de 2 horas ou existe a possibilidade de colocar em refrigeração por 10 minutos ou até atingir a viscosidade desejada.

Entretanto existe algumas características que devem ser seguidas para bioimpressão como a eliminação de bolhas, a viscosidade deve ser baixa, pois a presença de bolhas no gel ou viscosidade elevada causa o travamento do cabeçote de impressão, uma vez que a pressão interna se torna maior que a externa.

Figura 9 - Exemplo de gel livre de bolhas



Fonte: Autoria própria, 2021

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção é apresentado os componentes da bioimpressora em uma visão geral, depois são apresentados os resultados da avaliação das incertezas dos deslocamentos x,y,z , a proposta de protocolo de utilização da bioimpressora. E por último os resultados da simulação de bioimpressão com hidrogel de alginato-gelatina.

4.1 PRINCIPAIS PEÇAS/COMPONENTES DA BIOIMPRESSORA

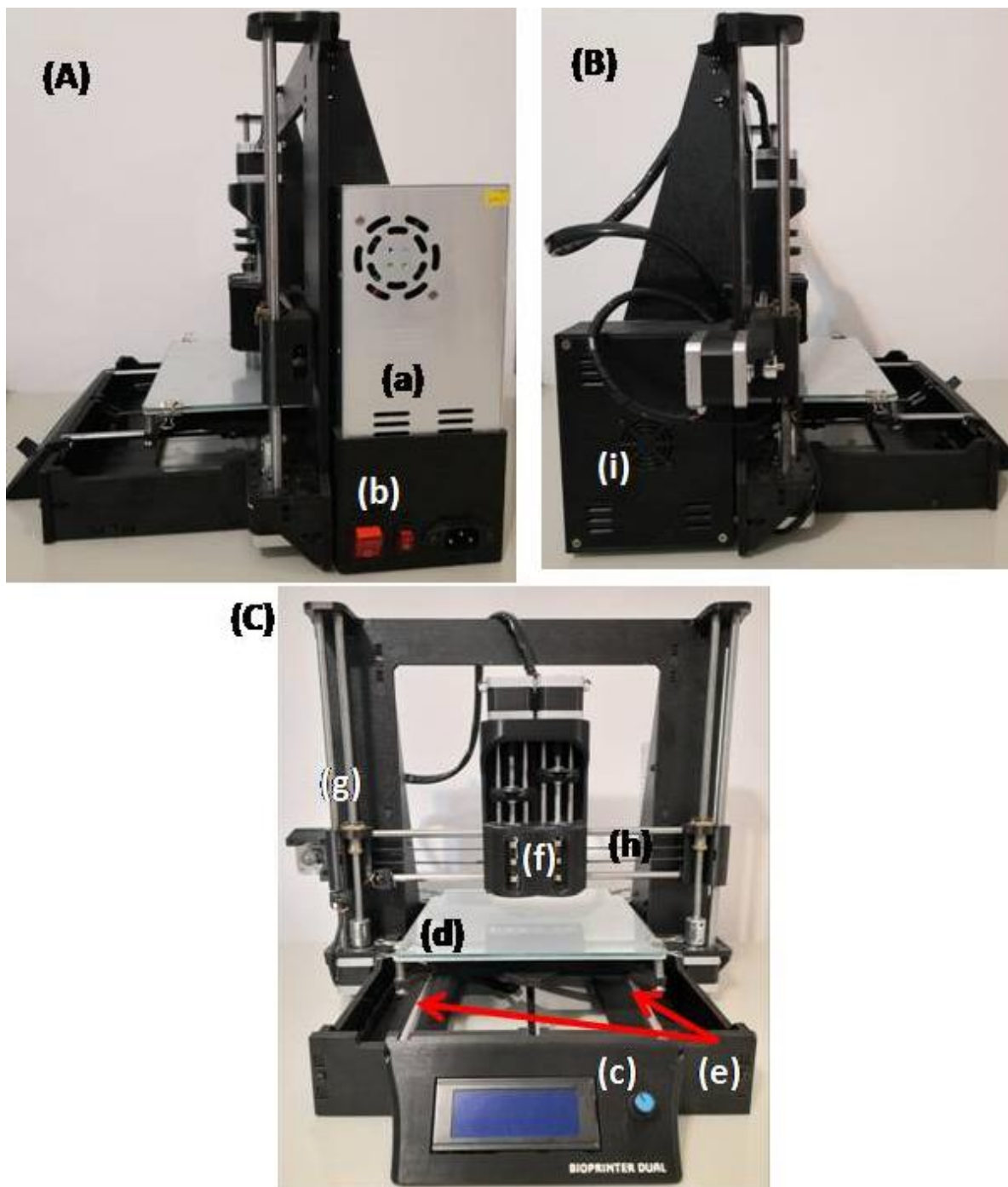
A bioimpressora possui uma estrutura básica de um modelo de impressora 3D *open source* Graber i3. Esta estrutura é em MDF (*Medium Density Fiberboard*) com acabamento preto, e acabamentos impressos por manufatura aditiva com material PLA (poliácido láctico) preto.

A Fig. 10 mostra os principais componentes da impressora, sendo eles:

- a) Fonte de alimentação bivolt (Fig. 10A-a);
- b) Interruptores: o maior para ligar todo o sistema e o menor para ligar os LEDs (Fig. 10A-b);
- c) Painel de controle e controle de seleção para operação manual da máquina (Fig. 10B-c);
- d) Mesa composta de placa metálica (Fig. 10C-d) que pode ser aquecida, e sobre a mesa há uma placa de proteção de vidro e quatro presilhas a fim de segurar o vidro sobre a mesa;
- e) Eixo y (Fig. 10C-e) permite a movimentação da mesa nas direções horizontais (para frente e para atrás, tendo como referência o painel da impressora);
- f) Cabeçote de impressão, os detalhes são mostrados na Fig. 11 e explicados na sequência do texto;
- g) Eixo z (Fig. 10C-g), permite que o cabeçote se movimente na posição vertical (para cima e para baixo, tendo como referência o painel da impressora);
- h) Eixo x (Fig. 10C-h), permite que o cabeçote se movimente na horizontal (esquerda e direita, tendo como referência o painel da impressora);

- i) Caixa de controle (Fig. 10B-i): onde está localizada a placa mãe do sistema.

Figura 10 - Bioimpressora 3D (A): vista lateral direita (a) fonte de alimentação (b)interruptores; (B) vista lateral esquerda: (i)caixa de controle; (C) vista frontal: (c) painel de controle, (d)mesa,(e) eixo y, (f)cabeçote,(g) eixo z, (h) eixo x.



Fonte: Autoria própria,2021

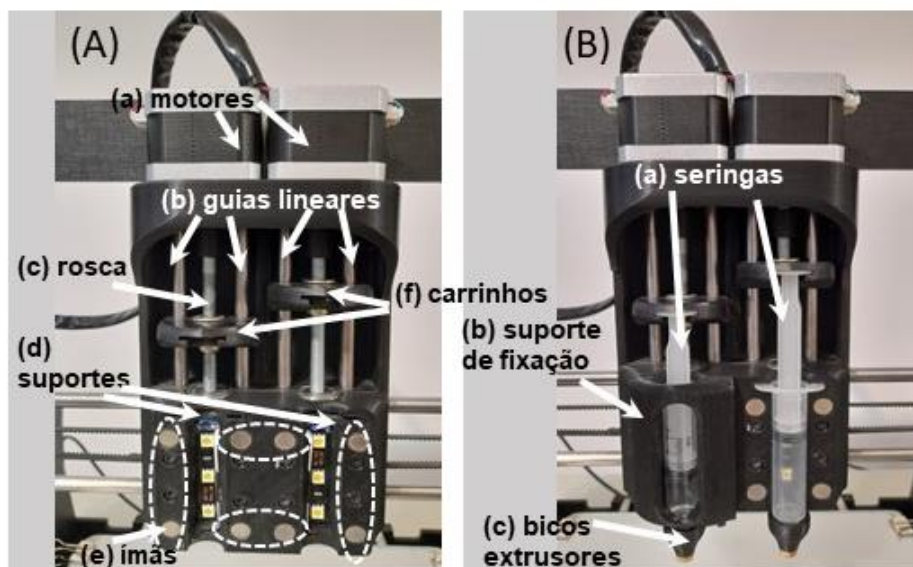
O cabeçote, ver Fig. 10-f e Fig.11, é composto por dois motores (Fig. 11A-a) que permitem que os êmbolos executem seu movimento para realizar a extrusão. Os motores estão localizados na parte superior de uma estrutura fabricada em PLA. Na estrutura também estão localizados os suportes (Fig. 11A-d) para posicionamento das seringas (Fig. 11B-a), este suporte para seringas possui acoplamento na parte da frente por meio magnético (Fig. 11B-b), com encaixe preciso para prender de forma mais rápida a seringa. A seringa é posicionada e por meio de 4 ímãs (Fig. 11A-e) é presa na estrutura do cabeçote (Fig. 11B). Devido o acoplamento com o uso de ímãs as seringas podem ser colocadas e retiradas de forma fácil ao mesmo tempo que se fixam e não há folgas durante a operação de extrusão. No cabeçote também estão localizados os carrinhos (Fig. 11A-f) de movimentação dos êmbolos.

No cabeçote também possui 4 guias lineares (Fig. 11A-b), duas para cada seringa, para garantir a estabilidade do conjunto e também para guiar o movimento da plataforma somente na direção do eixo Z (Fig.11C-g). Além da rosca principal(fuso) (Fig. 11A-c) que movimenta o embolo conforme o tamanho vertical da seringa necessário para extrusão do material.

O posicionamento dos êmbolos depende da localização e posicionamento dos eixos x e z (Fig.11C-g-h). No cabeçote também estão acoplados LEDs brancos e LEDs UV.

Nas seringas ficam posicionados os bicos extrusores e ou outros tipos de ponteiros como os catéters (Fig. 11B-c). O posicionamento da seringa é feito de forma manual, mas com auxílio do *software* Simplify3D, para movimentar os carrinhos até a posição desejada do embolo da seringa, utilizando a opção retrair que se pode ter acesso pelo *software* dentro de **painel de controle da máquina** aba **controle de movimento**. Mais detalhes ver o protocolo de utilização da máquina item 4.4 deste trabalho.

Figura 11 – (A) cabeçote de impressão com o suporte das seringas aberto: a)motores,b)guias lineares, c)rosca d) suportes, e) ímãs f)carrinho. (B) cabeçote com suporte das seringas fechado: a)seringas, b)suporte de fixação, c) bicos extrusores



Fonte: Autoria própria,2021

4.2 VALIDAÇÃO METROLÓGICA DOS EIXOS X, Y, E Z

Para todas as medições nos eixos x, y e z os deslocamentos executados pela bioimpressora corresponderam exatamente aos valores indicados pelo relógio comparador, portanto se pode validar a calibração dos deslocamentos dos eixos x, y e z.

4.3 PROPOSTA DE PROTOCOLO DE UTILIZAÇÃO DA IMPRESSORA 3D

Com base nos itens 3.1 a 3.4 definiu-se o seguinte protocolo da impressora 3D.

O público alvo deste protocolo são os estudantes de cultivo celular e alunos da engenharia biomédica que podem requerer a utilização da bioimpressora para o desenvolvimento de suas atividades acadêmicas.

Nas seções a seguir, são descritos com detalhes os procedimentos para um usuário utilizar a bioimpressora.

4.3.1 *Recomendações iniciais*

A bioimpressora necessita estar conectada a um computador para acesso ao *software Simplify3D* para inserir os parâmetros relacionados ao planejamento do processo.

Antes de ligar a bioimpressora é necessário verificar qual a tensão da rede elétrica e selecionar na fonte de alimentação da bioimpressora a tensão adequada (110V ou 220V), pois a fonte de alimentação é bivolt.

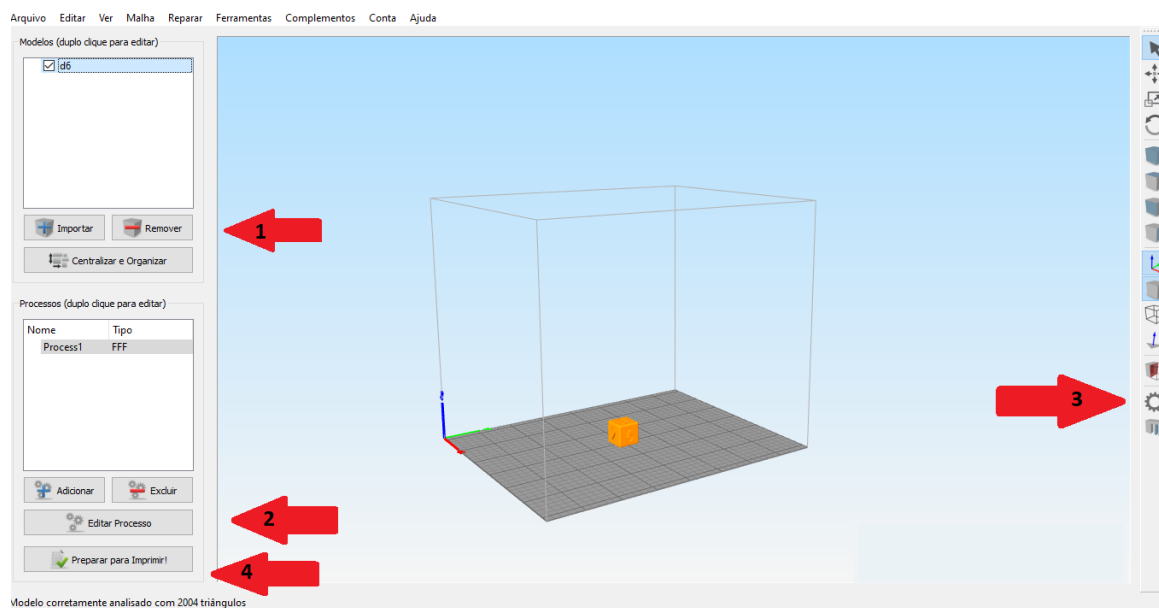
Ainda antes de ligar a bioimpressora é necessário conectar o seu cabo USB ao computador, ligar o computador, e depois ligar o interruptor liga/ desliga (tecla maior) da bioimpressora.

Preparar as seringas com o gel previamente selecionado depois encaixar o cateter ou um bico extrusor, as ponteiros podem ser diferentes para cada impressão.

4.3.2 *Conhecendo a tela principal dos comandos operacionais da máquina*

Na tela principal do programa do lado esquerdo superior é possível importar e remover os objetos a serem impressos (ver Fig. 12, seta 1). Os objetos a serem impressos deverão ser desenhados/planejados previamente em softwares destinados a este fim conforme os tipos de origem já indicados no diagrama da Fig. 4.

Figura 12 - Tela principal do programa indicando com setas numeradas. Seta 1: local para importar e ou remover os objetos a serem impressos. Seta 2: opção editar processos, Seta 3: o ícone/engrenagem do lado direito da tela para acesso ao painel de controle da máquina e seta 4 opção para preparar para imprimir.



. Fonte: Autoria própria,2021

Outro campo importante da tela principal é o botão **editar processo**¹ ver figura 12 (lado esquerdo inferior seta 2) ele dá acesso as **configurações FFF**.

No canto inferior do lado direito está localizado o ícone na forma de uma **engrenagem**, seguir a indicação da seta 3 na Fig. 12, este comando é o **painel de controle da máquina**, o qual dará acesso ao comando **controle de movimento**. E a seta com o número 4 está indicando o comando **preparar para imprimir**.

Os quatro comandos são os mais utilizados para operar a máquina e serão detalhados a seguir.

4.3.2.1 Painel de controle da máquina

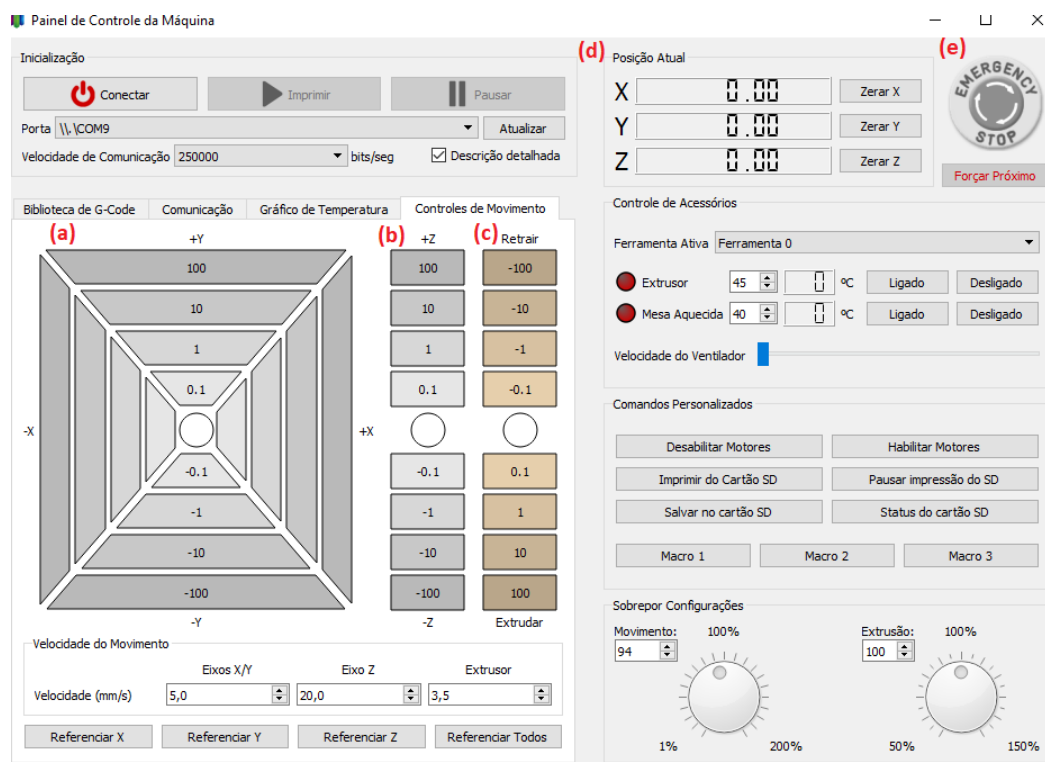
Clicando no **painel de controle da máquina**, simbolizado pela engrenagem (ver Fig. 12 seta 3) irá abrir a janela onde é possível localizar o botão **conectar** (ver a Fig. 13), e ao seu lado há as opções imprimir e pausar. O botão imprimir é utilizado

¹ As palavras grafadas em negrito correspondentes as indicações dos comandos/ texto do software

quando todos os parâmetros já tiverem sido determinados. O botão pausar, pausa a impressão e após clicar nele novamente ele retoma do ponto que parou a impressão.

Abaixo dos comandos conectar, pausar e imprimir (ver Fig. 13) é possível visualizar o endereço da porta de comunicação e a velocidade de comunicação, estes campos não devem ser alterados. Abaixo da velocidade de comunicação é possível acessar quatro abas com as seguintes denominações: **biblioteca de G-Code**; **Comunicação**; **Gráfico de temperatura** e **controle de movimento**. A aba **controle de movimento** permite controlar os movimentos dos eixos x, y, z e retrair (êmbolos) as outras abas são dados coletados acerca do processo e da comunicação da máquina com o programa, não possuindo comandos executáveis.

Figura 13 - Painel de controle aberto na aba controle de movimento. a) eixo x e y, b) eixo z, c) retrair (movimento do carrinho do cabeçote), d) posição atual dos eixos x,y,z, e) botão de emergência.



Fonte: Autoria própria,2021

Na Fig. 13 também - **painel de controle da máquina** - estão nomeados os principais itens que serão utilizados para realizar os primeiros passos de uma bioimpressão. No campo (a) podem ser configurados os movimentos da mesa (eixo

y) e também do cabeçote no eixo x , em (b) é a movimentação do eixo z da máquina, em (c) é a retração e avanço dos êmbolos das seringas e em (d) é possível visualizar a posição atual dos eixos da máquina e em (e) é o botão de **emergency/stop**. Ao clicar sobre cada uma das opções dos campos (a), (b) e (d) – Fig.13 – é possível controlar os deslocamentos dos eixos x, y, z conforme as variações indicadas na figura 13 e que estão mensuradas em milímetros. Por exemplo, para qualquer eixo, ao clicar na indicação + 100 como resultado se observará um deslocamento de 100 mm no eixo selecionado. Da mesma maneira, ao clicar em – 10 (para qualquer eixo) será obtida uma retração de 10 mm.

O botão **emergency/stop** (e) localizado no canto superior direito deve ser clicado/acionado em casos de mudanças não esperadas do funcionamento da bioimpressora. Ao clicar nele a impressão é cancelada imediatamente.

4.3.2.2 Editar processo

Clicando no comando **editar processo** (Fig. 12 seta 2), abrirá uma janela chamada **configurações FFF**, a qual possui 12 abas (ver Fig. 14). Destas abas algumas não necessitam ser utilizadas, pois o protocolo prioriza os comandos essenciais de operação da bioimpressora.

Figura 14 – Janela de Configurações FFF

The image shows a software window titled "Configurações FFF". At the top, there are fields for "Nome do Processo" (Process 1) and "Selecione o Perfil" (Bio (modified)). Below these are sections for "Auto-configuração para o Material" (PLA) and "Auto-Configurar para Qualidade de Impressão" (Medium). A "Configurações Gerais" section includes a "Porcentagem de Preenchimento" slider set to 20%, and checkboxes for "Adicionar Base (Raft)" and "Gerar Suporte". A tabbed interface at the bottom shows the "Extruder" tab selected, displaying the "Ferramenta Primary Extruder" configuration. This section includes a "Visão Geral" area with a dropdown for "Ferramenta associada ao Extrusor" (Ferramenta 0), and input fields for "Diâmetro do Bico" (0,60 mm), "Multiplicador de Extrusão" (0,05), and "Largura de Extrusão" (0,60 mm). Below this is a "Controle de Escorrimento" section with checkboxes for "Retração", "Inativo no Final", and "Limpar o Bico", each with associated distance or velocity settings.

Fonte: Autoria própria,2021

Em **configurações FFF** será inserido o **Nome do processo** (digite nesse campo o nome desejado) e selecionado o **Perfil**, todo biomaterial terá seu perfil próprio seguindo os itens de cada aba que serão descritos a seguir.

Na lateral direita deve ser localizada a aba **extrusor**. Abaixo do texto **Ferramenta Primary Extruder**, há o campo **visão geral**. Abaixo do texto **visão geral** estão 4 campos essenciais para o processo, que são eles: **Ferramenta associada ao extrusor**, **diâmetro do bico**; **multiplicador de extrusão** e **largura de extrusão**.

A opção **ferramenta associada** possui duas alternativas de uso com a bioimpressora: **ferramenta 0** e **ferramenta 1**. A **ferramenta 0** aciona o extrusor posicionado no cabeçote no lado esquerdo da bioimpressora e a **ferramenta 1** aciona o extrusor da direita da bioimpressora (Fig. 11).

Na opção **diâmetro do bico** será marcado o diâmetro que será acoplado na ponta da seringa e esse valor deve ser verificado/ confirmado no campo **largura de extrusão**. Para confirmar deve-se marcar o item **manual** e digitar o mesmo valor do bico no campo diâmetro do bico. Por exemplo, se o bico na ponta da seringa for de 0,70 mm este valor deverá aparecer em diâmetro do bico e em largura de extrusão, conforme mostra a Fig. 14.

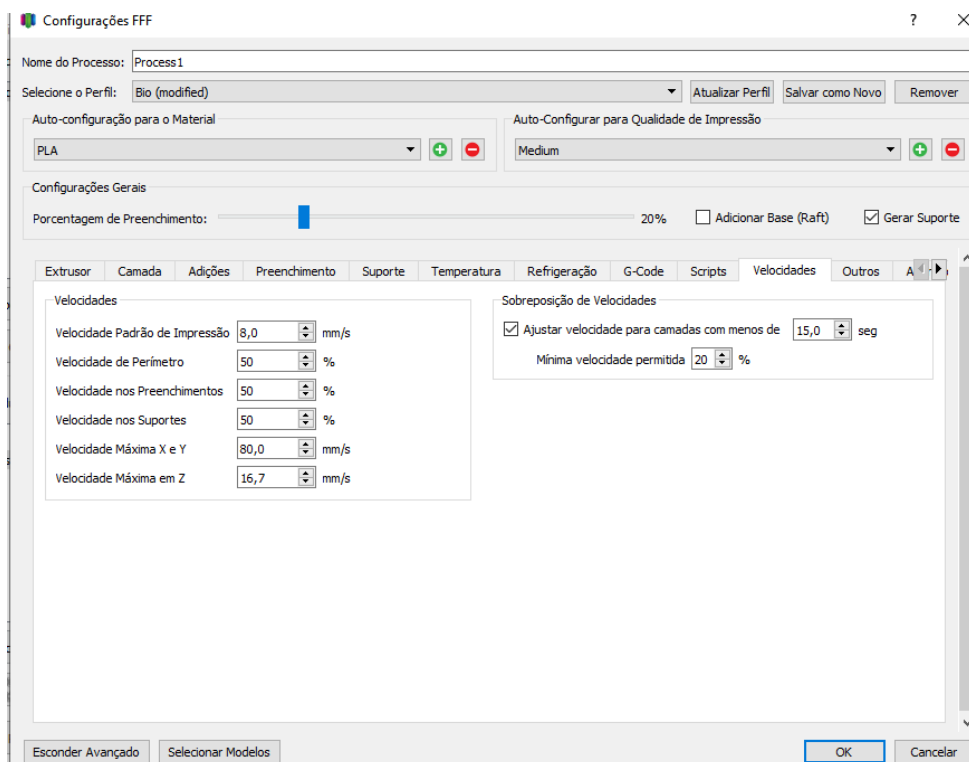
O item **multiplicador de extrusão** é uma das principais variáveis dentro do processo de bioimpressão é responsável pela quantidade de material que será expelido através das seringas. Se perceber que há falha na impressão, pode-se verificar se o valor está muito baixo, significa pouco material sendo enviado para os bicos.

Outra variável importante no protocolo é a **velocidade de extrusão** com ela é possível controlar a velocidade da deposição de material, se a velocidade for muita alta, pode ocorrer falha de impressão pois o material não terá tempo para escorrer. Se a velocidade for muito baixa pode ser depositado muito material num curto período de tempo.

A velocidade de extrusão associada adequadamente ao **multiplicador de extrusão** são os principais parâmetros a serem ajustados para se obter uma bioimpressão de qualidade satisfatória. Essas opções do *software* possibilitam uma grande gama de variações a fim de adaptar os parâmetros da bioimpressora ao biomaterial selecionado, sendo a principal característica do biomaterial a ser considerada é principalmente sua viscosidade, conforme descrito no item 3.4.

Ao selecionar a aba **velocidades** abrirá a tela mostrada na Fig. 15. Na opção **velocidade padrão de impressão** (Fig. 15) devem ser inseridos valores que podem variar dependendo da viscosidade do material. A velocidade varia com a quantidade de biomaterial a ser depositado. Velocidade alta, pode gerar um depósito baixo de biomaterial, e velocidades muito baixas podem gerar camadas espessas. Alguns campos de velocidade são dados em porcentagem baseados na velocidade padrão (Fig. 15). Sendo eles **velocidade de perímetro**, **velocidade nos preenchimentos** e **velocidade nos suportes**. Estes campos podem ser mantidos com os valores fixos dados pelo padrão do programa, conforme mostra a Fig. 15. Assim, deve-se variar apenas a opção **velocidade padrão de impressão**.

Figura 15 - Configurações da aba Velocidades

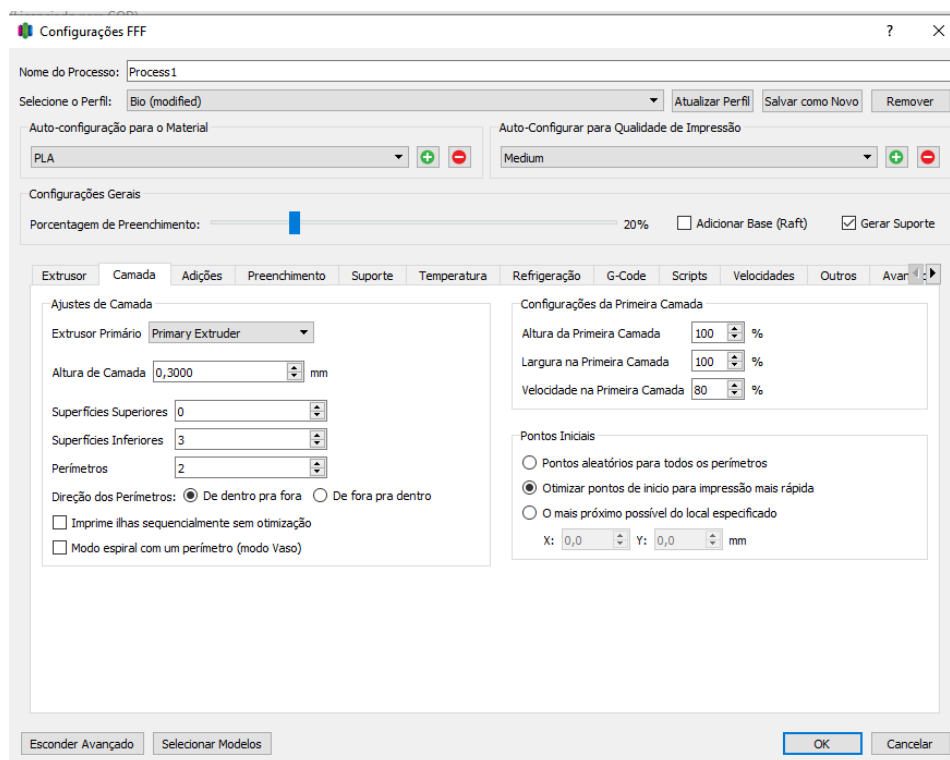


Fonte: Autoria própria, 2021

Na aba camada, ver Fig. 16, há o campo **ajustes da camada**. Em **ajuste da camada** no item **extrusor primário**, deve constar *primary extruder*. No próximo campo, **altura da camada**, pode ser digitado valores que corresponderão a altura da camada a ser impressa.

Na opção **Superfícies Superiores** pode se indicar quantas camadas se deseja imprimir no topo da bioimpressão. Na opção **Superfícies Inferiores** quantas camadas embaixo do objeto a ser bioimpresso e na opção **Perímetros** quanto se quer de voltas no perímetro da peça a ser extrusada. No caso da impressão de *scaffolds* não são necessários a impressão de superfícies superiores, superfícies inferiores e perímetros, podendo colocar o número 0 neles.

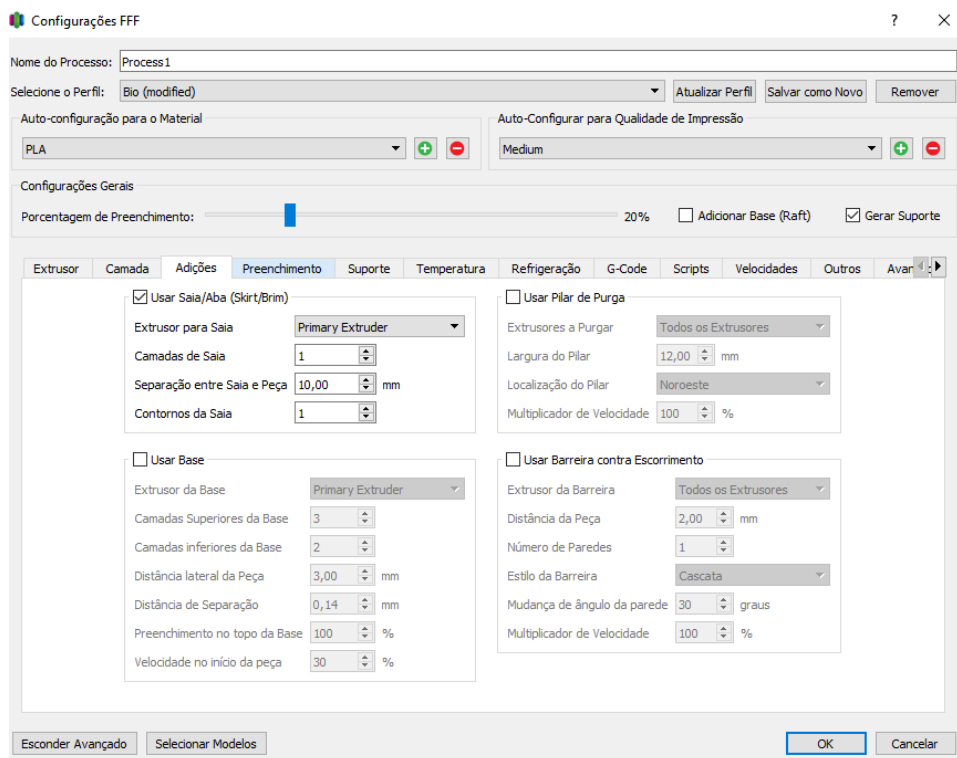
Figura 16 - Configurações da aba camada



Fonte: Autoria própria,2021

Na aba **Adições** (ver Fig. 17) o item **Usar Saia/Aba (*skirt/brim*)** pode ser marcado, e então possibilitará criar um contorno ao redor da área de impressão do objeto. Esse recurso é útil para o usuário perceber se o processo está sem falhas, se a deposição de biomaterial está de acordo com o esperado. Neste protocolo sugere-se utilizar este recurso.

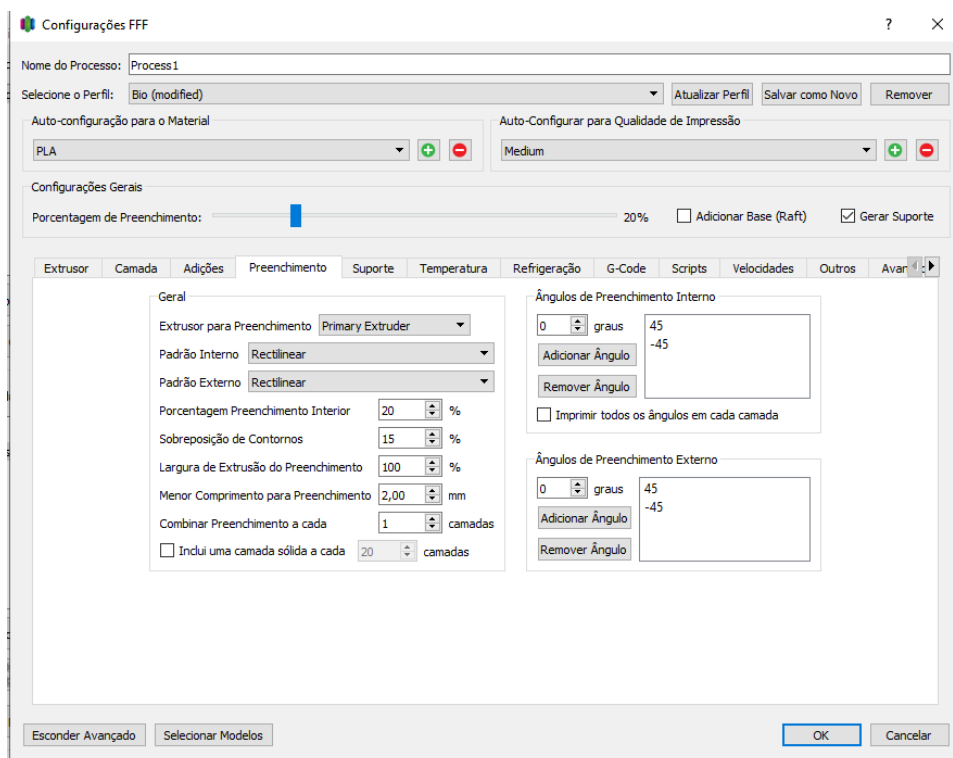
Figura 17 - Configurações da aba Adições



Fonte: Autoria própria, 2021

Na aba **Preenchimento** (Fig. 18) pode ser especificado quanto de material será utilizado no preenchimento interno da peça. No item **Extrusor para preenchimento** deve estar marcado **Primary extruder**. Para a impressão de *scaffolds* deste protocolo foi utilizado 20% de preenchimento.

Figura 18 - Configurações da aba Preenchimento

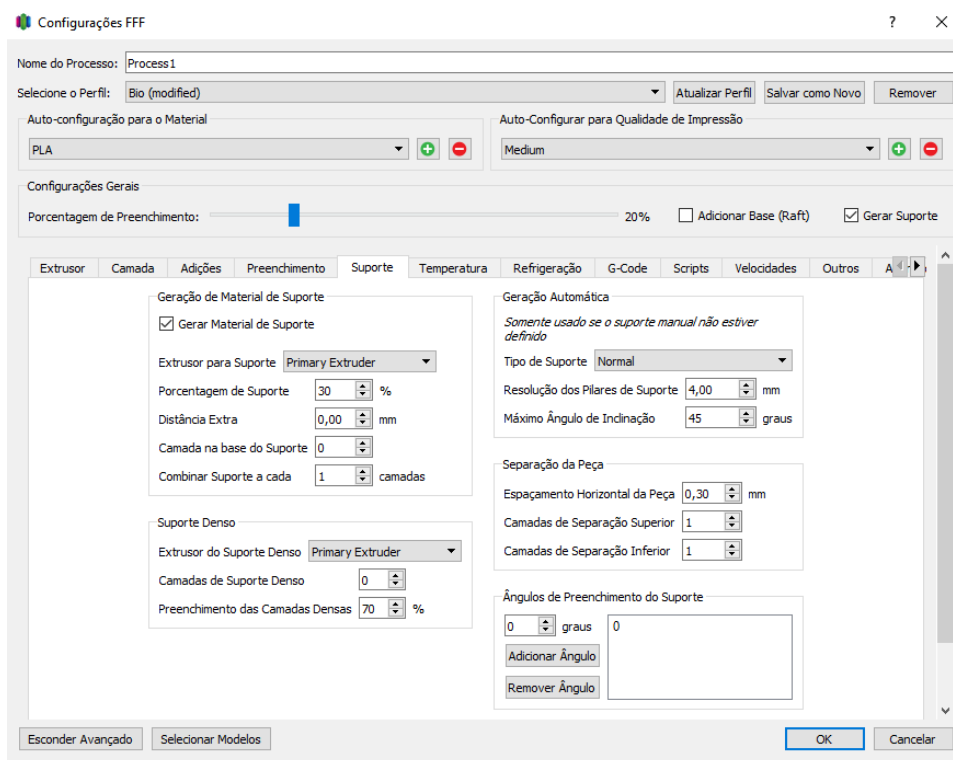


Fonte: Autoria própria, 2021

As opções **Padrão interno** e **Padrão externo** podem ser alteradas conforme a necessidade de geometria interna da peça, mas a opção mais utilizada é a **rectilinear**. Os demais campos dessa aba podem ser deixados preenchidos conforme as indicações automáticas do *software*, conforme mostrado na Fig. 18.

Na aba **Suporte** (ver Fig. 19) serão encontrados os campos para controle do suporte. Basta marcar o item **Gerar Material de Suporte**. Em **Extrusor para Suporte** deverá estar marcado **primary extruder**. Em **porcentagem preenchimento interior** se indicada variações desde 10% a 40% quanto mais alta a porcentagem mais demorada será a impressão dos objetos.

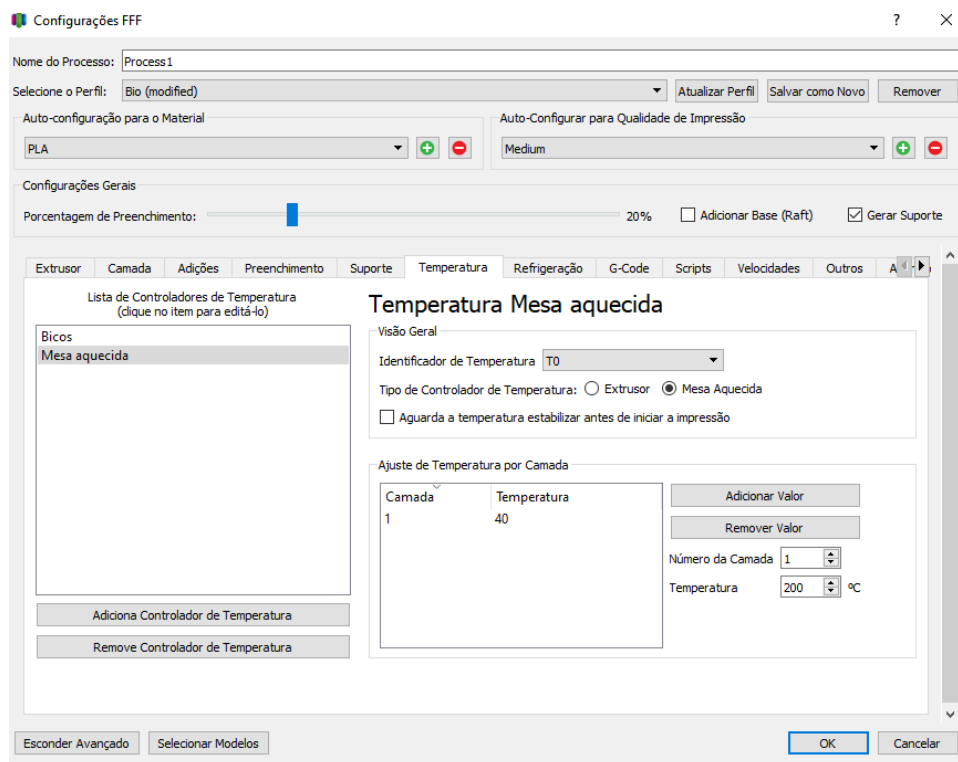
Fig. 19 - Configurações da aba suporte



Fonte: Autoria própria, 2021

Na aba temperatura (ver Fig. 20) nela é onde estão os comandos para aquecer a mesa de impressão caso biomaterial requeira aquecimento. Em **Visão Geral** existe o item **Identificador de Temperatura** que deve marcar T0 e o item **Tipo de Controlador de Temperatura** deve estar marcado **Mesa Aquecida**, pois o bico extrusor não possui aquecimento. O uso da temperatura depende do biomaterial que será utilizado na bioimpressão, sendo que a bioimpressora possui uma temperatura máxima de aquecimento de 110° C de aquecimento da mesa. Para o hidrogel de alginato-gelatina não é necessário utilizar aquecimento na mesa, portanto a temperatura deve marcar 0.

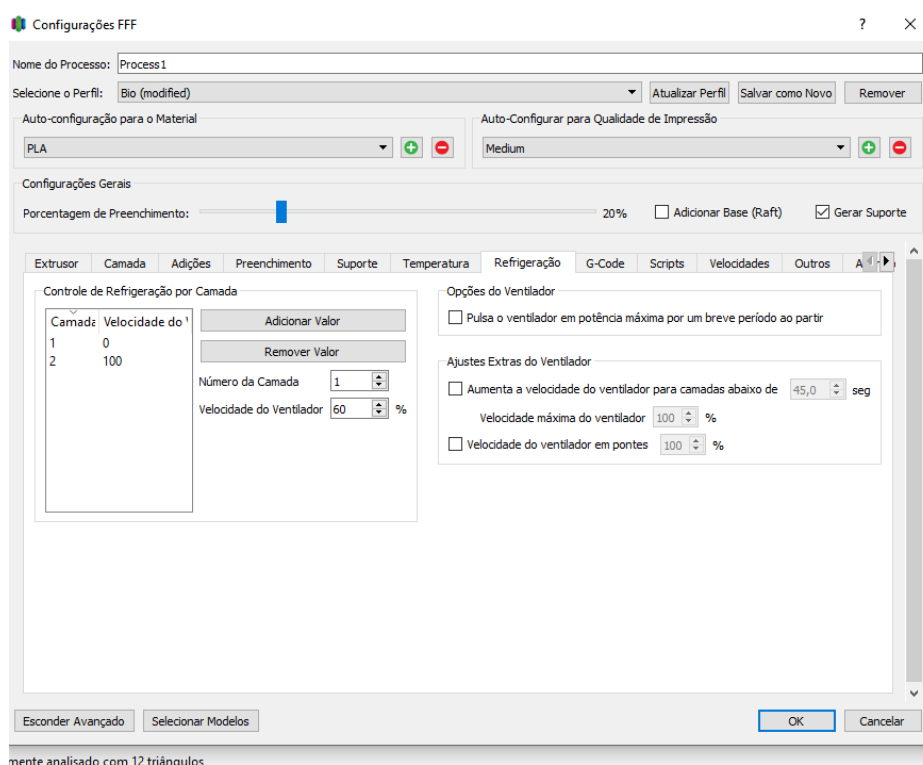
Figura 20 - Configurações da aba Temperatura



Fonte: Autoria própria,2021

Outros comandos que dependem do biomaterial utilizado, são os da aba **Refrigeração** (ver fig. 21). Nessa aba é possível escolher o **número de camadas** que utilizarão o ventilador e a **porcentagem de velocidade do ventilador**, tal como o exemplo da fig. 21. Para uso do hidrogel de alginato-gelatina a refrigeração deve ser de 100%.

Figura 21 - Configurações da aba Refrigeração



Fonte: Autoria própria,2021

Na aba **G-Code** (ver Fig. 22) é possível ler os dados de volume de impressão e os dados do *firmware* da bioimpressora.

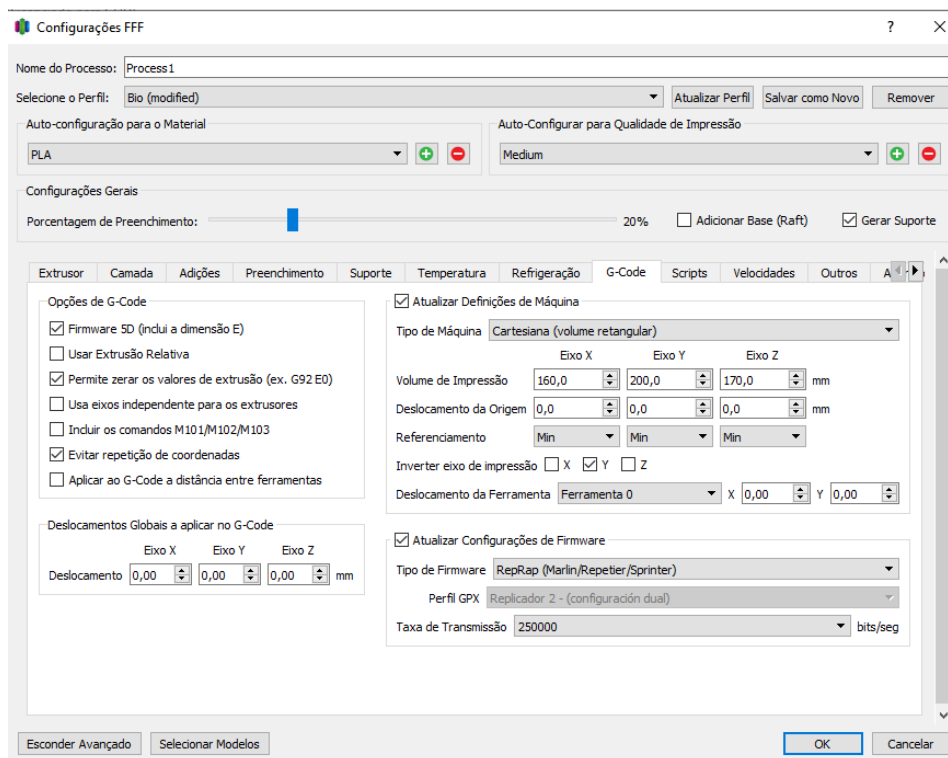
Os itens que devem estar marcados em opções de **G-Code** são: **Firmware 5D (inclui a dimensão E)**, **permitir zerar os valores de extrusão** e **Evitar repetições de coordenadas**.

No campo **atualizar definições de máquina**, o tipo da máquina deve estar marcado como **cartesiana (volume retangular)**.

A opção **volume de Impressão** corresponde ao tamanho máximo que a bioimpressora atinge nos eixos x, y e z, sendo os valores em mm 160, 200 e 170, respectivamente, conforme Fig. 22.

No campo **Atualizar Configurações de Firmware** é possível visualizar o tipo de *firmware*, e que deverá estar marcando **RepRap(Marlin/Repetier/Sprinter)**, e a taxa de transmissão deve estar marcando **250000 bits/s**.

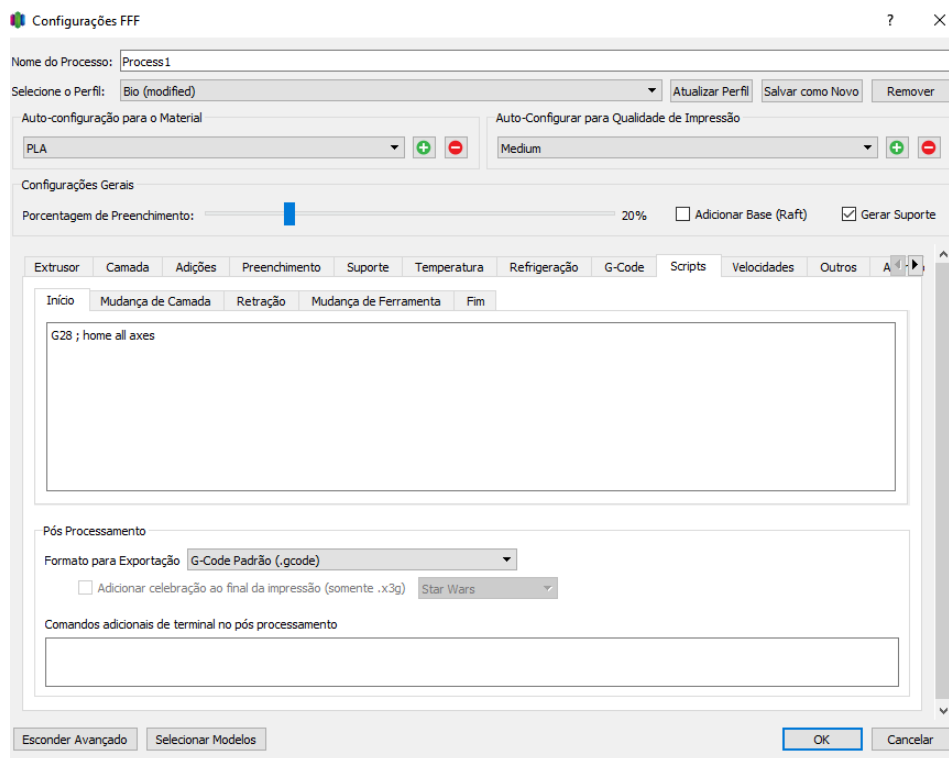
Figura 22 - Configurações da aba G-Code



Fonte: Autoria própria, 2021

As configurações da aba **Scripts** (ver Fig. 23) não possuem necessidade de serem alteradas, este campo exige um nível mais avançado do usuário, portanto neste protocolo deixará inalterada os campos da aba scripts.

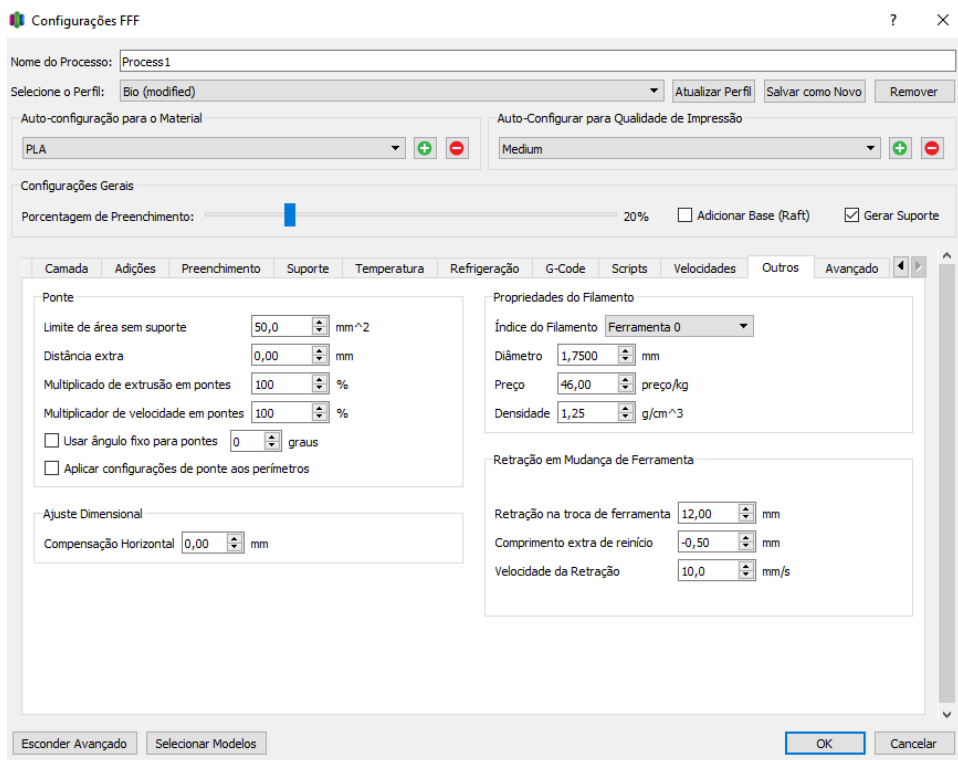
Figura 23 - Configurações da aba Script



Fonte: Autoria própria,2021

Na Aba **Outros** (ver fig. 24) estão algumas opções de propriedades do filamento, em índice de filamento deve constar a ferramenta que será utilizada no caso a 0 ou a 1. A opção **Diâmetro** deve marcar 1,75mm. O **preço** poderá ser alterado e a **densidade** pode permanecer a mesma, pois como houve uma adaptação de uma extrusora FDM de filamento para impressão com pasta, não é possível padronizar com um tipo único de biomaterial.

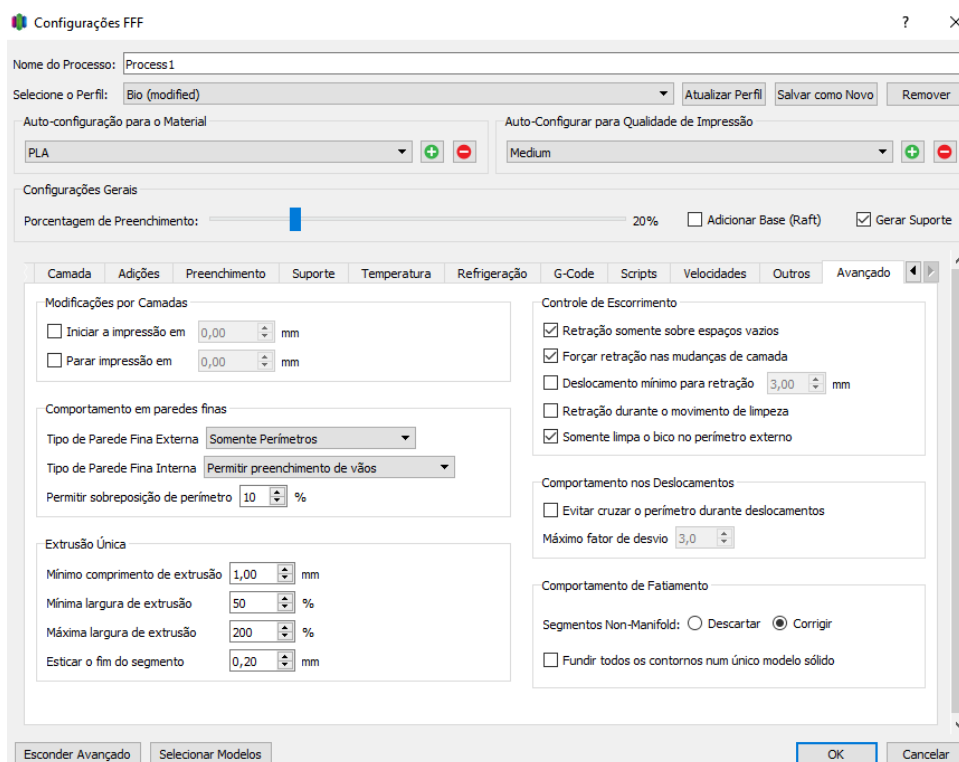
Figura 24 - Configurações da aba Outros



Fonte: Autoria própria, 2021

A última aba em configurações de FFF (fig. 25) é uma aba com opções para usuário avançado, que como o próprio nome diz não será tratada neste protocolo de bioimpressão. O protocolo é para uso de iniciantes na bioimpressão ou impressão 3D por embolo.

Figura 25 - Configuração da aba avançado



Fonte: Autoria própria,2021

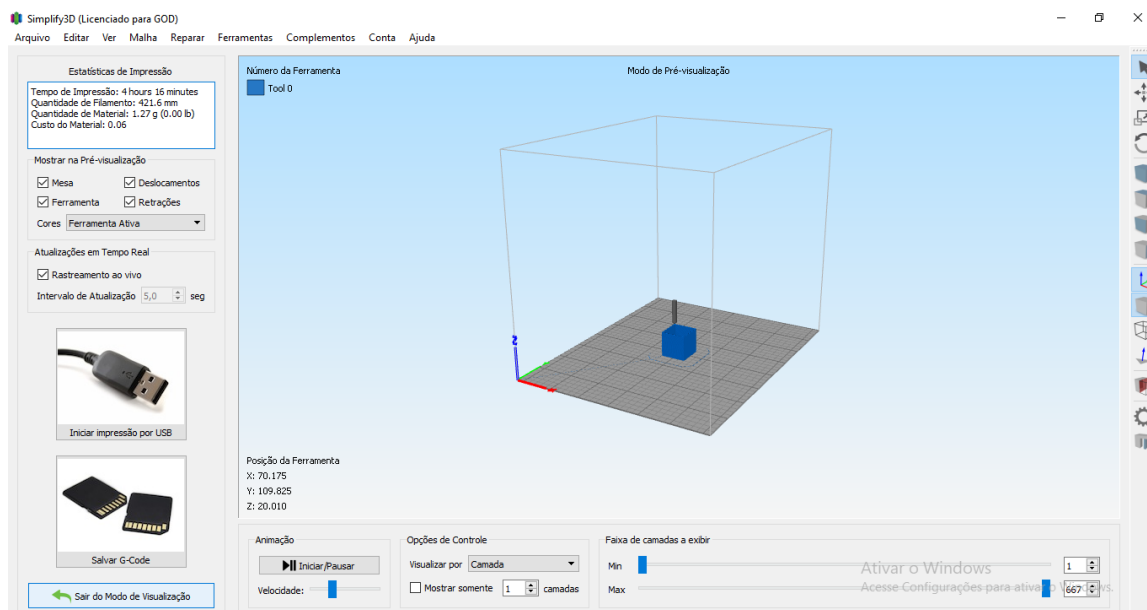
Após a definição de todas as configurações necessárias se terá um perfil de impressão para o hidrogel. O próximo passo é dar **OK** fechando a janela de configuração FFF.

4.3.2.3 Preparar para imprimir

Voltando a tela principal Fig. 12 seta 4, o comando **preparar para imprimir** dá acesso ao modo de visualização da impressão podendo ser simulada por meio de uma **animação** (fig. 26) a impressão por camadas. Assim é possível ter uma pré-visualização da impressão. Para tanto pode-se selecionar no canto superior esquerdo(fig.26) o que se quer mostrar na pré-visualização sendo os campos **mesa**, **ferramenta**, **deslocamentos** e **retração** as opções oferecidas pelo *software*.

Após uma pré-visualização se deve selecionar a opção **iniciar impressão por USB**. A impressora também tem a opção de inserir cartão com o Código G, porém neste protocolo de utilização o recomendado é utilizar a opção por cabo usb.

Figura 26 - Configurações em preparar para imprimir



Fonte: Autoria própria,2021

4.3.3 Processo básico de impressão 3D na bioimpressora

Pode-se dizer que há a necessidade de 5 passos para utilizar a bioimpressora.

O primeiro passo é entrar em **painel de controle da máquina** e clique em conectar (fig.13), clicando em conectar, o botão mudará da cor de vermelho para o verde.

O segundo passo é entender que a seringa é composta por duas partes o embolo e o reservatório. Assim a parte do reservatório vai ser posicionada dentro do suporte do cabeçote(fig.11A-d) e o embolo no carrinho do cabeçote (fig.11A-f). Para este posicionamento há necessidade de utilizar os comandos do *software* para movimentar o carrinho para posicionar o embolo, assim clique em **painel de controle da máquina**(fig.12)(símbolo engrenagem) e entre na aba **controle de movimento**(fig.13), a opção **retrair** deverá ser acionada até chegar a altura desejada para posicionar o embolo no carrinho e o reservatório no suporte, se recomenda utilizar de 10 em 10 milímetros os avanços.

O terceiro passo é importar o objeto a ser impresso

Quarto passo é editar o processo conforme o item 4.4.2.2 para o hidrogel específico

Quinto passo é seguir o item 4.4.2.3.

4.4 SIMULAÇÃO DE BIOIMPRESSÃO COM HIDROGEL ALGINATO/GELATINA

Para avaliar as variáveis: velocidade e o multiplicador de extrusão foi preparado o hidrogel de alginato/gelatina. O resultado foram os *scaffolds* da Fig. 27,28 e 29.

O preparo do hidrogel foi um desafio por causa da temperatura ambiente, pois os testes não foram feitos em ambiente controlado, então nos dias frios o preparo ocorreu conforme o esperado, mas em dias onde a temperatura ambiente estava mais alta, ele não atingiu a viscosidade ideal.

Para o início da impressão a temperatura do ambiente deve ser baixa em torno de 10° C 15° C, porque o hidrogel é sensível a temperaturas altas, ele não atinge a viscosidade ideal para a impressão em temperaturas ambiente alta., para isto pode-se colocado na geladeira após o seu preparo por volta de 10 minutos ele atinge a viscosidade ideal. Este gel é termorreversível, ou seja, se a viscosidade ficar muito alta pode-se retornar ao banho maria e ele abaixa a viscosidade, e se por na geladeira ele torna a viscosidade mais alta.

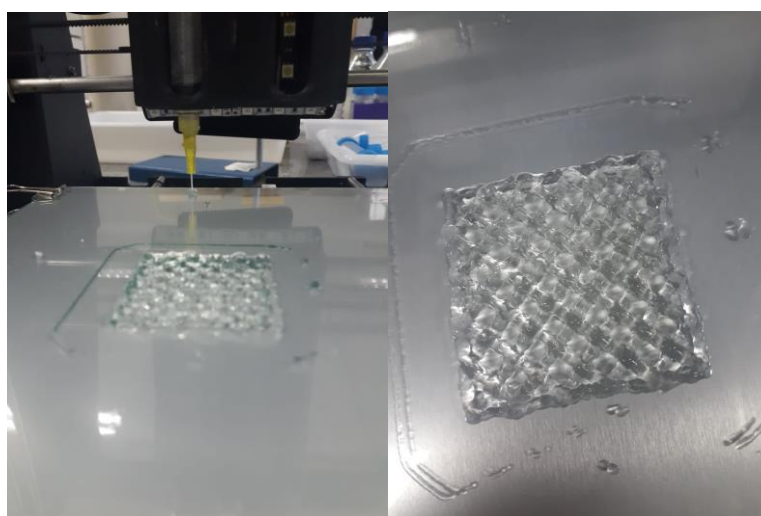
Foram testadas algumas velocidades e alguns valores no multiplicador de extrusão. Para chegar aos valores que atenderam uma bioimpressão satisfatória foram necessários vários testes. Começou-se com a velocidade de 8mm/s, com esta velocidade não dava tempo de escorrer o gel, então diminuiu para 6mm/s, e depois por fim para configuração de 5 mm/s para velocidade. Para esta velocidade o valor no multiplicador de vazão foi de 0,10. Este valor também passou por testes, primeiro com 2 este valor foi muito alto, formou um zigzag na impressão, não uma linha reta, depois diminuiu-se para 1 e o resultado já foi melhor, depois diminui-se para 0,5 e ainda não foi satisfatório, chegando no valor de 0,1 atingiu o esperado que era uma linha reta de impressão, esta linha é possível se ver quando se usa a configuração da saia, ou skirt, que é o trabalho que a máquina faz formando um perímetro em torno do que será a peça a ser bioimpressa.

Foi utilizado como ponteira um cateter nº 24 para os valores do bico de extrusão e largura de extrusão de 0,7 mm. A altura da camada foi de 0,1 mm.

A refrigeração foi de 100% através do cooler da bioimpressora foi gerado ar e a mesa na temperatura ambiente, como ela é metálica com um vidro sobre ela , se tem a sensação de temperatura fria, ou seja, deve-se desligar o aquecimento da mesa de bioimpressão, pois como relatado o gel é sensível a temperatura.

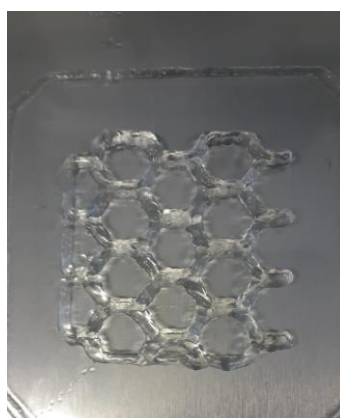
Também é necessário utilizar uma placa de petri para imprimir o scaffold, para depois leva-lo ao cultivo celular.

Figura 27 – Impressão retilinear de hydrogel de alginato/gelatina



Fonte: Aatoria própria,2021

Figura 28 - Impressão Hobneycomb com velocidade 5mm/s



Fonte: Aatoria própria,2021

Figura 29 - Impressão wiggle com velocidade 5mm/s



Fonte: Autoria própria,2021

5 CONCLUSÕES

Ao avaliar as variáveis metrológicas da bioimpressora 3D se percebeu o quanto é importante garantir a calibração da bioimpressora e que os parâmetros de velocidade estejam aferidos garantindo a confiabilidade do sistema de eixos x,y,z.

A definição das variáveis de processamento, velocidade de deslocamento e multiplicador de extrusão ideal para a deposição do hidrogel foi crucial no desempenho da bioimpressão dos scaffolds de alginato-gelatina, sem o experimento destes valores não seria possível estabelecer um padrão de bioimpressão.

A velocidade e o multiplicador de extrusão são variáveis parceiras, às vezes uma ou outra deve ser alterada para se obter a bioimpressão desejada.

As adaptações de impressoras 3D em bioimpressoras tem um grande potencial para uso com hidrogel, entretanto alcançar os parâmetros de impressão ideais não são de imediato alcançados, há a necessidade de experimentação.

Com a experimentação foi possível perceber que velocidades altas muitas vezes não são ideais para impressão de hidrogel, elas geram falhas na deposição do material. O mesmo pode acontecer com o multiplicador de extrusão, valores altos também podem gerar falhas semelhantes de deposição de hidrogel. Depois da experimentação por tentativa e erro, chegou-se aos valores ideais de impressão do hidrogel de alginato-gelatina para este trabalho que foram velocidade de 5mm/s e no multiplicador de extrusão foi marcado 0,10 mm³.

Conhecer as principais partes da máquina, e fazer sua calibração envolve diretamente o *hardware*, porém para experimentação de hidrogéis conhecer o *software* também é necessário e assim a elaboração da proposta de protocolo de utilização da biompressora 3D com hidrogel de Alginato/gelatina foi essencial para garantir a reprodutibilidade dos experimentos.

REFERÊNCIAS

ATTALLA, R. et al. 3D bioprinting of heterogeneous bi- and tri-layered hollow channels within gel scaffolds using scalable multi-axial microfluidic extrusion nozzle. **Biofabrication**, v.11, n 1, 2019. Disponível em: <https://iopscienceiop.ez48.periodicos.capes.gov.br/article/10.1088/1758-5090/aaf7c7> Acesso em: 10 de julho de 2021

BARUFFALDI, D.,PIRRI, C.,FRASCELLA F. 3D bioprinting of cell-laden carbopol bioinks. **Bioprinting**, v.22,Jun. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2405886621000087?via%3Dihub>. Acesso em 10 de julho de 2021.

CANESSA, Enrique. **Low-cost 3D Printing for Science**, Education and Sustainable Development. In: CANESSA, E., FONDA, C., ZENNARO, M. Low-cost 3d printing: for science, education & sustainable development. Trieste, Italy: Ictp—the Abdus Salam International Centre For Theoretical Physics, 2013. p. 11-18.

CHENG, D. **Extrusion Bio-Printing of Scaffolds for Tissue Engineering Applications**. Springer International Publishing.2019

FIOCRUZ. Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz. **Foresight em 3D/4D bioprinting**. Relatórios de pesquisa,2018. Disponível em: https://cee.fiocruz.br/sites/default/files/CEE_Relat%C3%B3rio%20de%20Pesquisa_Foresight_3D-4D-Bioprinting.pdf Acesso em: maio de 2021.

HONIBALL J., PEPPER M., PRINSLOO. Stepbystep assembly and testing of a lowcost bioprinting solution for research and educational purposes. **Methodsx**, v.8,2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2215016120304064?via%3Dihub>.Acesso em:10 de julho de 2021.

HUBER, T. et al. 3d printing of gelled and crosslinked cellulose solutions an exploration of printing parameters and gel behaviour. **Bioengineering**, v. 7, n 2,2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-5354/7/2/30> Acesso em: 10 de julho de 2021.

IOANNIDIS, K. et al. A custom ultralowcost 3d bioprinter supports cell growth and differentiation. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**,v.8, nov.2020. Disponível em: https://apps.webofknowledge.ez48.periodicos.capes.gov.br/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=6FJ4jGzrkBTApAffn1&page=1&oc=6&cacheurlFromRightClick=no. Acesso em:10 de julho de 2021.

Jl, S. et al. Novel biinks from uvresponsive norbornenefunctionalized carboxymethyl cellulose macromers. **Bioprinting**, v. 18, jun.2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2405886620300105?via%3Dihub>. Acesso em 10 de julho de 2021.

KAHL, M. et al. Ultralowcost 3d bioprinting modification and application of an offtheshelf desktop 3dprinter for biofabrication. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v.7, jul.2020.Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00184/full>. Acesso em 10 de julho de 2021.

KE, C. et al. Alginate-gelatin based core-shell capsule enhances the osteogenic potential of human osteoblast-like MG-63 cells. **Materials & Design**. 210.set.2021 Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0141391021002056?via%3Dihub>
Acesso em: outubro de 2021

KRIGE, A. et al. Design and implementation of a low cost bioprinter modification allowing for switching between plastic and gel extrusion. **HardwareX**, v.9,2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2468067221000158?via%3Dihub> Acesso em: 10 de julho de 2021.

MAGALHÃES, L. et al. Printing 3d hydrogel structures employing lowcost stereolithography technology. **Journal of functional biomaterials**, v.11, n.1,2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4983/11/1/12>. Acesso em: 10 de julho de 2021.

MIRDAMADI, E. Fresh 3d bioprinting a fullsize model of the human heart. **Acs biomaterials science and engineering**, v.6, n.11. p. 6453-6459, 2020. Disponível em: <https://pubs-acsc.org.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1021/acsbomaterials.0c01133>. Acesso em: 10 de julho de 2021.

MUELLER, J. Programming diffusion and localization of dna signals in 3dprinted dnafunctionalized hydrogels. **Small**,v.16, n.31,2020.Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/smll.202001815>
Acesso em: 10 de julho de 2021.

NETO, P. I. **Estudo da viabilidade técnica e projeto de um mini-cabeçote de extrusão com rosca para impressoras tridimensionais portáteis**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

PITAGORA, H.C., ARAUJO K.V. **Ciclo de vida de patentes**: uma análise do cenário global da manufatura aditiva a partir de 2009 e 2014. Cadernos de Prospecção.

Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/nit/article/view/23086>. Acesso em: maio de 2021.

RAJABI, N. et al. Recent advances on bioprinted gelatin methacrylatebased hydrogels for tissue repair. **Tissue engineering part A**, v.27, n.11-12, p. 679-702, 2021. Disponível em: <https://www.liebertpub.com.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1089/ten.tea.2020.0350>. Acesso em: 10 de julho de 2021.

REID, J. et al. A 3d bioprinter platform for mechanistic analysis of tumoroids and chimeric mammary organoids. **Scientific reports**, v.9, n.1, 2019. Disponível em: <https://www-nature.ez48.periodicos.capes.gov.br/articles/s41598-019-43922-z>. Acesso em: 10 de julho de 2021.

ROBINSON, T. et al. Fabrication of aligned biomimetic gellan gumchitosan microstructures through 3d printed microfluidic channels and multiple in situ crosslinking mechanisms. **Acs biomaterials science and engineering**, v.6, n.6, p. 3638-3648, 2020. Disponível em: <https://pubs-acsc-org.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1021/acsbomaterials.0c00260>. Acesso em: 10 de julho de 2021.

SANTANA, L. **Avaliação de uma impressora 3d baseada em projeto de código aberto na fabricação de peças em PLA**. 166 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Santa Catarina. 2015

SOMASEKHARAN, L. et al. Biofabrication of skin tissue constructs using alginate, gelatin and diethylaminoethyl cellulose bioink. **International Journal of Biological Macromolecules**. 189, p. 398-409. 2021. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0141813021017748?via%3Dihub>. Acesso em outubro de 2021.

VIEIRA, D. S. T, MALMONGE, S., SANTOS, A. Development of a chitosan and hyaluronic acid hydrogel with potential for bioprinting utilization a preliminary study. **Journal of biomaterials applications**, v.36, n.2, p. 358-371, 2021. Disponível em: <https://journals.sagepub.com.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1177/08853282211024164>. Acesso em: 10 de julho de 2021.

VOLPATO, N. et al. **Manufatura Aditiva: tecnologia e aplicações da impressão 3D**. 1 ed. São Paulo: Blucher, 2017.

WITTE, K. et al. Bacterialaden microgels as autonomous three dimensional environments for stem cell engineering. **Materials today bio**, v. 2, mar. 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2590006419300092?via%3Dihub>

Acesso em: 10 de julho de 2021.

XIE, M. et al. Electroassisted bioprinting of lowconcentration gelma microdroplets.

Small, v.15, n.4, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez48.periodicos.capes.gov.br/doi/10.1002/sml.201804216>.

Acesso em: 10 de julho de 2021.

YENILMEZ, B. et al. Development and characterization of a lowcost 3d bioprinter.

Bioprinting, v.13, 2019. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.ez48.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2405886618300265?via%3Dihub>. Acesso em: 10 de julho de 2021.