

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL EM  
PROCESSAMENTO DE MATERIAIS - PPGPM**

**GUSTAVO LUIZ BUENO CARDOSO**

**ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE BIOIMPRESSORA 3D DE  
EXTRUSÃO COAXIAL**

**DESIGN AND VALIDATION OF COAXIAL EXTRUSION 3D BIOPRINTER**

São José dos Campos  
2024

**GUSTAVO LUIZ BUENO CARDOSO**

**ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE BIOIMPRESSORA 3D DE  
EXTRUSÃO COAXIAL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional em Processamento de Materiais, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de mestre em Processamento de Materiais.

**Orientador:** Fernando dos Santos Ortega

**Coorientadora:** Ivone Regina de Oliveira

São José dos Campos  
2024

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Cardoso, Gustavo Luiz Bueno

Elaboração e validação de bioimpressora 3d de extrusão coaxial / Gustavo Luiz Bueno Cardoso; orientador, Fernando dos Santos Ortega; co-orientadora Ivone Regina de Oliveira. - São José dos Campos, SP, 2024.

1 CD-ROM, 89 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais.

Inclui referências

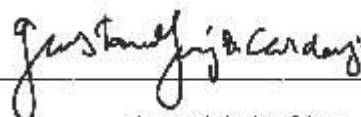
1. Processamento de Materiais. 2. Bioimpressão. 3. hidrogéis. 4. Engenharia Tecidual. I. Ortega, Fernando dos Santos, orient. II. Oliveira, Ivone Regina de, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais. IV. Título.

Eu, Gustavo Luiz Bueno Cardoso, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 12 de Julho de 2024.



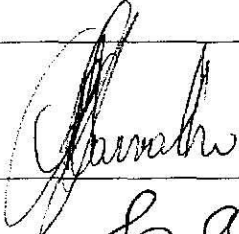
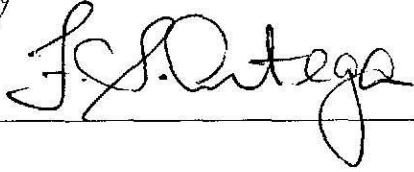
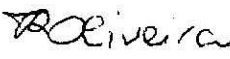


Autor(a) da Obra

Data da defesa: 15 / 03 / 2024

**GUSTAVO LUIZ BUENO CARDOSO**

**“ELABORAÇÃO E VALIDAÇÃO DE BIOIMPRESSORA 3D DE EXTRUSÃO COAXIAL.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Paulo Henrique Salles de Carvalho	
Prof. Dr. Fernando dos Santos Ortega	
Prof.ª Dr.ª Ivone Regina de Oliveira	
Prof. Dr. Daniel Alessander Nono - NaNono	
Prof.ª Dr.ª Luana Marotta Reis de Vasconcellos - UNESP	

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 15 de março de 2024.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, José Luiz Cardoso e Sílvia Domingues Bueno: meus heróis, que sempre me apoiaram em todas as dificuldades em um ambiente novo, cidade nova e experiências novas.

Dedico este trabalho aos meus familiares.

Dedico este trabalho aos meus incríveis orientadores, Prof. Dr. Fernando dos Santos Ortega e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup> Ivone Regina de Oliveira por toda paciência, apoio, confiança e garra em desenvolver este projeto.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Salles de Carvalho pelas conversas, conselhos, sugestões e dicas durante todo o Mestrado.

Ao Dr. Daniel Alessander Nono pela ajuda no desenvolvimento e produção das peças.

Dedico este trabalho aos meus colegas de sala, Verônica Cristina Pêgo Fiebig Aguiar e Indira Teixeira Bessa Bastos de Oliveira, que me apoiaram, me receberam e me permitiram continuar nessa trajetória.

Dedico este trabalho aos meus colegas de laboratório.

*“Wisdom is a circle: what you receive, you must give back.”*

Hot Wheels: AcceleRacers – A Corrida Final<sup>[66]</sup>.

## RESUMO

A engenharia de tecidos possui aplicação em diversos campos de estudo, como curativos, enxertos e próteses. As diferentes técnicas de produção destes produtos estão correlacionadas com as particularidades de cada material e o processo mais adequado para obtê-los, sendo a bioimpressão 3D uma grande inovação aos sistemas pela estabilização de sistemas tridimensionais a partir de hidrogéis e sistemas reológicos complexos. A partir de técnicas de manufatura aditiva desenvolvidas em áreas mais tradicionais, mecanismos de biomanufatura aditiva surgiram com foco em adaptar técnicas existentes para estruturas biológicas ou de uso biológico. Dentre tais técnicas, destaca-se a bioimpressão 3D por extrusão, emulando sistemas de impressão 3D tradicional (FDM – *Fused deposition modeling*) para produzir *scaffolds*, curativos e *organs-on-a-chip* por meio da extrusão de fios de hidrogéis com viscosidade adequada para bioimpressão, em geral com alto custo de matéria-prima. A dificuldade de obtenção de hidrogéis com características reológicas adequadas para bioimpressão trouxe a necessidade de adaptações ao sistema tradicional, como a bioimpressão 3D por extrusão para que hidrogéis mais simples e de menor custo sejam utilizados nesta técnica. Assim, este trabalho estudou a adaptação de uma bioimpressora 3D de baixo custo para um sistema de bioimpressão coaxial a partir de peças projetadas e fabricadas por impressão 3D FDM tradicional. Paralelamente estudou-se o comportamento reológico do Poloxâmero 407, considerado um hidrogel “padrão ouro” na bioimpressão e de um hidrogel de baixo custo à base de alginato de sódio, cujo comportamento reológico é insuficiente para o uso em uma bioimpressora convencional. Os hidrogéis de alginato de sódio e Poloxâmero 407 estudados apresentaram características reológicas distintas, com diferenças de viscosidade sob 7 ordens de grandeza. A bioimpressora projetada apresentou resultados promissores para a produção de hidrogéis em funcionamento para bioimpressão 3D para hidrogéis de baixa viscosidade, otimizando o funcionamento dos sistemas.

**Palavras-chave:** Manufatura aditiva, bioimpressão 3D, hidrogéis, bioimpressão coaxial, coextrusão

## ABSTRACT

Tissue engineering has applications in several fields of study, such as dressings, grafts and prosthetics. The different production techniques for these products are correlated with the particularities of each material and the most appropriate process to obtain them, with 3D bioprinting being a major innovation in systems for stabilizing three-dimensional systems from hydrogels and complex rheological systems. Based on additive manufacturing techniques developed in more traditional areas, additive biomanufacturing mechanisms have emerged with a focus on adapting existing techniques to biological structures or for biological use. Among such techniques, 3D extrusion bioprinting stands out, emulating traditional 3D printing systems (FDM – Fused deposition modeling) to produce scaffolds, curatives, and organs-on-a-chip through the extrusion of hydrogel threads with adequate viscosity. For bioprinting, generally with high raw material costs. The difficulty in obtaining hydrogels with rheological characteristics suitable for bioprinting has brought about the need for adaptations to the traditional system, such as 3D bioprinting by extrusion so that simpler and lower-cost hydrogels can be used in this technique. Thus, this work studied the adaptation of a low-cost 3D bioprinter to a coaxial bioprinting system using parts designed and manufactured by traditional FDM 3D printing. In parallel, the rheological behavior of Poloxamer 407, considered a “gold standard” hydrogel in bioprinting, and a low-cost hydrogel based on sodium alginate, whose rheological behavior is insufficient for use in a conventional bioprinter, was studied. The sodium alginate and Poloxamer 407 hydrogels studied presented distinct rheological characteristics, with viscosity differences over 7 orders of magnitude. The designed bioprinter showed promising results for production of functioning hydrogels for 3D bioprinting for low viscosity hydrogels, optimizing the functioning of the systems.

**Keywords:** Additive manufacturing, 3D bioprinting, hydrogel, coaxial bioprinting, coextrusion

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo da bioimpressão e alguns dos principais acontecimentos.....	19
Figura 2 – Tipos de bioimpressão comuns no mercado. ....	19
Figura 3 – Esquema de uma bioimpressão por extrusão direta. ....	22
Figura 4 – Hidrogéis de Alginato/PVA impressos por Wei et al. ....	23
Figura 5 – Impressão de Ni et al. com hidrogéis de SF/HPMC-MA. ....	24
Figura 6 – Aparência dos poros para diferentes valores de <i>printability</i> .....	25
Figura 7 – Mecanismos de coextrusão axial. Em (a) o agente reticulante está no fluxo externo em relação ao filamento de hidrogel. Em (b) o agente de reticulante está no fluxo interno.....	26
Figura 8 – Tipos de bioimpressão de dois materiais. ....	27
Figura 9 – Estrutura utilizada por Hong et al. ....	28
Figura 10 – Sistema utilizado por Li et al. Em (a): sistema utilizado para bioimpressão. Em (b): sistemas de alginato, fibroína de seda (SF) e <i>Pluronic</i> ® F-127 (F-127) com e sem reticulação. Em (c): <i>scaffolds</i> impressos a partir do sistema SF, Alginato, F-127 e $\text{CaCl}_2$ .....	29
Figura 11 - Estudo realizado por Freeman e Kelly (2017) sobre diferentes relações de alginato de sódio e reticulantes.....	30
Figura 12 – Estruturas básicas do alginato. (A) $\beta$ -(1-4)-D-Ácido manurônico. (B) $\beta$ -(1-4)-D-Ácido gulurônico. ....	34
Figura 13 – Estrutura de "caixa de ovos" de alginatos pós-reticulação. No exemplo, utilizou-se $\text{Ca}^{2+}$ como agente reticulante.....	35
Figura 14 – Mecanismo de micelização e gelificação do <i>Pluronic</i> ® F-127 ou Poloxâmero 407 .....	39
Figura 15 – Ensaio reológico do F-127 em Temperatura <i>versus</i> viscosidade ( $\eta$ ) e $G'$ .....	40
Figura 16 – Exemplo do atraso de fase ( $\delta$ ) entre tensão e deformação em líquidos. ....	41
Figura 17 – Tipos de fluidos caracterizados pela relação de tensão de cisalhamento <i>versus</i> taxa de cisalhamento. Ensaio realizado por reologia rotacional. ....	42
Figura 18 – Tipos diferentes de spindles usados em reometria. Em (A) spindle placa-cone, em (B) placa-placa e em (C) cilindros concêntricos.....	43
Figura 19 – Ensaio reológico de alginatos de sódio (4% w/v) à 23 °C, analisando a influência massa molecular na viscosidade. ....	45

Figura 20 – Ensaio reológico realizado por Adhikari <i>et al.</i> .....	46
Figura 21 – Ensaio reológicos realizados por Adhikari <i>et al.</i> (2020). Em (a) curva de viscosidade e tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento. Em (b) ensaio de fluência do fluxo em função do tempo. ....	47
Figura 22 – <i>Scaffolds</i> bioimpressos por Adhikari <i>et al.</i> Em (a) 5% 1%. Em (b) 5% 2%. Em (c) 5% 1% 0,1%. Em (d) 5% 1% 0,4%. Em (e) 5% 2% 0,1%. Em (f) 5% 2% 0,4%..	48
Figura 23 – Bioimpressora inicial utilizada no projeto, indicando os quatro eixos de funcionamento do sistema. ....	50
Figura 24 - Bioimpressora utilizada no sistema com principais peças nomeadas.....	51
Figura 25 – Reômetro HAAKE Viscotester iQ Air e <i>spindle</i> em aleta.....	53
Figura 26 – Alteração da barra transversal para aplicação de duas seringas.....	57
Figura 27 - Barra transversal desmontada .....	57
Figura 28 - Peça inicial do carro de impressão desmontada, produzida em PLA. ....	58
Figura 29 – Peça do carro de impressão reprojeta para sistema de acoplagem simétrica de seringas, produzida em PLA.....	58
Figura 30 – Sistema de duas seringas montado no carro de impressão.....	59
Figura 31 - Sistema de fixação da tubulação.....	59
Figura 32 – Conectores <i>luer-lock</i> em Y e em T. ....	60
Figura 33 – Bico de extrusão produzido para coextrusão, sendo a agulha superior para fluxo interno, e a agulha lateral para fluxo externo dentro do tubo de silicone. Em (A), o sistema bipartido desmontado para visualização. Em (B), o sistema montado e fechado para uso. ....	60
Figura 34 – Análise de variáveis de impressão. Diâmetro do filamento e largura de extrusão fixos. Velocidade Prusa (velocidade do software) variável.....	63
Figura 35 – Análise de variáveis de impressão. Velocidade Prusa (software) e largura de extrusão fixos. Diâmetro do filamento variável. ....	64
Figura 36 – Análise de variáveis de impressão. Velocidade Prusa (software) e diâmetro do filamento fixos. Largura de extrusão variável. ....	65
Figura 37 – Biompressão teste utilizando poloxâmoro 407 em 20% em peso.....	66
Figura 38 – Ensaio em reometria oscilatório de viscosidade x temperatura 60 °C – 5°C – 60°C de alginato de sódio 2% em peso.....	68
Figura 39 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade x temperatura 60 °C – 5°C – 60°C de alginato de sódio 4% em peso.....	69

Figura 40 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade x temperatura 5 °C – 60°C – 5°C de poloxâmero 407 18% em peso.....	70
Figura 41 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade x temperatura 5 °C – 60°C – 5°C de poloxâmero 407 20% em peso.....	71
Figura 42 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade em função da frequência para Poloxâmero 20% em peso, ensaiado a 20°C. ....	72
Figura 43 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade em função da frequência para Poloxâmero 20% em peso, ensaiado a 35°C. ....	72
Figura 44 – Filamento produzido manualmente com sistema de seringas em T.....	74
Figura 45 – Bolha presente na mistura de alginato/CaCl <sub>2</sub> em tentativa de bioimpressão 3D. .	75
Figura 46 – Filamento produzido utilizando o bico de coextrusão projetado e construído, acionando as seringas manualmente.....	75
Figura 47 – Projeto da seringa de coextrusão. Em (A), vista isométrica noroeste. Em (B) vista isométrica nordeste. Em (C) vista frontal. ....	86
Figura 48 - Desenho da seringa de dois reservatórios. Em (A), a vista isométrica noroeste. Em (B), a vista frontal. Em (C) a vista lateral com corte C-C. ....	87
Figura 49 - Esquema de fluxos internos e externos na seringa de coextrusão .....	87
Figura 50 – Desenho do êmbolo de dois reservatórios. Em (A), a vista isométrica noroeste. Em (B), a vista frontal com corte B-B. Em (C) a vista frontal com corte C-C. Em (D) a vista lateral com corte D-D.....	88
Figura 51 - Montagem do sistema de seringa de coextrusão com êmbolo duplo.....	88
Figura 52 – Nomenclatura das dimensões da seringa de coextrusão .....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparativos entre os tipos de bioimpressão 3D.....	20
Tabela 2 – Propriedades importantes para scaffolds. ....	21
Tabela 3 – Análise dos tipos de bioimpressão por extrusão.....	26
Tabela 4 – Estudo sobre a relação de gramas de alginato por cada grama de cálcio. Células destacadas são aquelas utilizadas pelos autores para bioimpressão.....	30
Tabela 5 – Dificuldades encontradas na bioimpressão de alginato reticulado com $\text{Ca}^{2+}$ .....	37
Tabela 6 - Condições de ensaio reológico para poloxâmoro 407 e alginato de sódio em reometria oscilatória. ....	54
Tabela 7 – Condições de ensaio para ensaio de viscosidade em função da frequência de oscilação em deformação controlada (CD).....	54
Tabela 8 – Condições de impressão. ....	55
Tabela 9 - Dados da análise de relação de vazão teórica das seringas utilizadas.....	61
Tabela 10 – Estudo de relações mássicas para soluções de alginato 4% em peso e $\text{CaCl}_2$ 5% em peso, .....	62
Tabela 11 – Vazão calculada para cada seringa utilizando $v = 1 \text{ mm/s}$ . ....	66
Tabela 12 – Análise de vazões em sistemas de duas seringas.....	67
Tabela 13 – Análise de dimensões e vazões da seringa de coextrusão. Valores em destaque são aqueles onde a relação é maior que 25:9 (2,777...).....	90

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

TE	Engenharia de Tecidos
MR	Medicina Regenerativa
MA	Manufatura Aditiva
<i>CAD</i>	<i>Computer Aided Design</i>
<i>FDM</i>	<i>Fused Deposition Modeling</i>
<i>SLA</i>	Estereolitografia
<i>EBB</i>	<i>Extrusion Based Bioprinting</i>
<i>DIW</i>	<i>Direct Ink Writing</i>
PVA	Álcool Polivinílico
SF	Fibroína de Seda
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
EC	Etil-Celulose
MC	Metil-Celulose
MAc	Metacrilada
<i>Pr</i>	<i>Printability</i>
F-127	<i>Pluronic F-127</i> ® ou Poloxâmero 407
PLA	Poli(ácido láctico)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1	BIOIMPRESSÃO 3D .....	18
3.1.1	Bioimpressão por extrusão .....	21
3.1.2	Mecanismos alternativos de bioimpressão por extrusão .....	25
3.2	HIDROGÉIS .....	31
3.2.1	Hidrogéis naturais .....	32
3.2.2	Hidrogéis de alginato .....	33
3.2.3	Poloxâmero ou <i>Pluronic</i> ® .....	38
3.3	REOLOGIA E REOMETRIA .....	40
3.3.1	Reologia em hidrogéis .....	44
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
4.1	MATERIAIS .....	49
4.2	PREPARAÇÃO DE MISTURAS .....	49
4.3	BIOIMPRESSORA .....	49
4.3.1	Estudo da vazão e variáveis de impressão .....	51
4.4	ANÁLISE REOLÓGICA .....	52
4.5	BIOIMPRESSÃO 3D .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
5.1	REPROJETO DA BIOIMPRESSORA .....	56
5.2	ESTUDO DOS HIDROGÉIS .....	61
5.3	ESTUDO DAS VARIÁVEIS DE IMPRESSÃO .....	62
5.4	PROTOTIPAGEM DO SISTEMA DE COEXTRUSÃO .....	67
5.5	ANÁLISE REOLÓGICA DOS HIDROGÉIS .....	67
5.6	REPROJETO DA BIOIMPRESSORA 3D .....	73

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES DE APERFEIÇOAMENTOS E TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICE A – SERINGA DE COEXTRUSÃO.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos (ET) e a medicina regenerativa (MR) caminham juntas se aplicando os princípios de engenharia e das ciências biológicas para o desenvolvimento de estruturas biológicas as quais podem restaurar, manter, ou até otimizar as funções de um determinado tecido ou de todo um órgão <sup>[1]</sup>.

A manufatura aditiva (MA) redirecionou a engenharia, medicina, biomedicina, arquitetura etc. <sup>[2]</sup>. Dentro da medicina e da biomedicina, a manufatura aditiva é normalmente referenciada como a deposição de camadas de biotintas com células vivas, focando no desenvolvimento de órgãos funcionais dentro da engenharia de tecidos <sup>[3]</sup>.

A “biomanufatura” aditiva pode ser realizada por extrusão, *inkjet*, laser e estereolitografia, mas a bioimpressão 3D (*3DBP*) por extrusão é a técnica mais empregada <sup>[4]</sup>. A grande justificativa para o uso da impressão 3D por extrusão é a sua simplicidade e diversidade de produção de *scaffolds* de geometrias complexas e personalizáveis. O grande desafio dessa técnica está na viabilidade dos materiais usados <sup>[5]</sup>.

As técnicas de bioimpressão 3D variam para cada necessidade, mas o sistema mais comum dentre as técnicas é o sistema de bioimpressão 3D por extrusão. Esse sistema, além do mecanismo comum utilizado com os hidrogéis otimizados para tal mecanismo, possui variações que permitem alterações gerais no sistema, como bioimpressão em mistura, extrusão coaxial e outras técnicas.

Apesar da versatilidade dos processos de bioimpressão por extrusão, este processo requer o uso de hidrogéis com características reológicas muito específicas e, geralmente, de baixo custo. Surge assim a necessidade de adequação de sistemas de hidrogéis por processos isolados ou aliados ao sistema de bioimpressão,

Assim, este trabalho propõe a adaptação e estudo de uma bioimpressora 3D de funcionamento híbrido entre uma seringa, ou duas seringas em extrusão coaxial de polímero e agente reticulante.

## 2 OBJETIVOS

Como objetivo geral, este trabalho foca em desenvolver adaptações em uma bioimpressora convencional de baixo custo para torná-la uma bioimpressora com mecanismo de extrusão coaxial, variando conforme a necessidade de cada uso. As peças foram produzidas por impressão 3D por FDM em PLA, objetivando um produto mais barato que não exija hidrogéis em materiais focados em bioimpressão 3D que, em suma maioria, são de baixa disponibilidade e, exponencializado pelo uso médico, de elevado custo.

O objetivo específico do trabalho é desenvolver o sistema que permita a bioimpressão convencional com uma seringa ou o sistema de extrusão dupla, validando a utilidade do sistema com hidrogéis mais simples, sem a necessidade de complexos sistemas de hidrogéis para acerto reológico.

Outro objetivo específico é estudar a validação do sistema a partir de sistemas de hidrogéis com diferentes características reológicas, seja para extrusão simples de uma seringa ou de coextrusão, diferentes sistemas com diferentes condições de bioimpressão.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Este tópico apresenta uma revisão bibliográfica que trará os pontos importantes para o desenvolvimento do trabalho, abordando o processamento por bioimpressão 3D, hidrogéis e reologia e reometria dos materiais.

#### 3.1 BIOIMPRESSÃO 3D

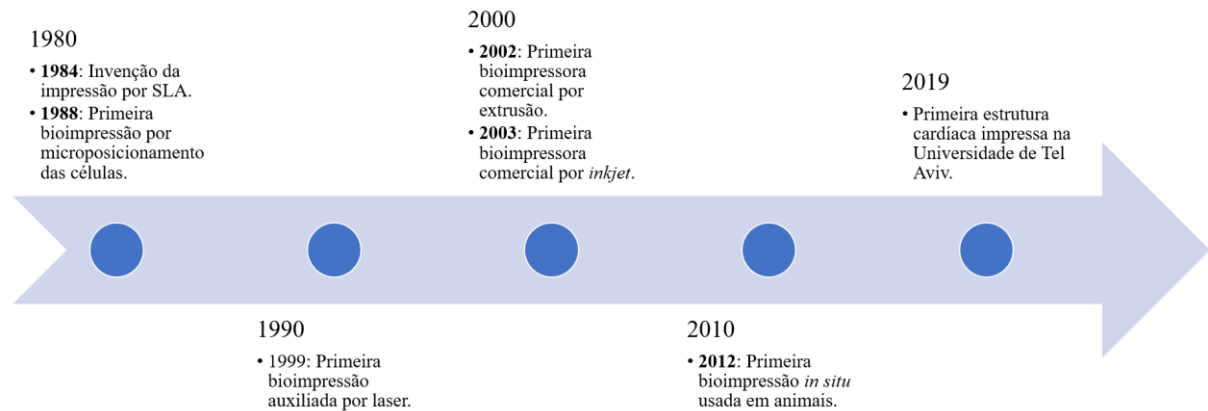
A manufatura aditiva (MA), popularmente chamada de “impressão 3D”, é um processo de produção de peças tridimensionais a partir de modelos em *CAD (Computer Aided Design)*. As peças são produzidas adicionando material em camadas e as empilhando a fim de formar uma estrutura cada vez mais semelhante à estrutura projetada. Inicialmente o processo de MA foi projetado e desenvolvido para materiais poliméricos, ceras e laminados de papel. Com o desenvolvimento das novas tecnologias, novos materiais começaram a ser usados na MA. Atualmente todas as grandes classes de materiais, como metais, polímeros, cerâmicos e compósitos já possuem processos de MA [6].

Cada processo de MA possui suas respectivas variáveis, sendo que a física da MA traz a espessura de camada como o principal fator de reprodutibilidade: quanto mais fina é a camada, mais reprodutivo é a peça em relação ao projeto. Na aplicação real, as camadas possuem espessura finita, baseada em décimos de milímetros [6].

A primeira aparição de um mecanismo de MA surgiu em 1984 quando Charles Hull inventou a esterolitografia (SLA) [7]. Em 1988, o primeiro projeto de bioimpressão 3D foi demonstrado por Klebe (1988). Ao usar uma impressora do tipo *inkjet* da *Hewlett-Packard* (HP), o autor realizou o primeiro processo de bioimpressão 3D por deposição de células, usando a tecnologia “citoescrita” [8].

Posteriormente, Odde e Renn, utilizaram um sistema de bioimpressão assistida por laser para depositar células vivas em análogos anatômicos [9]. Em 2002, a primeira bioimpressão por extrusão (*Extrusion Based Bioprinting – EBB*) foi reportada, nomeada posteriormente de “*3D-Bioplotter*” [7,10]. Wilson e Boland, desenvolveram a primeira bioimpressora do tipo *inkjet* focada em bioimpressão, utilizando uma impressora *inkjet* padrão da empresa *Hewlett-Packard* (HP) [11].

Figura 1 – Linha do tempo da bioimpressão e alguns dos principais acontecimentos.

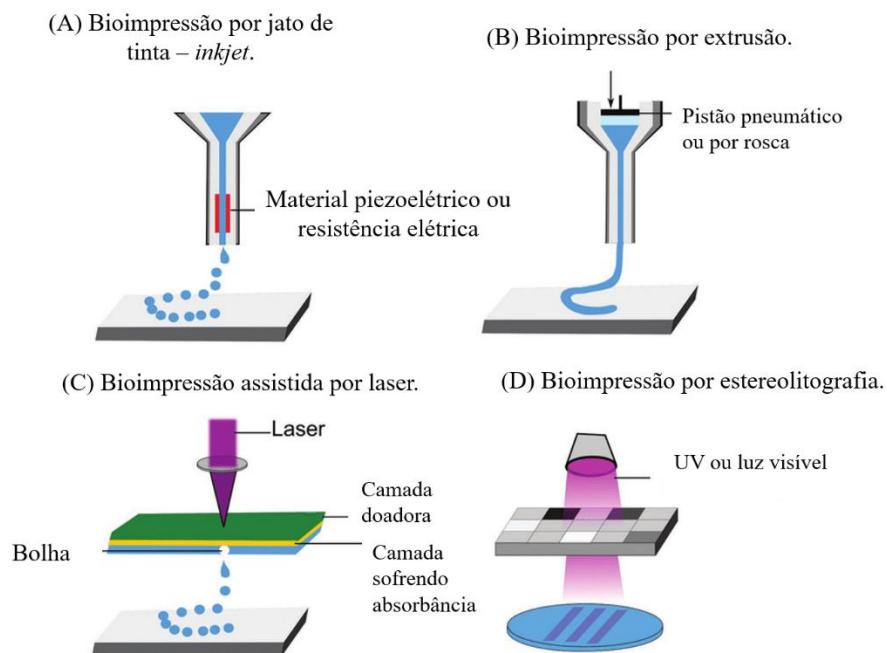


Fonte: Adaptado de Gu <sup>[7]</sup>.

Skardal, *et al.*, realizaram a primeira tentativa de bioimpressão *in situ* em modelos de ratos <sup>[12]</sup>. A partir de 2012, as evoluções no ramo da bioimpressão geraram diversos produtos baseados em bioimpressão. Noor *et al.*, realizaram a impressão de corações humanos perfusionados em escalas menores <sup>[13]</sup>.

Dentre os tipos de impressora 3D existentes, as impressoras por estereolitografia (SLA), bioimpressão auxiliada por laser, bioimpressão por jato de tinta (*inkjet*) e bioimpressão por extrusão (EBB), como mostradas na Figura 2:

Figura 2 – Tipos de bioimpressão comuns no mercado.



Fonte: Adaptado de Foyt *et al.* <sup>[14]</sup>.

Argwal *et al.*, apresentaram em sua revisão um comparativo entre os tipos de bioimpressões, materiais envolvidos e suas vantagens e desvantagens, apresentado na Tabela 1 [15].

Tabela 1 – Comparativos entre os tipos de bioimpressão 3D.

Estratégias de bioimpressão 3D	Biomateriais envolvidos	Vantagens	Desvantagens
Bioimpressão por <i>inkjet</i>	Colágeno, trombina, fibrinogênio, poli (etilenoglicol) dimetacrilado (PEGDMA)	Acessível, baixo custo e alta velocidade de impressão	Baixa precisão, restrição de biotintas de baixa viscosidade
Bioimpressão por extrusão	GelMA, alginato, fibras de PLA, ácido hialurônico, gliceron, fibrinogênio, poliuretano, colágeno	Biotintas de alta viscosidade podem ser utilizadas com alta concentração celular	A rede celular pode distorcer pela tensão aplicada durante a impressão
Bioimpressão assistida por laser	Colágeno, nano-hidroxiapatita (nHA), folhas de células ósseas humanas	Elevada precisão e resolução	Elevado custo de equipamento e elevado tempo de preparação e produção
Bioimpressão por estereolitografia	PEGDA, GelMA, GelMA e nHA	Baixo tempo de fabricação e elevada precisão	Necessidade de processamento posterior longo, processamento complicado

Fonte: Adaptado de Argwal *et al.* [15].

Assim, para a bioimpressão 3D, algumas propriedades físicas, mecânicas e biológicas são necessárias e adaptativas para a bioimpressão 3D de *scaffolds* em diversos níveis: geometria, propriedades superficiais, tamanho de poro, bioaderência e biocompatibilidade, taxa de biodegradação/bioabsorção e propriedades mecânicas. A Tabela 2 apresenta as propriedades mais importantes para a bioimpressão de *Scaffolds*:

Tabela 2 – Propriedades importantes para scaffolds.

<b>Nível de propriedade</b>	<b>Propriedades</b>
Geometria Externa	Micro e macro estrutura, conectividade
Superficial	Tensão superficial, superfície química, carga, topologia, área
Porosidade	Distribuição de poros, geometria, volume, rugosidade, rede
Bioaderência	Integrina extracelular, proteínas citoesqueléticas
Taxa de biodegradação	Dragradção em fluidos corporais, buffers, média celular, enzimas, taxa de degradação
Biocompatibilidade	Não-(toxicidade, imunogênico, carginogênico), anti-trombótico, compatível, vasoativo
Mecânicas	Rigidez, propriedades à tração, compressão, cisalhamento, torção, dobramento, fadiga, propriedades viscoelásticas

Fonte: Adaptado de Holban e Grumezescu <sup>[16]</sup>.

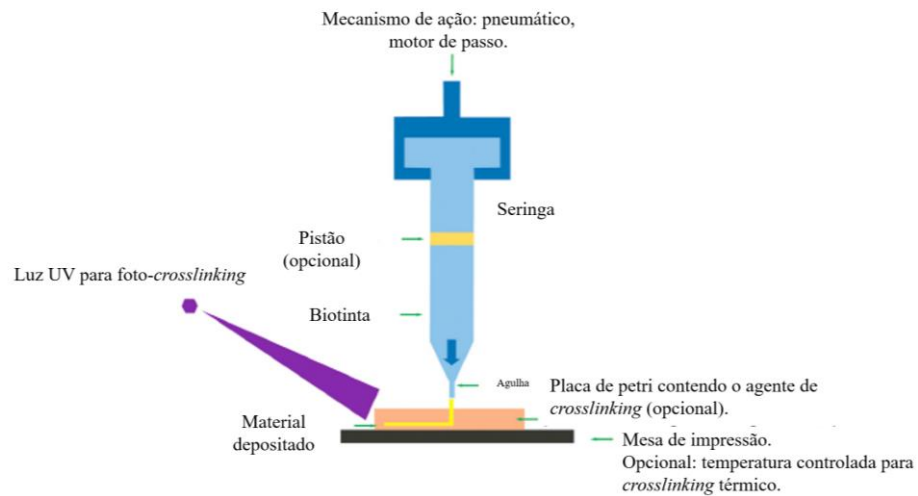
Compreender e correlacionar todos estes aspectos em um sistema para aplicações biológicas se torna essencial para o funcionamento correto da bioimpressão 3D, assim focando os pontos cruciais e necessários para cada aplicação em cada propriedade específica

### 3.1.1 Bioimpressão por extrusão

A bioimpressão por extrusão apresenta algumas técnicas diferentes, como a extrusão por deposição direta (*Direct Ink Writing – DIW*), banho coagulante, banho de suporte e bioimpressão coaxial <sup>[17]</sup>.

A técnica de bioimpressão por extrusão (Figura 3), também conhecida como deposição direta, é um processo pelo qual o equipamento aplica continuamente o hidrogel ou biotinta contidos em uma seringa, especial ou não. Essa técnica pode ser utilizada para a impressão de biotintas carregadas com células ou apenas o hidrogel. Conforme a deposição de material ocorre a cada camada, a estrutura 3D arquitetada adquire a geometria projetada <sup>[15]</sup>.

Figura 3 – Esquema de uma bioimpressão por extrusão direta.



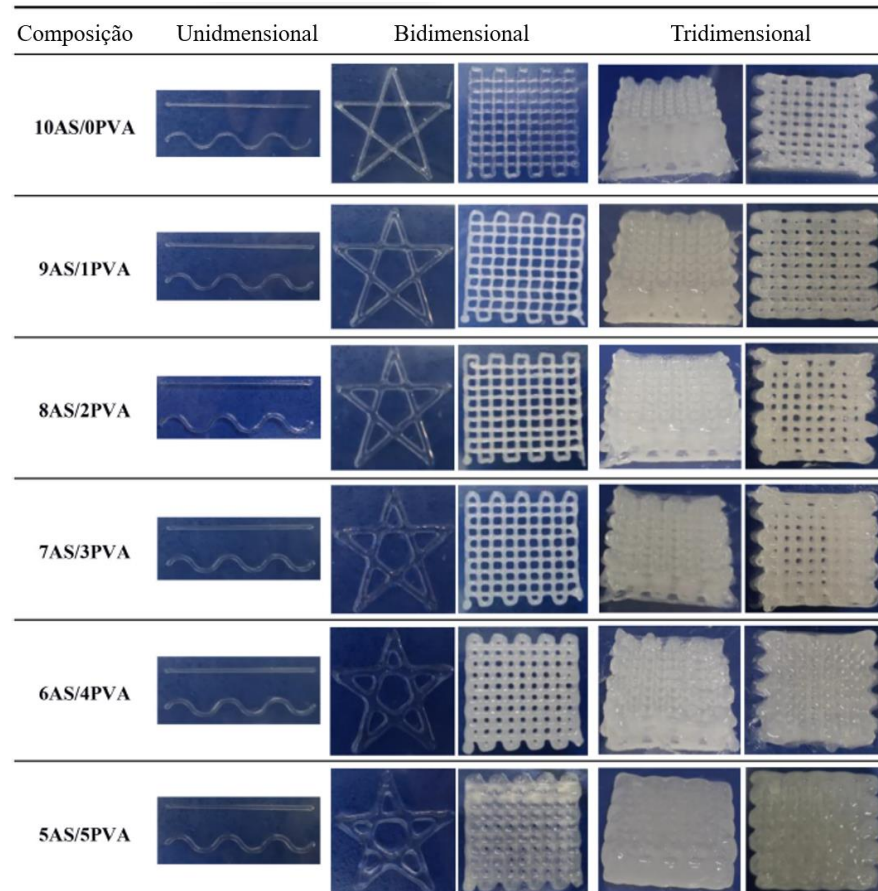
Fonte: Adaptado de Agarwal *et al.* [15].

Os hidrogéis e as biotintas utilizadas para a bioimpressão 3D por extrusão devem possuir certas características reológicas. O material deve ser de característica *shear-thinning* – ou pseudoplásticos – para permitir a extrusão do material pela seringa ou agulha. Durante a deposição, o material deve adquirir rigidez estrutural para que este se mantenha sustentado em seu próprio peso. Para que o fluido não escoe pela ação do próprio peso, é necessária uma tensão de escoamento ( $\tau_0$ ) [15, 18].

Algumas técnicas de solidificação, polimerização reticulação (formação de *crosslinking*) são utilizadas para a versatilidade dos processos de bioimpressão, durante ou posterior ao processo, como a solidificação por UV, impressão em banho de suporte e a solidificação por mecanismos térmicos [15].

Wei *et al.*, realizaram a análise de hidrogéis com diversas composições de alginato de sódio e álcool polivinílico (PVA), com dois tipos de reticulação diferentes em um mesmo hidrogel: o alginato passou por imersão em cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), sendo um processo de reticulação químico. O mecanismo utilizado no PVA foi por *Freezing-Thawing* um processo de reticulação por ciclos de resfriamento. Neste trabalho, colocou-se os scaffolds impressos a -20 °C por 24 horas e completou-se o ciclo a temperatura ambiente por 3 horas, sendo este ciclo repetido 3 vezes [19].

Figura 4 – Hidrogéis de Alginato/PVA impressos por Wei *et al.*



Fonte: Adaptado de Wei *et al.* [19].

Ni *et al.*, estudaram a bioimpressão de scaffolds de fibroína de seda (SF) com hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) modificada com metacrilato (MAc), gerando um hidrogel que adquire reticulação por ação de radiação UV. Os autores utilizaram uma luz UV anexada ao processo para realizar a reticulação da HPMC-MA durante a impressão do scaffolds. Assim os autores fizeram a bioimpressão presente na Figura 5 [20]:

Figura 5 – Impressão de Ni et al. com hidrogéis de SF/HPMC-MA.



Fonte: Ni *et al.* [20].

Um dos conceitos mais comumente utilizados em manufatura aditiva é de “*Printability*” (em tradução livre: “*printability*”, adaptado para “capacidade de impressão”). A “*printability*” é a capacidade do material de manter formas reprodutíveis em relação ao modelo montado pelos sistemas de *CAD/CAM*, sendo fidelidade de forma, dimensões, estrutura do material, fluxo do material e acabamento superficial. No processo de bioimpressão 3D, esse fator se torna mais crucial, pois a *printability* afeta diretamente a estrutura e desempenho dos *scaffolds* [21].

Dentro da bioimpressão 3D, alguns cálculos matemáticos podem ser utilizados para determinar os fatores de *printability* de um *scaffold*. O Fator de Integridade (I) é o fator que determina a fidelidade de forma do *scaffold* impresso, definido pela equação 1. A *Printability* do Poro (Pr) é definida pela equação 2, conforme Jongprasitkul *et al.* [22]:

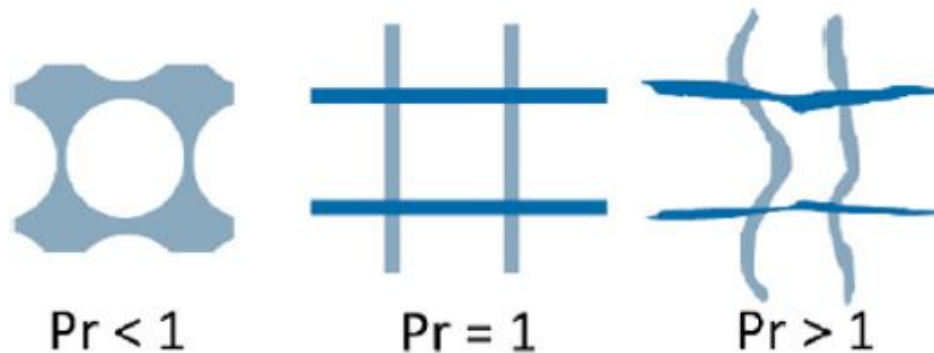
$$I = \frac{\text{Espessura do Scaffold Real}}{\text{Espessura do Scaffold Teórica}} \quad (1)$$

$$Pr = \frac{\pi}{4 \cdot C} = \frac{L^2}{16 \cdot A} \quad (2)$$

Onde “espessura do *scaffold* real” sendo a altura final do *scaffold* real e a teórica é aquela definida pelo desenho CAD inicial. Sendo, além, C a circularidade do poro; L sendo o comprimento do poro; A sendo área do poro [22].

Quanto maior a *printability* de um sistema, mais próximo de 1 é o valor “Pr”. Para valores de “Pr” próximos de 1, o poro do preenchimento em rede (ou grade) se torna mais próximo do desenho teórico. Para valores menores que 1, o poro se torna um círculo, principalmente pelo acúmulo de material nas intersecções de deposição de material. Já para valores acima de 1, os poros não possuem uma geometria definida, onde a deposição de material não segue as linhas programadas no fatiamento [22].

Figura 6 – Aparência dos poros para diferentes valores de *printability*.



Preenchimento em rede

Fonte: Adaptado de Jongprasitkul *et al.* [22].

### 3.1.2 Mecanismos alternativos de bioimpressão por extrusão

Diferentes técnicas de bioimpressão por extrusão são aplicadas para diferentes tipos de produtos. A bioimpressão em banho coagulante consiste em fazer a deposição do hidrogel em um banho com o agente responsável pela gelificação do hidrogel em questão. Já a bioimpressão em banho de suporte consiste em utilizar um banho de material pseudoplástico (*shear-thinning*) que sustente o material impresso em sua forma depositada [17].

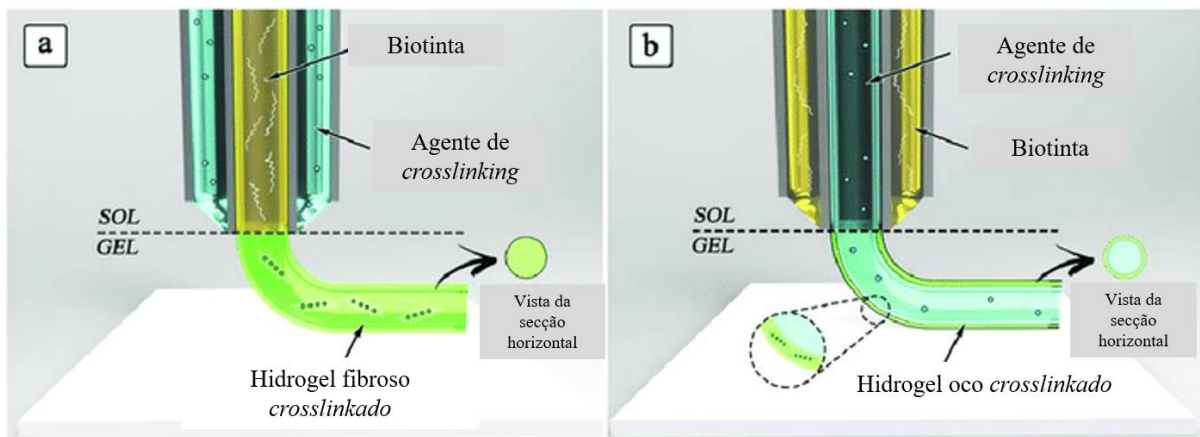
Tabela 3 – Análise dos tipos de bioimpressão por extrusão.

Técnica	Biotintas utilizadas	Vantagens	Desvantagens
Impressão direta (DIW)	Soluções com elevada concentração, aditivos plastificantes, hidrogéis parcialmente gelificados	Processo simples, elevada repetibilidade	Morte celular pela pressão de impressão, densidade do hidrogel pode impedir migração celular, necessita otimização complexa para começar o processo
Banho de coagulação	Biotintas líquidas com transição sol-gel rápida	Variedade na composição da biotinta	Turbulência local pode diminuir a printabilidade, elevada variação da fluviabilidade, necessita de aditivos que sofram <i>crosslinking</i>
Banho de suporte	Biotintas líquidas de diversas composições, suspensão celular	Variedade na composição da biotinta	Alta rugosidade superficial, complicações ao remover a peça do banho
Bioimpressão coaxial	Biotintas líquidas com rápida transição sol-gel	Variedade na composição da biotinta	Necessidade de aditivos que sofram <i>crosslinking</i>

Fonte: Adaptado de Costantini *et al.* [17].

As bioimpressões coaxiais foram surgindo como uma forma de mimetizar a coextrusão de polímeros comuns industriais, produzindo filamentos com gradientes de composição, ou estruturas mais complexas como filamentos com núcleo e superfície distintas. A grande variável deste processo se dá pelo mecanismo de extrusão coaxial, conforme a Figura 7 [17]:

Figura 7 – Mecanismos de coextrusão axial. Em (a) o agente reticulante está no fluxo externo em relação ao filamento de hidrogel. Em (b) o agente de reticulante está no fluxo interno.



Fonte: Adaptado de Costantini *et al.* [17].

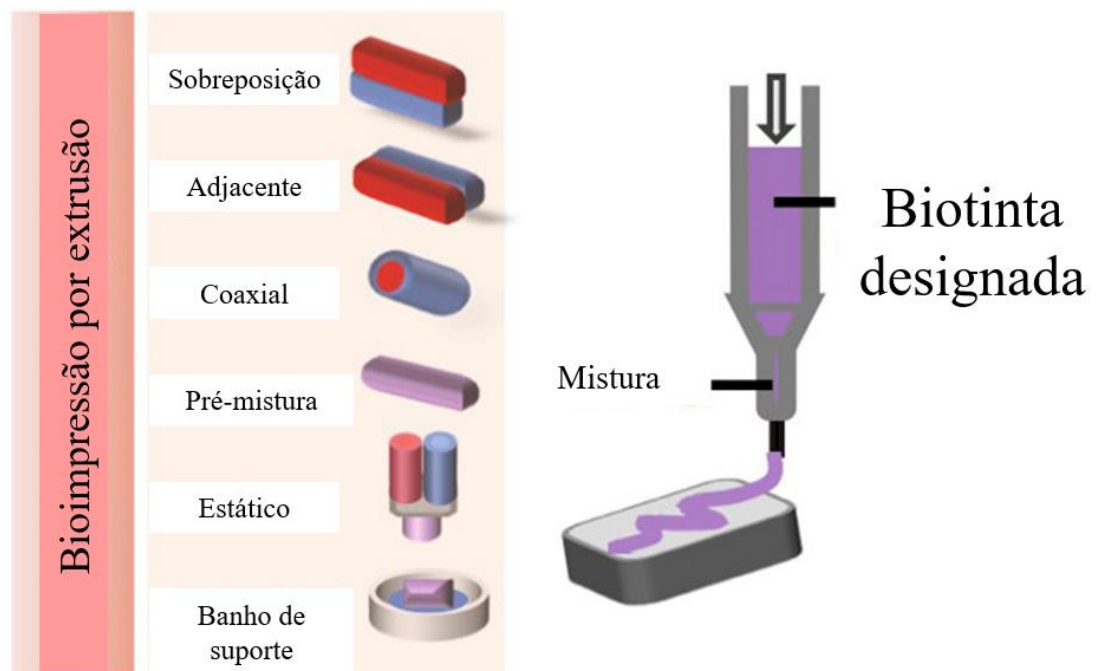
A diferença entre os fluxos de deposição mostrados na Figura 7 está no tipo de hidrogel formado. Em (a) o *crosslinking*/reticulação se inicia no perímetro da biotinta depositada, solidificando a estrutura em um gradiente externo-interno, formando um filamento mais rígido, menos viscoso e mais coerente. Já em (b), a reticulação ocorre em direção oposta, sendo que o interior da biotinta sofre o processo primeiro do que a camada externa, formando, portanto, uma

camada externa com vascularização; portanto forma-se um filamento com gradiente de rigidez e viscosidade [17].

Utilizar dois materiais durante a bioimpressão é uma prática comum para ajuste reológico, controle de vascularização, permeabilidade, estrutura, produção de produtos finalizados, gradientes de composição entre outras aplicações [23].

Pode-se realizar a impressão por sobreposição para gerar camadas de materiais diferentes, ou bioimpressão adjacente para gerar gradientes em uma mesma camada. A bioimpressão com pré-mistura é realizada para impressões de hidrogéis com reticulação prévia, principalmente pela sua reologia mais próxima do ideal para o processo. Já o processo de bioimpressão estático é utilizado de forma similar ao processo de pré-mistura, mas este ocorre com o agente de reticulante em um compartimento e o hidrogel que irá ser reticulado em outro, com o objetivo de misturá-los imediatamente antes da deposição do material no substrato [23].

Figura 8 – Tipos de bioimpressão de dois materiais.



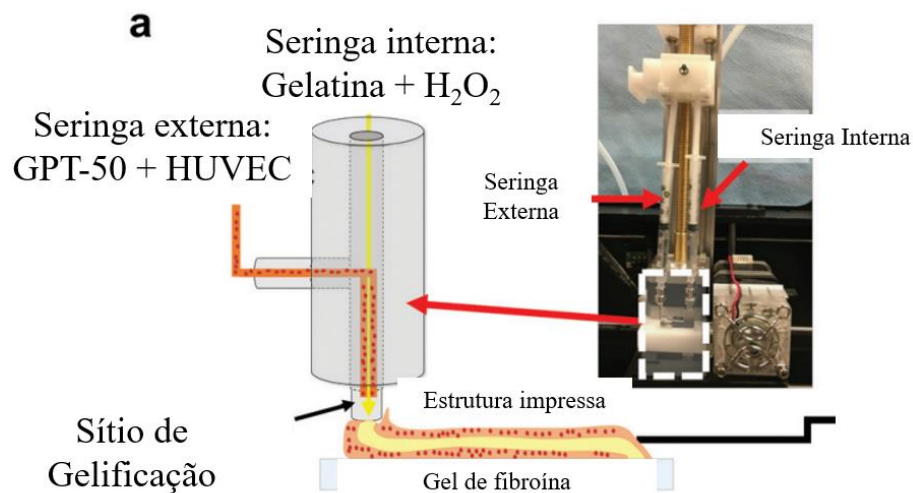
Fonte: Adaptado de Mueller et al. (2022) [23].

Os mecanismos de bioimpressão por extrusão coaxial com o agente reticulantes no fluxo externo geram, em forma macroscópica, efeitos similares com hidrogéis praticamente finalizados, com a reologia destes otimizada para o processo.

Hong *et al.*, trabalharam a bioimpressão coaxial como forma de gerar estruturas vascularizadas com perfusão de nutrientes e oxigênio entre as camadas. Os autores utilizaram

um sistema de bioimpressão coaxial por seringas e um sistema que unisse as duas vazões ao final, sendo que o filamento impresso possuía um núcleo de Gelatina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uma camada externa de GPT-50 (Hidrogel de gelatina + poli (etilenoglicol) + tiramina) + HUVEC (uma estrutura celular). A ideia dos autores era a gelificação do sistema GPT-50 a partir da incorporação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, resultando em um sistema quase finalizado [24].

Figura 9 – Estrutura utilizada por Hong et al.



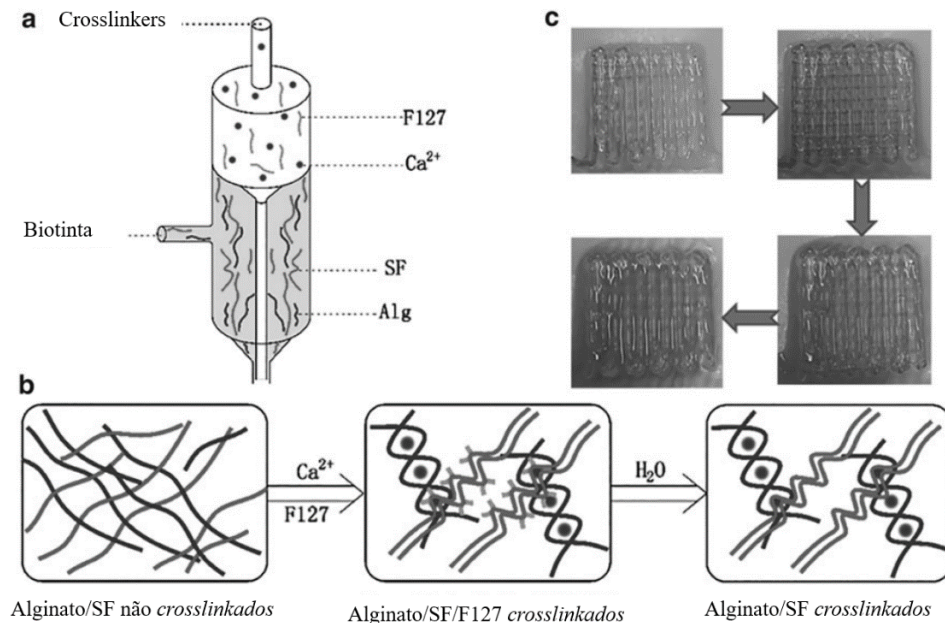
Fonte: Adaptado de Hong *et al.* [24].

Hong *et al.*, produziram modelos funcionais vascularizados de tecidos *in vitro* para o estudo farmacêutico de modelamento de drogas e produtos cosméticos. A proposta foi confirmada pela extrusão coaxial por sistemas com gradientes de composição [24].

Li *et al.*, também produziram um sistema vascularizado para estudos *in vitro* [25], com um sistema parecido com o sistema utilizado por Hong *et al.* [24]. O uso de duas seringas, sendo a primeira com a biotinta composta por alginato de sódio (5% w/v) e fibroína de seda (SF – 5% w/v), e a segunda com os respectivos agentes reticulantes (CaCl<sub>2</sub> 5% w/v e 13% w/v), resultou em *scaffolds* em estado quase-final, sem a necessidade de processamento posterior para finalização do *scaffold* [25].

Figura 10 – Sistema utilizado por Li et al. Em (a): sistema utilizado para bioimpressão. Em (b): sistemas de alginato, fibroína de seda (SF) e *Pluronic*® F-127 (F-127) com e sem reticulação.

Em (c): *scaffolds* impressos a partir do sistema SF, Alginato, F-127 e  $\text{CaCl}_2$ .

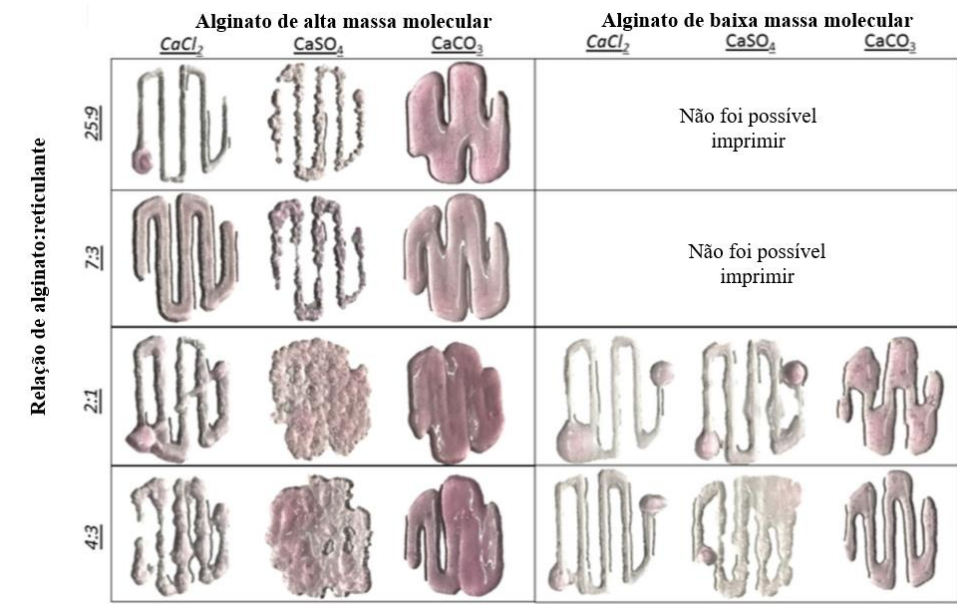


Fonte: Adaptado de Li *et al.* [25].

O estudo de Li *et al.* trouxe o sistema de rede dupla (*double-networking*), onde os dois materiais presentes na biotinta sofrem a reticulação e se estabilizam: o alginato é gelificado pela presença de  $\text{CaCl}_2$  e a fibroína de seda pela presença do *Pluronic*® F-127 (ou poloxâmero 407) [24].

O trabalho de Freeman e Kelly, estudou diferentes proporções de alginato de sódio e  $\text{CaCl}_2$  em pré-mistura para bioimpressão e análise das amostras bioimpressa. Freeman e Kelly, estudaram a *printability* de diferentes relações de alginato de sódio e reticulantes à base de sais de cálcio. Os autores produziram sistemas pré-reticulados a partir de soluções de alginato de sódio em 3,5% em peso (3,5 g para cada 100 mL). Os sais foram analisados em soluções de 80 mM. As proporções encontradas por Freeman e Kelly serão utilizados como análise de vazões em todas as propostas deste trabalho [26].

Figura 11 - Estudo realizado por Freeman e Kelly sobre diferentes relações de alginato de sódio e reticulantes.



Fonte: Adaptado de Freeman e Kelly [26].

Freeman e Kelly, concluíram que as amostras de alginato de sódio de baixa massa molecular só seriam possíveis de serem bioimpressos com elevadas taxas de reticulantes. Segundos os autores, as amostras de alginato de alta massa molecular foram otimizadas ao serem reticuladas em  $CaCl_2$  em proporção 25:9 (2,777...), enquanto o alginato de baixa massa molecular obteve melhor resultado com  $CaCl_2$  em proporção 4:3 (1,333...) [26].

Assim, a partir do estudo de Freeman e Kelly, a relação de partes de alginato para cada íon cálcio presente em cada possibilidade de mistura é apresentada a seguir [26]:

Tabela 4 – Estudo sobre a relação de gramas de alginato por cada grama de cálcio. Células destacadas são aquelas utilizadas pelos autores para bioimpressão.

Relação de misturas de Freeman e Kelly (2017) (Assumindo 1 parte como 100 mL) [mAlg/mCa]					
		Partes da solução de Crosslinker			
		1	3	4	9
Partes da solução de Alginato	2	29,167	9,722	7,292	3,241
	4	58,333	19,444	14,583	6,481
	7	102,083	34,028	25,521	11,343
	25	364,583	121,528	91,146	40,509

Fonte: Autor, Adaptado de Freeman e Kelly [26].

### 3.2 HIDROGÉIS

Hidrogéis são uma classe de materiais com *crosslinking*/reticulação capazes de absorver e reter elevadas quantidades de água, sendo eles naturais (agarose, colágeno, alginato, fibrina, quitosana, agar, ácido hialurônico, gelatina) ou sintéticos (gelatina metacrilada – GelMA, PEG, PLA, *Pluronic*® F-127). Ressalta-se que as propriedades físicas, mecânicas, térmicas e reológicas dos hidrogéis variam conforme sua concentração [16].

Os hidrogéis, tanto naturais quanto sintéticos, oferecem uma gama de aplicações para a engenharia de tecidos, *drug delivery*, lentes de contato e curativos por suas propriedades químicas e físicas. Hidrogéis podem absorver acima de 1000 vezes seu próprio peso em água, sem se dissolver completamente, mantendo a permeabilidade de oxigênio e nutrientes dissolvidos em água, componentes essenciais para crescimento celular. Os hidrogéis naturais normalmente não são resistentes o suficiente para a bioimpressão, enquanto os sintéticos são suficientemente resistentes, mas estes não possuem moléculas bioativas, resultando em baixa adesão celular para aplicações como curativos, *scaffolds* e outros [27].

Os mecanismos de reticulação podem ser divididos em reticulação física, química, fotopolimerização e enzimática [16]:

A reticulação **física** é um tipo de *crosslinking* que pode ser reversível ou não. Este mecanismo ocorre com a presença de íons, pontes de hidrogênio, estereocomplexação, assimilação de peptídeos e/ou organização micelar das cadeias poliméricas, assim a vantagem deste processo é que pode ocorrer sem agentes exógenos, evitando contaminação. Agarose, alginato, matrigel e *Pluronic*® (poloxâmero) são os hidrogéis de *crosslinking* físico mais utilizados na bioimpressão 3D [28].

A reticulação **química** ocorre pelas ligações químicas covalentes entre as macromoléculas dos polímeros, conferindo melhor estabilidade química e mecânica do que o mecanismo físico. Este mecanismo envolve agente exógenos como glutaraldeído e genipin, além de fotoinicializadores para reagir por radiação. A concentração de *crosslinks* é definida pela quantidade de agente reticulante utilizado, de forma que concentração é proporcional à resistência mecânica e inversamente proporcional à taxa de degradação do material. A taxa de liberação de fármacos, fatores de crescimento e outras propriedades biológicas são inversamente proporcionais a concentração de *crosslinks*. Os polímeros mais comuns nesta classe são gelatina, colágeno, quitosana e fibrina [16, 29].

A **fotopolimerização** é um mecanismo de produção de hidrogéis a partir de um agente fotoinicializador na qual gera espécie excitada por radiação luminosa. O material base utilizado

são monômeros e oligômeros de baixa massa molecular que sofrem a cura e geram a rede polimérica com reticulação, podendo controlar as propriedades do hidrogel por meio da intensidade e tempo de exposição à radiação. Os hidrogéis normalmente utilizados em bioimpressão 3D não são fotopolimerizáveis sem a ação de um agente fotoinicializador. Poli(etilenoglicol) (PEG) e gelatina metacrilada são os materiais mais comumente utilizados em bioimpressão [16].

A reticulação **enzimática** se aplica aos hidrogéis compostos por fibrina, onde são tratados com trombina. No caso das gelatinas, utiliza-se a transglutaminase, que catalisa a formação de ligações isopeptídicas. Em ambos os casos, as enzimas são dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  para realizarem esse mecanismo [16].

### 3.2.1 Hidrogéis naturais

Agarose, alginato, quitosana, celulose, fibrina, gelatina, colágeno, ácido hialurônico e matrigel são apenas algumas matérias-primas naturais que formam os hidrogéis naturais. Por serem obtidos de fontes naturais, são utilizados por sua biocompatibilidade, biofuncionalidade e baixa citotoxicidade, criando interações celulares específicas, porém as propriedades mecânicas limitadas reduzem a aplicação destes hidrogéis isolados. Em contraponto, os hidrogéis artificiais possuem *printability* e propriedades mecânicas adequadas para a bioimpressão, resultando em uma relação elevada de eficácia/custo [30].

Ao aplicar hidrogéis de origem natural em estudos de engenharia de tecidos, a estrutura formada por tais materiais se assemelha com a estrutura natural de matrizes extracelulares, em ambientes altamente hidratados, promovendo excelente adesão celular [30]. Algumas técnicas buscam otimizar os fatores reológicos e mecânicos dos hidrogéis naturais, como a incorporação de nanopartículas, micropartículas ou mesmo a incorporação de outros hidrogéis para ajuste reológico [30, 31].

A agarose é um polissacarídeo extraído de diversos tipos de macroalgas. Em solução aquosa, esse copolímero natural forma gel termorreversível de caráter físico. Suas propriedades variam pela concentração, pH e o tipo de solvente aplicado [32]. A baixa taxa de degradação e baixa adesão celular limitam o uso geral da agarose como hidrogel para engenharia de tecidos [33].

Obtida a partir da deacetilação da quitina insolúvel proveniente de exoesqueletos de insetos, crustáceos e fungos, a quitosana pode ser dissolvida em meios ácidos, sendo utilizada para produzir curativos para ferimentos superficiais, principalmente com elevados graus de

desacetilação pela elevada taxa de degradação, biocompatibilidade celular e elevada adesão celular [16]. A quitosana possui comportamento termorreversível para gelificação, sob adição de fosfato de sódio como agente de reticulação iônico e NaOH para estabilizar o pH em 7,0 [34].

A celulose é um polissacarídeo formado por unidades de D-glucose. Por possuir diversos grupos hidroxilas, a formação de ligações de hidrogênio dificulta a dissolução da celulose em solventes comuns. Seus derivados, como metil-celulose (MC), etil-celulose (EC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e carboximetilcelulose são obtidos a partir da modificação a celulose comum. O comportamento hidrofóbico dos grupos metóxi resultam na gelificação da celulose, com transição sol-gel devido a perda de água entre as macromoléculas [16].

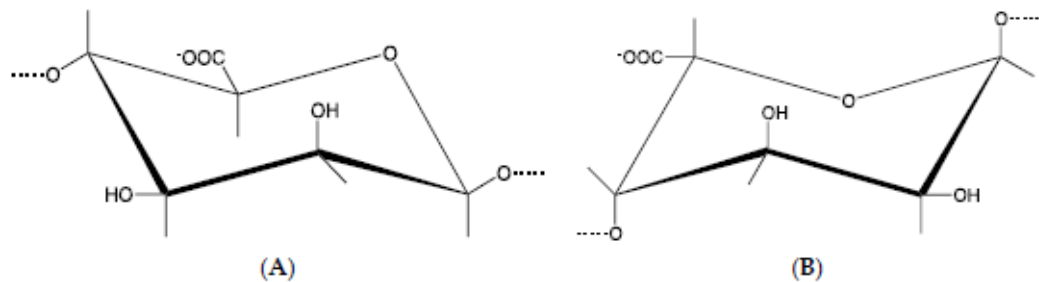
A fibroína é obtida a partir da ação da trombina no fibrogênio, transformando este em uma estrutura polimerizável onde os monômeros de fibrina se rearranjam para formar um gel insolúvel de rede tridimensional com elevado grau de deformação. As fibrinas são normalmente utilizadas pela adesão celular em sua estrutura, além de possuir taxa de degradação controlável. Ao alterar a concentração do precursor e a tensão iônica do material, pode-se alterar as propriedades do material a fim de otimizá-las para a bioimpressão 3D [16].

Hidrogéis de gelatina e colágeno são muito comuns na engenharia de tecidos. A gelatina é a forma desnaturada do colágeno, resultando em propriedades biológicas próximas entre os dois materiais. Ambos são utilizados com outros materiais, sejam artificiais ou naturais, por possuírem excelente adesão celular, mas baixas propriedades mecânicas. A transição sol-gel da gelatina ocorre pela estruturação helicoidal das cadeias poliméricas em baixas temperaturas, sendo um fenômeno termorreversível. Os métodos mais comuns de gelificação da gelatina são por método químico (peróxido de hidrogênio ou glutaraldeído) ou enzimático (transglutaminase ou peroxidase de rábano) [16].

### 3.2.2 Hidrogéis de alginato

Os alginatos são polissacarídeos lineares aniônicos derivados de algas Kelp ou algas marrons do tipo *Sargassum* e diversos tipos de cepas bacterianas, a partir da parede celular e espaços intracelulares destes organismos [35, 36]. Os alginatos obtidos a partir de sais de cálcio, magnésio e sódio são formados por um grupo M:  $\beta$ -(1-4)-D-Ácido manurônico (Figura 12 - A) e por um grupo G:  $\beta$ -(1-4)-D-Ácido gularônico (Figura 12 - B) [36].

Figura 12 – Estruturas básicas do alginato. (A)  $\beta$ -(1-4)-D-Ácido manurônico. (B)  $\beta$ -(1-4)-D-Ácido gulurônico.



Fonte: Axpe e Oyen [36].

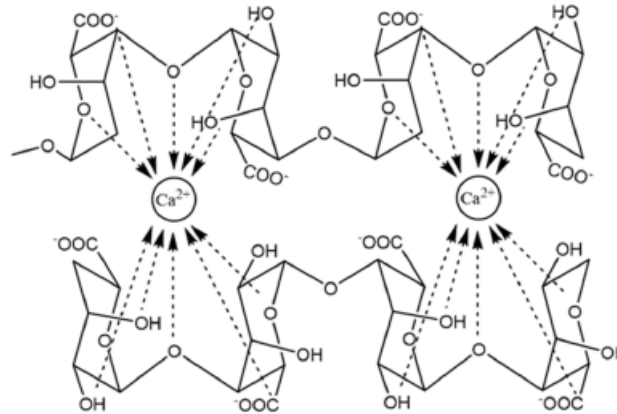
Do ponto de vista dos materiais poliméricos, os alginatos são copolímeros em bloco de caráter aniônico na qual os grupos M e G são combinados regiões homopoliméricas (GG e MM) e regiões copoliméricas (MG ou GM). Ressalta-se que elevados teores do grupo M favorecem a imunogenicidade (evita a proliferação de microrganismos) do composto [35, 36, 37]. Segundo Zhang, Cheng e Ao, a flexibilidade em ordem crescente dos grupos é GG<MM<MG ou GM, o que reforça o grupo GG ser aquele mais rígido estruturalmente em conformações mais amplas [35].

Os alginatos em forma de ácido são insolúveis em água e solventes orgânicos, porém seus sais são solúveis e estáveis, formando soluções viscosas e podendo gelificar na presença de cátions polivalentes [38].

A viscosidade do alginato é determinada pelo peso molecular, rigidez estrutural das cadeias, comprimento molecular de cadeia e força iônica da solução. De forma similar aos polímeros convencionais, o aumento da massa molecular, concentração do alginato em solução e rigidez estrutural da cadeia resultam em um aumento da viscosidade. Opostamente, aumento da temperatura resulta em um efeito de redução da viscosidade, pois há a repulsão eletrônica dos grupos presentes no alginato [39].

Dentre os sais de alginato comercialmente produzidos, o alginato de sódio possui uso majoritário justificado pelo íon monovalente  $\text{Na}^+$  presente em sua estrutura. A adição de cátion polivalente, normalmente  $\text{Ca}^{2+}$ , resulta na troca destes íons, formando majoritariamente uma estrutura de “caixa de ovos”, conforme a Figura 13:

Figura 13 – Estrutura de "caixa de ovos" de alginatos pós-reticulação. No exemplo, utilizou-se  $\text{Ca}^{2+}$  como agente reticulante.



Fonte: Zhang [35].

A gelificação do alginato em estruturas do tipo “caixa de ovos” envolve a coordenação e rearranjo do grupo G em zonas de ordenação, compostas por duas ou mais cadeias formando ligações de hidrogênio com o cátion utilizado para reticulação [35, 36, 37, 40]. Em uma rede tridimensional, cada cátion é ligado a quatro resíduos do grupo G. Para a formação de redes estruturadas estáveis ao redor de íons Cálcio, necessita-se entre 8 e 20 grupos G [35].

Com o desenvolvimento de novas tecnologias, descobriu-se que a estrutura de “caixa de ovos” não é a única estrutura de ordenação possível, gerando uma relação entre a estrutura de “caixa de ovos” e os outros tipos de estruturas. Em relação 3/1, a formação helicoidal é mais propensa a ser formada, se a gelificação por  $\text{Ca}^{2+}$  for lenta. No caso de gelificação rápida, forma-se uma estrutura metaestável em forma de 2/1 em hélice [41].

A formação de gel de alginato é determinada pelo tipo e concentração de agente de reticulação, peso molecular, tipo de alginato, composição, grau de polimerização e comprimento de cadeias [35].

Harper *et al.*, estudaram o efeito mecânico da reticulação do alginato de sódio com íons bivalentes de  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . O alginato reticulado com  $\text{Ba}^{2+}$  se mostrou mais rígido e mais resistente, seguido por  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , suportando a teoria de quanto maior o raio catiônico, mais resistente o hidrogel se torna [42].

A bioimpressão por extrusão requer um processo de gelificação rápida. Cada processo de bioimpressão 3D requer biotintas com características reológicas diferentes, sendo que a bioimpressão por extrusão trabalha com viscosidades entre 30 mPa.s e  $6 \times 10^7$  mPa.s [36].

Segundo Axpe e Oyen, ainda que o alginato de sódio é um material que não permite adesão celular, o uso de alginato em bioimpressão 3D se justifica pela não-toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, além de ser facilmente adaptável para bioimpressão e ser reologicamente caracterizado como *shear-thinning* ou pseudoplástica [36].

Após a impressão do biomaterial, este deve degradar apropriadamente para cada aplicação. O alginato possui biodegradação lenta, podendo ser otimizada pela incorporação de agentes oxidantes (peróxido de sódio, por exemplo) [43].

Aplicações do alginato em bioimpressão 3D se dão em diversos microcampos, como tecidos vascularizados, bioimpressão óssea e bioimpressão de cartilagem. Alguns problemas gerais de bioimpressão do alginato são apresentados na Tabela 5:

Tabela 5 – Dificuldades encontradas na bioimpressão de alginato reticulado com  $\text{Ca}^{2+}$ .

<b>Tipo de problema</b>	<b>Problema encontrado</b>	<b>Solução</b>
Geral	Imunogenicidade	Reduzir grupos M
Geral	Necessidade de gelificação rápida	Uso de cátions multivalentes
Geral	Cinética lenta de degradação	Otimização do peso molecular
Geral	Cinética lenta de degradação	Uso de agentes de oxidação
Tecidos vascularizados	Pouca vascularização	Uso de bioimpressão coaxial
Ossos	Baixa resistência mecânica	Uso de hidroxiapatita
Ossos	Baixa resistência mecânica	Uso de policaprolactona
Ossos	Baixa adesão celular	Uso de peptídeos de adesão
Cartilagem	Necessidade de matriz extracelular biomimética	Combinação com estruturas de policaprolactona
Cartilagem	Necessidade de matriz extracelular biomimética	Combinação com celulose nanofibrilada
Cartilagem	Necessidade de matriz extracelular biomimética	Combinação com acrilamida
Cartilagem	Baixa printabilidade do sulfato de alginato	Combinação com nanocelulose
Cartilagem	Baixa formação de matriz extracelular	Combinação com fatores de crescimento ( $\beta$ -TCP, policaprolactona)

Fonte: Adaptado de Axpe e Oyen [36].

O foco em otimizar as propriedades osteogênicas e mecânicas dos *scaffolds* trouxe o uso do alginato para a bioimpressão como um grande fator, seja utilizado na forma pura ou em

mistura com outros hidrogéis. Algumas outras estratégias de aditivação do alginato passam por adição de nano-hidroxiapatita, biovidros e outras cargas minerais [31].

Bociaga *et al.*, analisaram o uso de hidrogéis de alginato de sódio aditivados com gelatina bovina, fixando o teor de alginato em 5% w/v, alterando o teor de gelatina (0%, 3% w/v e 4% w/v) e o meio de solução. A incorporação no teor da gelatina resultou no aumento da viscosidade do hidrogel, taxa de degradação do hidrogel e resistência mecânica. A mudança do solvente para um meio de cultura celular resultou em um aumento da viabilidade celular [44].

Monavari *et al.*, estudaram a incorporação de nanopartículas de sílica-cálcia mesoporosas em soluções de alginato dialdeído e gelatina para bioimpressão 3D. O hidrogel obtido mostrou propriedade osteogênicas, sendo utilizadas como possíveis enxertos ósseos, motivados pela atividade, proliferação, adesão e diferenciação celular. As partículas adicionadas aos hidrogéis resultaram no aumento da resistência mecânica do hidrogel sob compressão, onde o aumento no teor de partícula gerou um aumento substancial na rigidez do *scaffold*, sem prejudicar a *printability* do hidrogel em aspectos reológicos e de fidelidade de forma [45].

Iglesias-Mejuto e Garcia-González, adicionaram hidroxiapatita em alginato para produzir *scaffolds* bioimpressos com estruturas porosas, com propriedades adequadas para engenharia de tecido em regeneração óssea. A estrutura produzida resultou em uma elevada viabilidade celular e estabilidade por 13 dias, mantendo a *printability* e poros presentes no sistema CAD original. O aumento do teor de hidroxiapatita gerou um aumento na área superficial e densidade dos *scaffolds* [46].

### 3.2.3 Poloxâmero ou *Pluronic*®

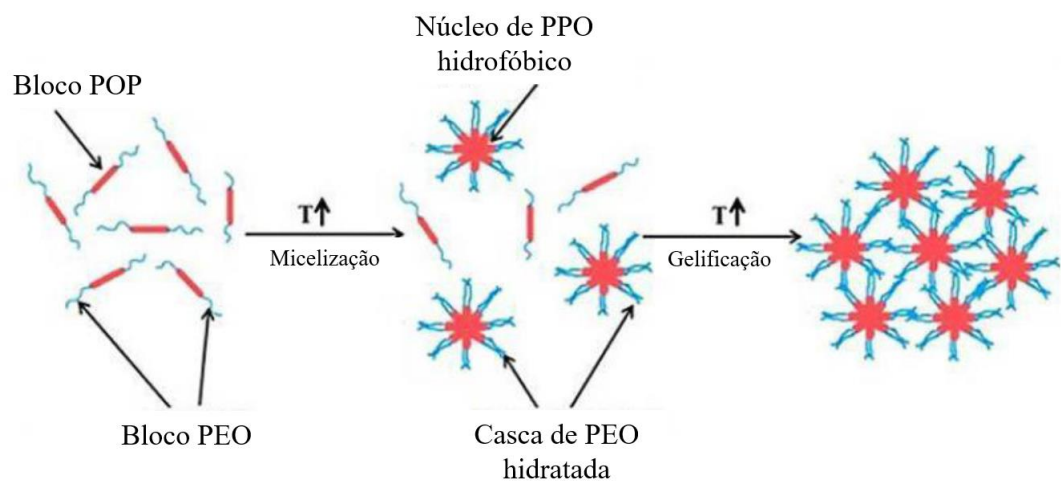
Os poloxâmeros são uma classe de copolímeros anfifílicos utilizados em diversas aplicações biológicas. Por conta de interações físicas em suas cadeias, os poloxâmeros formam hidrogéis gelificados em redes tridimensionais termorreversíveis. O nome *Pluronic*® parte da comercialização destes materiais pela BASF (Nova Jersey, EUA) na década de 1950 [47].

A estrutura do poloxâmeros consiste em três meros, com um núcleo hidrofóbico formado de poli-(oxipropileno) (POP) (Figura 14), cercado por dois meros hidrofílicos de poli-(oxietileno) (POE). Esses hidrogéis gelificam em temperaturas acima da temperatura crítica de micelização, que é a temperatura onde ocorre o fenômeno de micelização pelas propriedades anfifílicas do polímero [47].

O comportamento do poloxâmero em solução aquosa é altamente influenciado pela temperatura do meio. Em temperatura ambiente, a solução se comporta como um líquido de baixa viscosidade [48]. Um dos poloxâmeros mais utilizados na engenharia de tecidos é o Pluronic® F-127, ou Poloxâmero 407, sendo utilizado como estabilizador em formulações e agente emulsivo não-iônico, reconhecido como um “componente inativo” pela FDA, justificando sua aplicação em medicina e bioimpressão [49].

O mecanismo envolvido na transição termorreversível sol-gel e gel-sol do F-127 é baseado nas interações hidrofóbicas do POP, na qual é solúvel em temperaturas abaixo de 24 °C, mas com o aumento de temperatura, as estruturas se agregam, formando micelas para reduzir a área de superfície do grupo em questão que está em contato com a água do sistema conforme Figura 14 [50]:

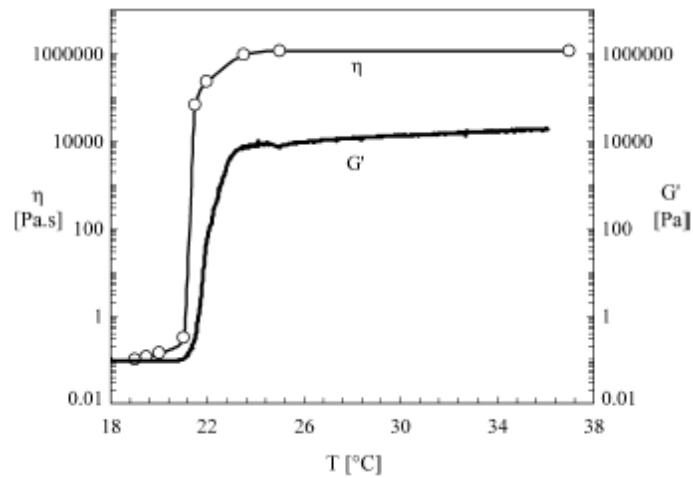
Figura 14 – Mecanismo de micelização e gelificação do Pluronic® F-127 ou Poloxâmero 407



Fonte: Adaptado de Neves [49].

Grassi *et al.* (2006) constataram que a interação entre alginato de sódio e o Pluronic® F-127 origina um composto termorreversível com formação de um gel resistente após reticulação com  $\text{Ca}^{2+}$ , com uma compatibilização completa entre o alginato de sódio e o F-127. Os autores evidenciam a transição sol-gel do F-127 por ensaios reológicos, conforme Figura 15 [51].

Figura 15 – Ensaio reológico do F-127 em Temperatura *versus* viscosidade ( $\eta$ ) e  $G'$ .



Fonte: Grassi *et al.* [51].

Grassi *et al.* (2006) apresentaram dados de viscosidade do F-127 alterando em 7 ordens de grandeza em temperaturas entre 21 °C e 24 °C, evidenciando que, a partir dessas temperaturas, os fenômenos de micelização e gelificação começam a ocorrer [51].

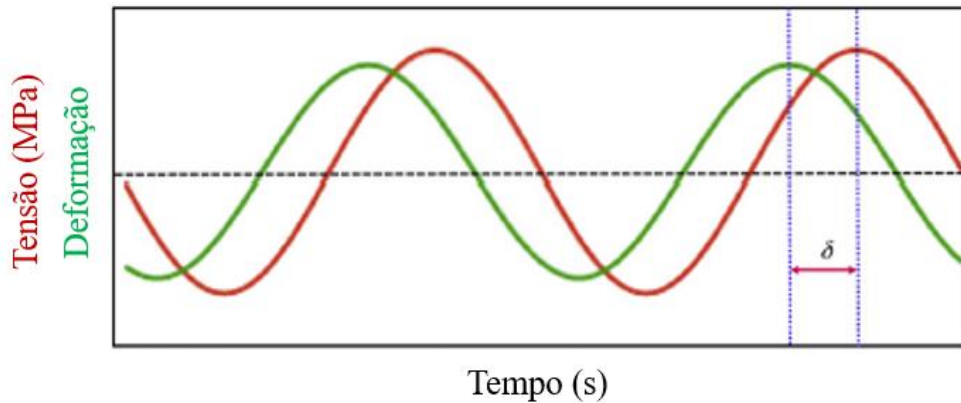
Hibbert, Voljoen e Plessis (2023) realizaram um estudo sobre as variáveis da bioimpressão, utilizando hidrogéis de *Pluronic*® F-127 (ou poloxamer) e alginato de sódio em solução de solução salina de preenchimento (PBS), onde variaram as composições, temperatura de impressão, diâmetro das agulhas, velocidade de impressão e pressão de impressão, visto que o sistema utilizado por estes era pneumático. Os autores constataram que não houve diferença de qualidade de impressão entre 35 °C e 37 °C. No sistema utilizado, os autores constatam que as agulhas de 27G (200  $\mu$ m), com velocidade de impressão de 10 mm/s e pressão de 30 kPa foram as condições otimizadas [48].

### 3.3 REOLOGIA E REOMETRIA

A reologia é um ramo da física que estuda a deformação e o fluxo de materiais, correlacionando tensão (ou força), deformação e tempo. O estudo de líquidos viscosos ideais e sólidos ideais alcançou uma limitação mútua na presença de materiais viscoelásticos. Esses materiais se caracterizam pela combinação de características elásticas e viscosas, combinando modelos de molas e amortecedores [52].

Os sólidos ideais (ou *Hookeanos*) são caracterizados pela tensão e deformação estarem em fase, enquanto os líquidos possuem um atraso de fase, podendo ser definido em ensaios de reometria oscilatória. Assim, apresenta-se o exemplo de atraso de fase na Figura 16:

Figura 16 – Exemplo do atraso de fase ( $\delta$ ) entre tensão e deformação em líquidos.



Fonte: Adaptado de Chandran, Sarathchandran e Thomas [52].

Para sistemas ideais, a tensão nos sólidos é diretamente proporcional à deformação, enquanto, os líquidos Newtonianos se caracterizam pela deformação é diretamente proporcional à taxa de deformação. Entretanto, há uma classe de materiais caracterizadas pela combinação de propriedades entre sólidos *Hookeanos* e líquidos viscosos, chamada de Materiais Viscoelásticos [53].

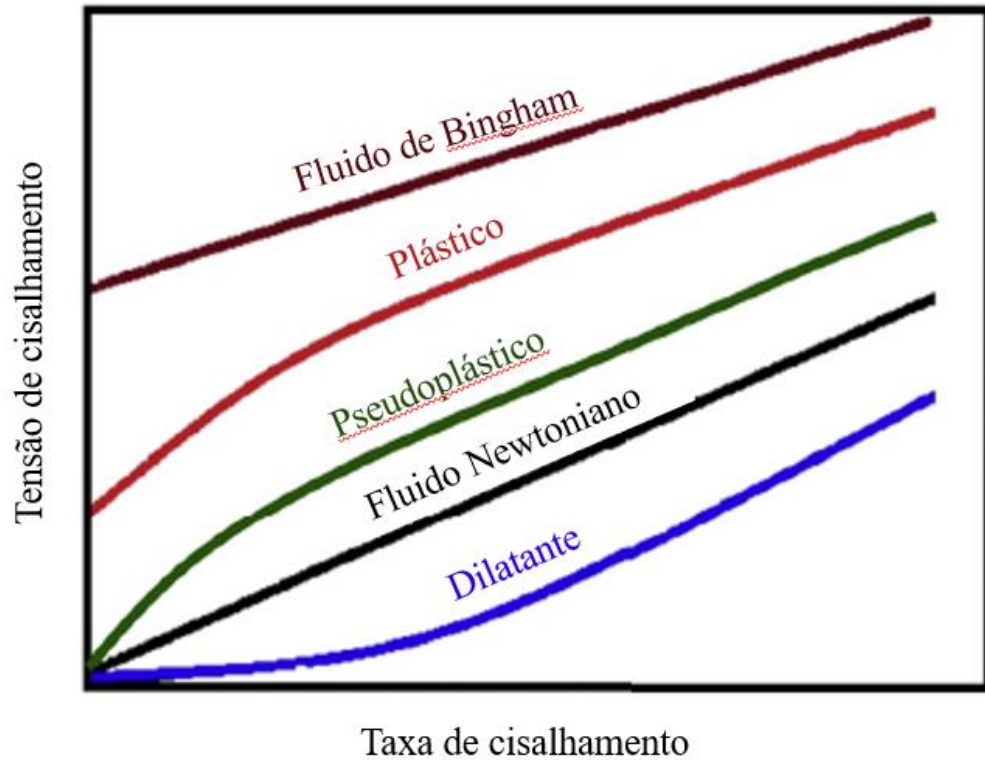
Para um material viscoelástico, a relação de viscosidade ( $\eta$ ), ao ser utilizada reometria oscilatória, se dá pela equação 3 [53]:

$$\eta(\omega, t) = G' \gamma \cdot \text{sen}(\omega t) + G'' \gamma_0 \cdot \text{cos}(\omega t) \quad (3)$$

Onde  $\omega$  é a frequência de deformação,  $\gamma$  é a taxa de cisalhamento aplicada,  $t$  é tempo e os fatores  $G'$  e  $G''$  determinam fatores de fase.  $G'$  é o módulo de armazenamento de energia, ou seja, é o fator elástico da estrutura viscoelástica.  $G''$  é o módulo de dissipação de energia por deformação viscosa, associado à parcela viscosa da estrutura viscoelástica [52].

Os fluidos não-Newtonianos podem ser caracterizados com base na resposta viscosa em relação a magnitude da taxa de cisalhamento aplicada, conforme a Figura 17:

Figura 17 – Tipos de fluidos caracterizados pela relação de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento. Ensaios realizados por reologia rotacional.



Fonte: Adaptado de Chandran, Sarathchandran e Thomas [52].

**Pseudoplásticos** (*shear-thinning*) são materiais viscoelásticos que se caracterizam pela redução da viscosidade quando há o aumento da taxa de cisalhamento. Possuem três regiões gráficas características: uma primeira região com elevada viscosidade para baixas taxas de cisalhamento, seguida por uma região intermediária onde o aumento da taxa de cisalhamento resulta na diminuição da viscosidade, na qual pode ser definida pela Lei de Potências (equações 4 e 5). Para altas taxas de cisalhamento, há um platô de viscosidade [52]

Os **materiais dilatantes** (*shear-thickening*) são materiais que, ao contrário dos pseudoplásticos, se caracterizam pelo acréscimo da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Assim como no caso dos pseudoplásticos, podem ser definidos por Lei de Potência (equações 4 e 5). A propriedade dilatante do material depende da concentração, tamanho e forma das partículas inseridas no sistema [54].

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (4)$$

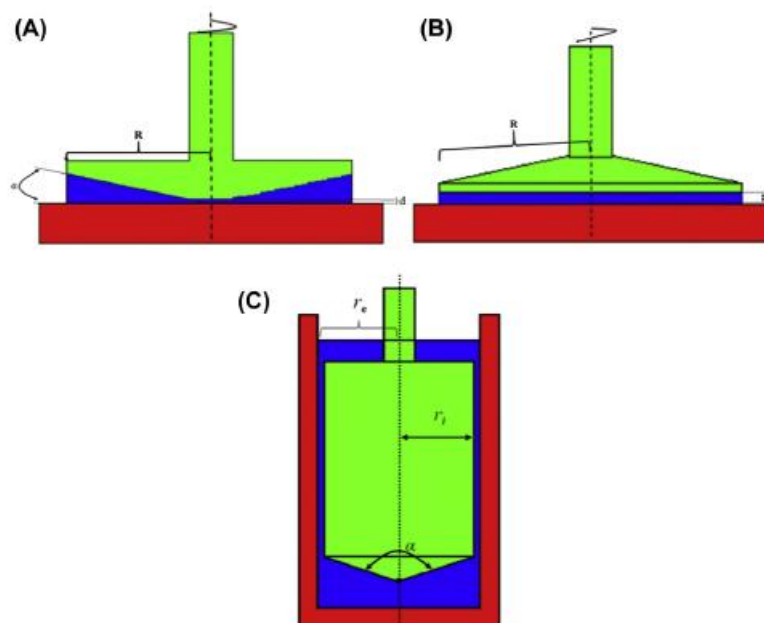
$$\eta_{ap} = K \cdot (\dot{\gamma})^{n-1} \quad (5)$$

Sendo  $\tau$  a tensão de cisalhamento,  $\eta$  viscosidade aparente,  $\dot{\gamma}$  é a taxa de cisalhamento,  $K$  é a constante que depende do tipo de fluido e  $n$  é o fator de potência, onde  $n > 1$  é fluido dilatante e  $n < 1$  é fluido pseudoplástico.  $\tau_0$  é a tensão de escoamento, não existente para pseudoplásticos, fluidos Newtonianos e dilatantes.

Os fluidos **plásticos** (ou **tixotrópicos**) são similares ao pseudoplásticos, porém estes possuem uma tensão inicial para que a deformação ocorra, chamada de tensão de escoamento  $\tau_0$ . Já os fluidos de **Bingham** possuem relação de tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento linear como líquidos viscosos, mas possuem uma tensão de escoamento  $\tau_0$ , resultando na necessidade de uma tensão inicial para fluir [52].

Utilizados para o estudo das propriedades reológicas de um material, diversas geometrias de “*spindles*” são utilizadas, como placa-cone, placa-placa (ou placas paralelas, ou disco-placa), aletas e cilindros concêntricos. *Spindles* cilíndricos são utilizados para estudar a reologia de líquidos, enquanto *spindles* cilíndricos são utilizados para estudo de tensão e taxa de cisalhamento e viscosidade de fluidos não-Newtonianos. *Spindles* em forma de placas aletadas (ou aletas) são normalmente utilizados para estudo de hidrogéis. Algumas geometrias estão apresentadas na Figura 18 [52].

Figura 18 – Tipos diferentes de spindles usados em reometria. Em (A) spindle placa-cone, em (B) placa-placa e em (C) cilindros concêntricos.



Fonte: Adaptado de Chandran, Sarathchandran e Thomas [52].

A reometria oscilatória se diferencia da reometria rotacional pelo tipo de movimentação do reômetro: enquanto a reometria rotacional possui uma rotação contínua, a reometria oscilatória é realizada com uma oscilação de frequência definida, podendo ser controlada pela tensão aplicada ou pela deformação aplicada.

### 3.3.1 Reologia em hidrogéis

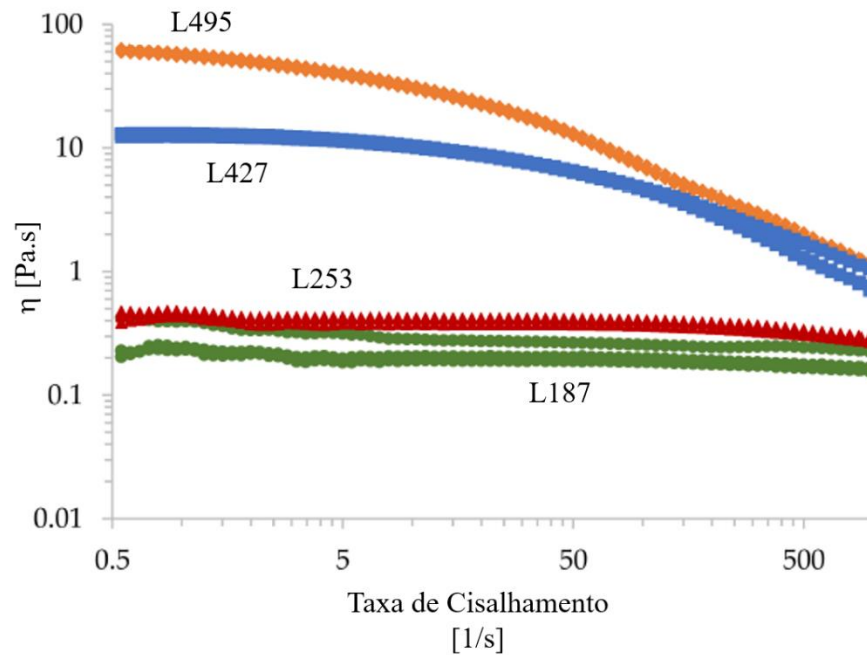
Para hidrogéis, a reologia é utilizada para caracterizar propriedades químicas e físicas de forma rápida e simples. Os métodos mais comuns de caracterização reológica de hidrogéis se dão por reometria oscilatória de baixa amplitude ( $<1^\circ$ ). Utiliza-se, por exemplo, alterações na frequência de oscilação para detectar característica do hidrogel, transição vítrea, arquitetura de cadeia e rede do hidrogel <sup>[56]</sup>.

A reologia dos hidrogéis apresentam princípios essenciais para as aplicações destes materiais. Propriedades mecânica obtidas por reologia mostram a viabilidade do hidrogel para aplicações biológicas específicas. A rigidez mecânica dos hidrogéis deve ser avaliada, por exemplo, para que o hidrogel se sustente em seu próprio peso para produzir um *scaffold*, mantendo o crescimento celular, adesão celular e diferenciação celular <sup>[56]</sup>.

Em bioimpressão, o estudo da reologia dos hidrogéis é fundamental para o controle preciso da forma tridimensional. O fluxo do hidrogel é crucial para a bioimpressão, contabilizando a deformação, viscosidade e a recuperação elástica deste para poder fluir e manter a estrutura impressa. Especificando a bioimpressão para EBB, há a necessidade dos hidrogéis serem pseudoplásticos/*shear-thinning* para que haja o escoamento, mas ao retirar a tensão aplicada, o hidrogel não escoe e se mantenha naquela geometria bioimpressa <sup>[57]</sup>.

Gorroñoigoitia *et al.* (2022) realizaram o ensaio reológico de quatro tipos de alginato de sódio em concentração de 4% w/v, nomeados a partir do peso molecular médio (em kDa) de cada alginato: L495, L187, L253 e L427. O ensaio está apresentado na Figura 19 <sup>[58]</sup>:

Figura 19 – Ensaio reológico de alginatos de sódio (4% w/v) à 23 °C, analisando a influência massa molecular na viscosidade.



Fonte: Adaptado de Gorroñoigoitia *et al.* [58].

O ensaio conduzido pelo grupo de Gorroñoigoitia *et al.*, evidenciou que quanto maior a massa molecular de um polímero para hidrogel, maior é a viscosidade apresentada em sua solução aquosa. Os autores, em outro experimento, também verificaram que o aumento da temperatura reduz na redução da viscosidade do material ao permitir que as cadeias poliméricas possuam mais mobilidade. Para a bioimpressão, teores de 4% de L187 e L253 foram pouco viscosos, mas os alginatos L495 e 427 obtiveram boa *printability*, sejam pré ou pós-reticulação, otimizados para um Pr de  $1,08 \pm 0,06$  na composição de 5% L495 [58].

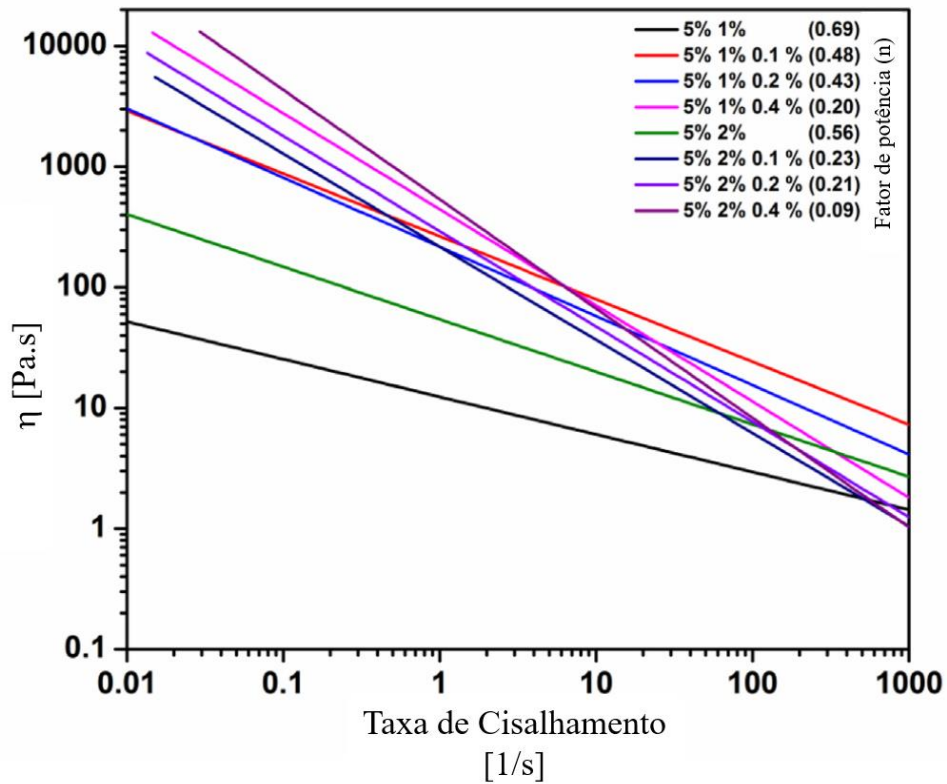
Como já citado no tópico 3.2.2 “Hidrogéis de alginato”, a baixa estabilidade estrutural do alginato para bioimpressão 3D de tecidos ósseos trouxe a necessidade de alterações no alginato, como a incorporação de fibras e partículas, promovendo melhores propriedades mecânicas e estabilidade estrutural [59]. Biovidros e hidroxiapatita foram também usados como aditivos bioquímicos, reológicos e mecânicos ao alginato [60].

A alteração do alginato com biovidro, hidroxiapatita ou outros hidrogéis resulta em alterações reológicas no material. O estudo reológico desses compósitos poliméricos é utilizado como um guia de ação entre a formulação e as propriedades dos compósitos [61].

Adhikari *et al.*, estudaram hidrogéis de alginato de sódio e quitosana aditivados com nano-hidroxiapatita (n-HAp) sob a óptica da bioimpressão 3D e *printability* para aplicações em

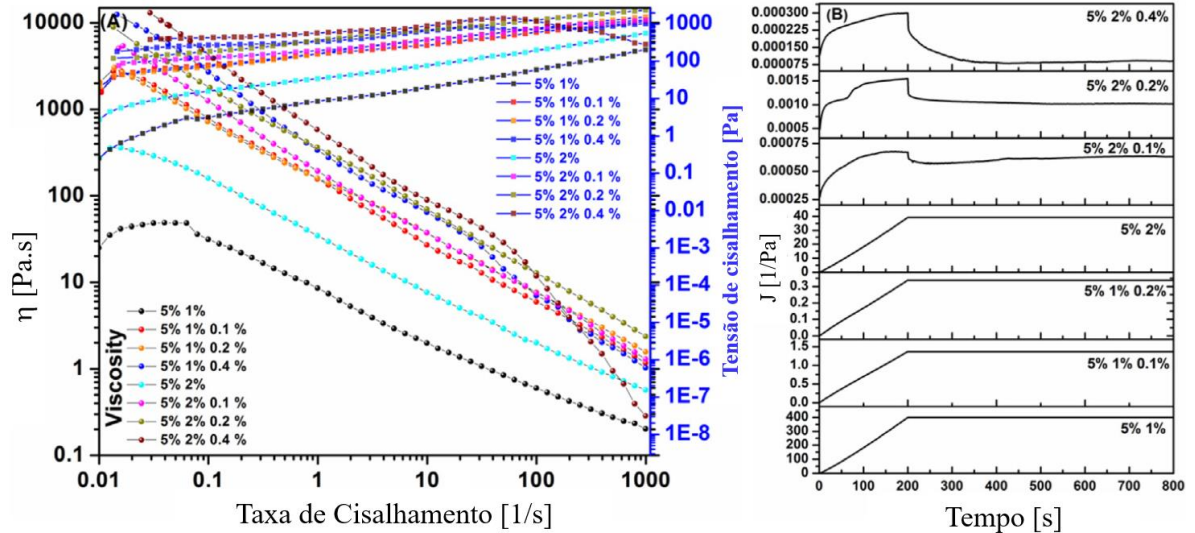
engenharia de tecidos ósseos. Os autores utilizaram os sistemas em situações sem reticulação e com reticulação + secagem. A nomenclatura presente na Figura 20 apresenta, respectivamente, %alginato, %quitosana e %hidroxiapatita em peso <sup>[62]</sup>:

Figura 20 – Ensaio reológico realizado por Adhikari *et al.*



Fonte: Adaptado de Adhikari *et al.* <sup>[62]</sup>.

Figura 21 – Ensaio reológico realizados por Adhikari *et al.* [62]. Em (a) curva de viscosidade e tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento. Em (b) ensaio de fluência do fluxo em função do tempo.

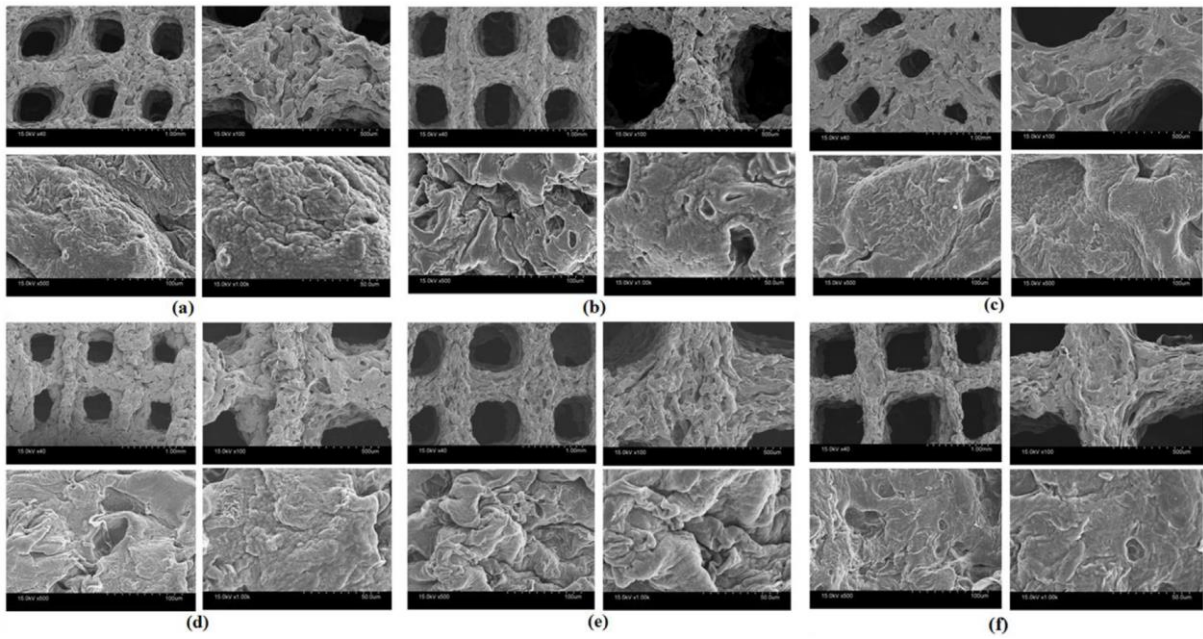


Fonte: Adhikari *et al.* [62].

Por meio do ensaio reológico, os autores concluíram que o aumento no teor de quitosana e n-HAp resultaram em fluidos com resposta *shear-thinning* pseudoplástica acentuada, evidenciado pelos menores valores de  $n$  (Figura 20). Para materiais com maior caráter pseudoplástico, a recuperação elástica é mais efetiva, assim como mostrado no ensaio de fluxo (J) em função do tempo apresentado na Figura 21-B. A Figura 21-A mostra que o aumento nos teores de quitosana e n-HAp trouxeram um aumento na tensão de escoamento dos materiais ( $\tau_0$ ) [62].

Toda análise reológica do material foi evidenciada na bioimpressão dos *scaffolds* conforme Figura 22, onde as composições com menores valores de  $n$ , maior recuperação elástica e maior tensão de cisalhamento resultaram em poros definidos, com valores de  $Pr$  visualmente mais próximos de 1. A relação entre viscosidade, recuperação elástica e tensão de cisalhamento é essencial para a bioimpressão de hidrogéis com estabilidade estrutural. As imagens em MEV também mostraram que o incremento no teor de n-HAp resultou em filamentos com maior rugosidade superficial, o que é um fator crucial para adesão e crescimento celular em engenharia de tecidos ósseos [62].

Figura 22 – *Scaffolds* bioimpressos por Adhikari *et al.* Em (a) 5% 1%. Em (b) 5% 2%. Em (c) 5% 1% 0,1%. Em (d) 5% 1% 0,4%. Em (e) 5% 2% 0,1%. Em (f) 5% 2% 0,4%.



Fonte: Adhikari *et al.* [62].

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nessa seção, apresentam-se os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento do projeto, bem como as rotinas de projeto e validação do sistema. Assim, utilizou-se o método comparativo para analisar os resultados obtidos.

### 4.1 MATERIAIS

As matérias-primas utilizadas foram o alginato de sódio em sal (Dinâmica – 9005-38-3, 90% de pureza), Poloxâmero 407 em grânulos (BASF – 9003-11-6),  $\text{CaCl}_2$  dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Dinâmica – 10035-04-8, 99% de pureza).

As seringas utilizadas foram seringas de 1 mL, 3 mL, 5 mL e 10 mL da marca SR®, bem como tubos de poliuretano e conectores *luer-lock* obtidos da ePrinters.

### 4.2 PREPARAÇÃO DE MISTURAS

O alginato foi solubilizado em proporções 2% em peso (2 g em 100 mL) e 4% em peso (5 g em 100 mL) em água destilada, utilizando misturador mecânico (150 RPM) em banho-maria à 60°C.

Os hidrogéis de poloxâmero foram obtidos ao solubilizar o pó de alginato em proporções de 18% em peso e 20% em peso em água destilada, realizando ciclos de 3,5 minutos ao congelador para manter a temperatura menor que 20°C, favorecendo a solubilização e evitando formação de micelas. Produziu-se as soluções de  $\text{CaCl}_2$  com 3% em peso, 5% em peso, 8% em peso e 10% em peso em misturador mecânico à temperatura ambiente.

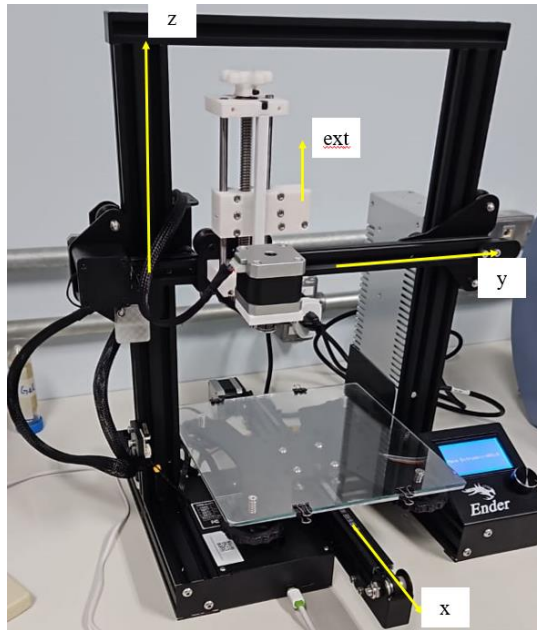
### 4.3 BIOIMPRESSORA

O modelo inicial de bioimpressora utilizado nesse projeto é uma Ender 3 V1 adaptada para bioimpressão 3D (Figura 23). No modelo inicial, um motor de passo transfere energia a uma barra roscada, a qual movimentada verticalmente uma barra transversal utilizada para mover o êmbolo da seringa. A bioimpressora não possui sistema de aquecimento para controle de temperatura.

O sistema inicial possui quatro eixos de movimentação, na qual o eixo “x” é responsável pela movimentação da mesa de impressão, “y” como movimentação da barra de impressão e

“z” sendo o eixo de movimentação vertical para cada camada, e “ext” é o eixo de movimentação para alimentação do extrusor ou, nesse caso, movimentação do êmbolo da seringa.

Figura 23 – Bioimpressora inicial utilizada no projeto, indicando os quatro eixos de funcionamento do sistema.

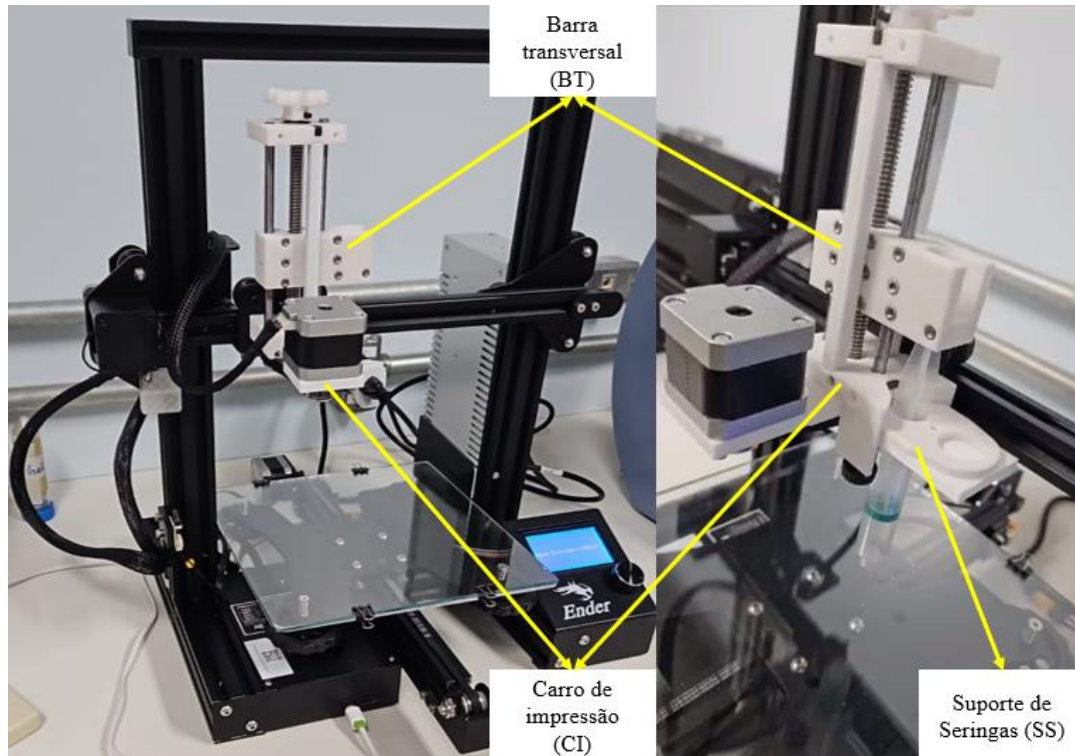


Fonte: Autor.

Como apresentado no tópico 3.1.2 “Mecanismos alternativos de bioimpressão por extrusão”, as diferentes técnicas utilizadas na bioimpressão 3D geraram um exponencial aumento de possíveis produtos a partir deste macroprocesso. O uso de sistemas coaxiais de bioimpressão 3D, além de produtos perfusionados com elevado grau de reticulação, resulta em filamentos em condições mais próximas ao ideal para bioimpressão 3D. A partir desta necessidade, houve a busca por transformar a bioimpressora inicial deste projeto em uma bioimpressora de extrusão coaxial, onde inicialmente foi projetada uma seringa de coextrusão e, posteriormente, o sistema foi adaptado para funcionamentos de uma ou duas seringas para coextrusão.

A partir do sistema inicial, desenhou-se as novas peças utilizando o Autodesk Fusion3D® e impressas em impressoras 3D de FDM tradicionais. A Figura 24 apresenta a bioimpressora inicial com peças nomeadas para facilitar o entendimento:

Figura 24 - Bioimpressora utilizada no sistema com principais peças nomeadas.



Fonte: Autor.

A acoplagem do sistema todo na impressora foi feita pelo carro de impressão, nome adaptado de outras técnicas de manufatura aditiva. No carro de impressão, o suporte de seringas se acopla por parafusos e porcas. A barra transversal se movimenta por um eixo roscado conectado por correia ao motor de passo, com dois eixos guias laterais. Os detalhes dos desenhos estão presentes na patente de GRU 20 2024 008885 4 em andamento pelo INPI até a presente data (05/04/2024).

#### 4.3.1 Estudo da vazão e variáveis de impressão

Como o sistema é adaptado a partir de uma impressora 3D tradicional, algumas funções presentes no sistema foram adaptadas. Assim, o estudo de velocidade de impressão, diâmetro do filamento e largura de extrusão como variáveis de impressão foi necessário para entender o funcionamento do sistema com cada condição de impressão. Mesmo que o sistema não possua mais um filamento polimérico para FDM, o software é adaptado de uma impressora do tipo FDM, e utiliza dados do filamento para calcular a função do motor de passo. Ressalta-se que a largura de extrusão e diâmetro do filamento estão correlacionados com um sistema tradicional de impressão 3D FDM, mas ainda assim influenciam no sistema de bioimpressão.

Para estudar o funcionamento do sistema, utilizou-se uma estrutura cilíndrica, com 0% de preenchimento e modo vaso. O modo vaso consiste na impressão de uma única parede do perímetro de um objeto sem a utilização de camadas de impressão e preenchimento [63].

A partir do modo vaso, uma seringa com água foi acoplada ao sistema. O uso da água objetivou compreender o sistema com um fluido de referência simples. A da barra transversal à peça de acoplagem do carro de impressão foi medida antes e depois do teste, com o auxílio de um paquímetro digital. O tempo do teste foi medido, assim como o volume despejado do sistema para o cálculo de vazão. Assim, comparou-se a velocidade inserida no software (velocidade prusa), com a velocidade real obtida a partir do seguinte cálculo:

$$v_{real} = \frac{L_{inicial} - L_{final}}{t} \quad (6)$$

Têm-se  $L_{inicial}$  como a distância da barra transversal inicial,  $L_{final}$  como a distância da barra transversal final e  $t$  como o tempo para tal teste. Assim como os cálculos de vazão calculada e vazão medida foram calculados por:

$$Q_{medida} = \frac{V}{t} \quad (7)$$

$$Q_{calculada} = v \cdot \frac{\pi}{4} \cdot D_{seringa}^2 \quad (8)$$

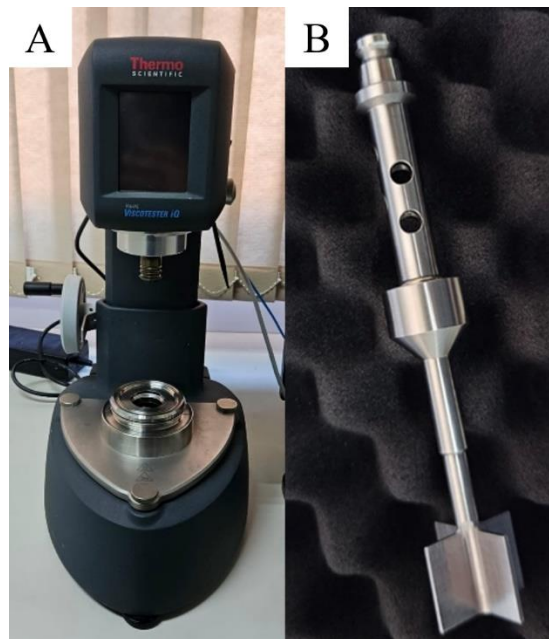
Sendo  $V$  o volume vazado, medido por uma proveta,  $t$  o tempo do teste e  $D_{seringa}^2$  como o diâmetro interno da seringa, e  $v$  como velocidade. Neste ensaio, utilizou-se a velocidade real da equação 6 como velocidade para equação 8. Realizou-se 3 ensaios para cada variável.

#### 4.4 ANÁLISE REOLÓGICA

Para compreender e correlacionar as propriedades viscosas dos polímeros estudados com as relações de bioimpressão do sistema, realizou-se ensaios reológicos. Ao estudar as propriedades do poloxâmero 407, sendo este o “padrão ouro” da bioimpressão, pode-se apontar um objetivo para os demais materiais serem bioimpressos.

O reômetro utilizado neste trabalho foi o reômetro HAAKE Viscotester iQ Air (Figura 25), com *spindles* em modelo aleta-copo (Figura 25).

Figura 25 – Reômetro HAAKE Viscotester iQ Air e *spindle* em aleta.



Fonte: Autor

Para análise do comportamento em relação à temperatura do poloxâmero 407, um ensaio em reometria oscilatória de deformação controlada (CD) sobre viscosidade em função da temperatura com duas rampas de aquecimento foi realizado com o poloxâmero 407 em 18% em peso e 20% em peso, iniciando em 5 °C, aquecendo à 3°C/min até 60 °C e resfriando novamente até 5 °C com taxa de -3 °C/min. Neste ensaio, a alimentação ao sistema ocorreu com a amostra em 5°C, evitando possíveis fadigas térmicas ao material.

Para análise do comportamento do alginato (2% em peso e 4% em peso), um ensaio similar foi realizado, variando apenas a temperatura de início e máxima: iniciou-se em 60 °C, atingindo uma temperatura mínima de 5 °C e reaquecendo para 60 °C. A mudança para este ensaio se deu pela elevada viscosidade do alginato em temperaturas abaixo de 20 °C, dificultando a medição de 28,2 mL conforme exigido pelo equipamento. Logo, iniciar o ensaio com temperaturas mais elevadas, permitiria a alimentação e disposição do alginato de forma mais precisa ao sistema.

Tabela 6 - Condições de ensaio reológico para poloxâmero 407 e alginato de sódio em reometria oscilatória.

<b>Reometria oscilatória (CD)</b>			
	<b>Poloxâmero 407</b>	<b>Alginato</b>	
<b>Variável</b>	<b>Valor</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidade</b>
T inicial	5	60	°C
T intermediária	60	5	°C
T final	5	60	°C
Frequência	0,5	0,5	Hz
Deformação	0,2	0,2	rad
Taxa de aquecimento	3	3	°C/min
Taxa de resfriamento	-3	-3	°C/min

Por fim, o ensaio de viscosidade em função da frequência foi realizado para o poloxâmero 407:

Tabela 7 – Condições de ensaio para ensaio de viscosidade em função da frequência de oscilação em deformação controlada (CD).

<b>Reometria oscilatória (CD) Poloxâmero</b>		
<b>Variável</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidade</b>
f inicial	1	Hz
f final	10	Hz
T ensaio1	20	°C
T ensaio2	35	°C
Deformação	0,2	rad
Taxa de resfriamento	3	°C/min

Fonte: Autor.

#### 4.5 BIOIMPRESSÃO 3D

Utilizando o sistema descrito, a bioimpressora foi controlada pelo software Repetier Host, e as amostras e condições de bioimpressão foram definidas pelo software PrusaSlicer. As condições de bioimpressão foram definidas conforme estudo do tópico 4.3.1 “Estudo da vazão e variáveis de impressão”.

Tabela 8 – Condições de impressão.

<b>Condições de impressão</b>		
<b>Variável</b>	<b>Valor</b>	<b>Unidade</b>
<b>Seringa 1</b>	10	mL
<b>Seringa 2</b>	5	mL
<b>Velocidade de impressão</b>	5	mm/s
<b>Diâmetro do filamento</b>	1,2	mm
<b>Largura de extrusão</b>	0,4	mm
<b>Agulha interna</b>	21	G
<b>Diâmetro externo</b>	4	mm
<b>Preenchimento</b>	Grade	
<b>Densidade de Preenchimento</b>	10	%

Fonte: Autor.

As amostras bioimpressas foram cubos de 20 mm de lado, com 10% de preenchimento, preenchidos em geometria alinhado alternado (grade alternada). A impressão foi realizada com 5 camadas de altura para estudar o funcionamento da impressão de uma estrutura tridimensional que suporte o próprio peso e se mantenha estável.

Este tópico apresenta as mudanças, propostas e executadas, considerando as respectivas evoluções para a execução do sistema de bioimpressão 3D por extrusão coaxial.

Em um primeiro momento, evitando mudanças drásticas ao sistema, foi proposto um sistema de seringa de coextrusão, mas devido às limitações de precisão dimensional para a seringa, a ideia foi descontinuada e substituída pelas alterações para um sistema de coextrusão acoplado ao carro de impressão. A proposta da seringa de coextrusão está disponível no APÊNDICE A.

## 5 RESULTADOS

Neste tópico, apresenta-se os resultados sobre o reprojeto da bioimpressora, estudo dos hidrogéis, análise reológica dos hidrogéis, estudo das variáveis de impressão e resultado do reprojeto da bioimpressora.

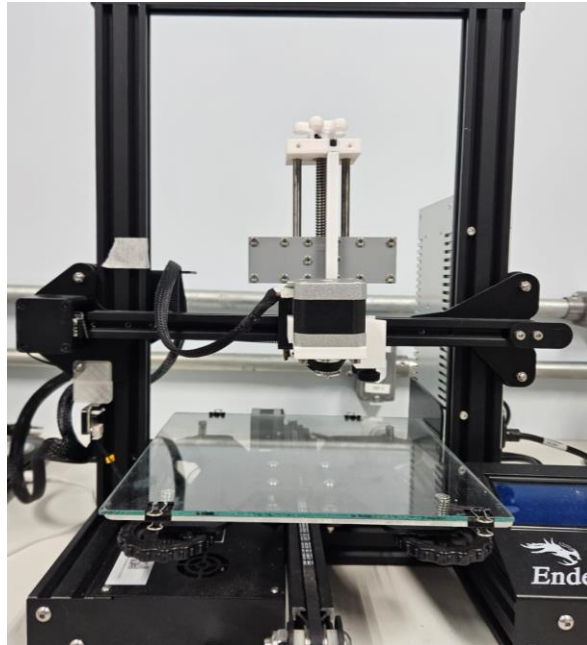
### 5.1 REPROJETO DA BIOIMPRESSORA

A proposta do sistema de coextrusão gerou duas variantes, sendo a montagem no carro de impressão ou na viga superior do sistema. O modelo inicial da bioimpressora serviu de base para o sistema de duas seringas.

O modelo inicial Ender 3 V1 adaptado para bioimpressão, ao utilizar fluidos de elevada viscosidade (resistência ao escoamento), apresentava flexão na barra transversal, dispersando a energia que seria utilizada para movimentação do êmbolo e escoamento do hidrogel. A montagem de um sistema de coextrusão em duas seringas não poderia ser montado com duas seringas dispostas do mesmo lado do sistema, pois poderia reduzir momento e a flexão na barra transversal. O projeto, portanto, foi feita a partir de um sistema simétrico, com uma seringa em cada lado da barra transversal, podendo ser utilizada como sistema de uma única seringa ou duas seringas.

O projeto do sistema de carro de impressão com seringas simétricas necessitou da alteração do carro de impressão e a extensão da barra transversal. A primeira alteração do sistema ocorreu pela extensão da barra transversal, para acoplar duas seringas, conforme mostra a Figura 26:

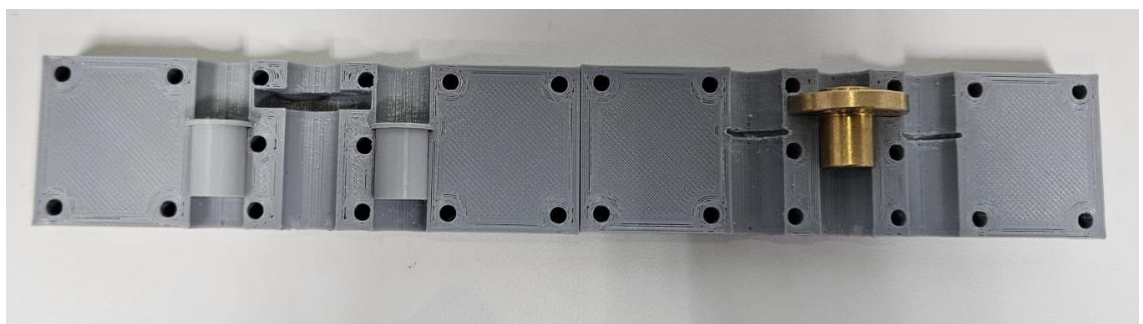
Figura 26 – Alteração da barra transversal para aplicação de duas seringas.



Fonte: Autor.

O projeto da barra transversal se deu em função de estender a peça em função de se obter a simetria para movimentação do êmbolo de duas seringas. Assim, a peça foi projetada com outras otimizações, como a produção de buchas para os eixos-guias que reduzam a flexão da peça.

Figura 27 - Barra transversal desmontada

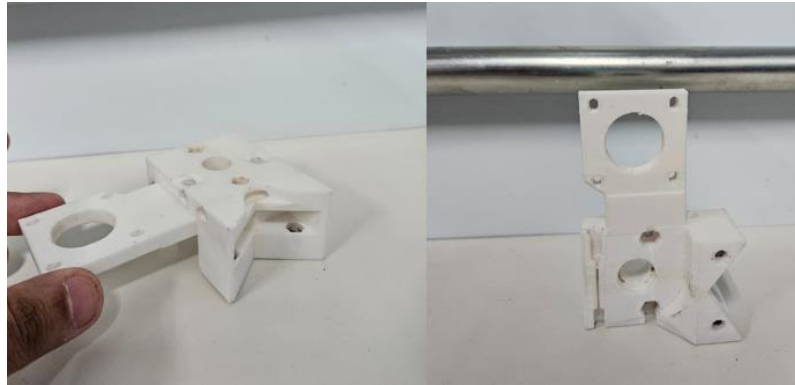


Fonte: Autor.

A extensão da barra transversal trouxe a necessidade de ajustes em relação à peça inicial, como a redistribuição dos parafusos e porcas existentes, redistribuição das buchas para os eixos-guias e novos parafusos e porcas, principalmente na bucha roscada, fixando-a na barra.

Assim como a barra transversal, a peça do carro de impressão foi reprojeta para a acoplamento de duas seringas de forma simétrica. A fim de não fazer alterações disruptivas, a peça foi reprojeta a partir da peça inicial. A peça inicial demontada está apresentada na Figura 28:

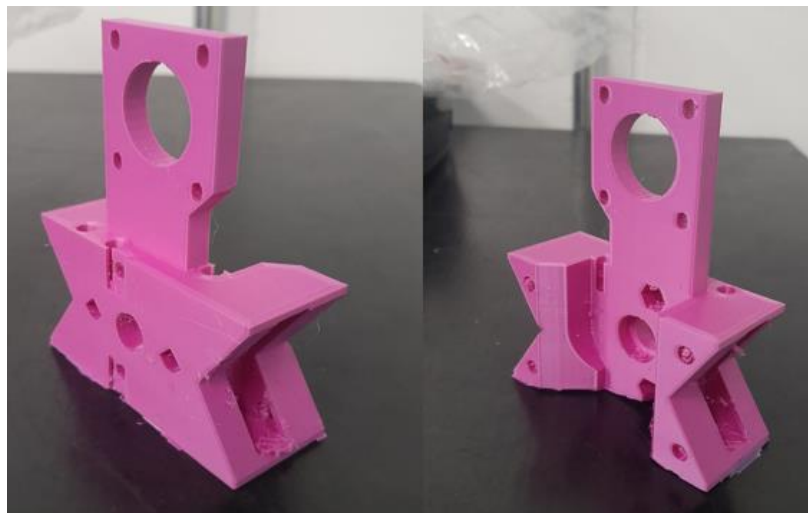
Figura 28 - Peça inicial do carro de impressão desmontada, produzida em PLA.



Fonte: Autor.

A partir da peça inicial, a peça reprojeta está apresentada na Figura 29:

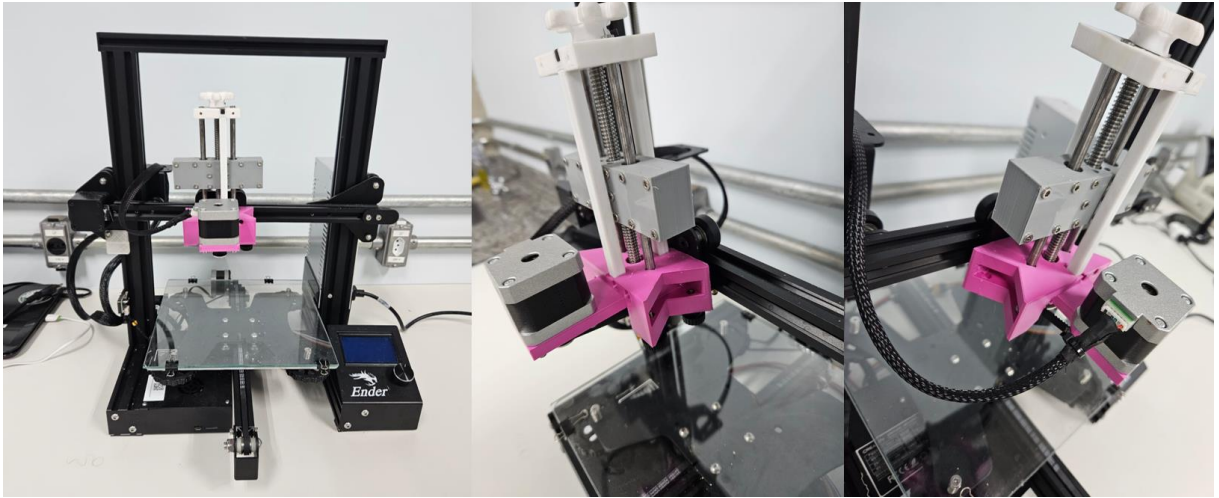
Figura 29 – Peça do carro de impressão reprojeta para sistema de acoplamento simétrica de seringas, produzida em PLA.



Fonte: Autor.

A versão reprojeta do carro de impressão foi baseada no sistema inicial, com a incorporação de um novo espaço para um segundo suporte de seringas. Já o protótipo com as novas peças projetadas e impressas:

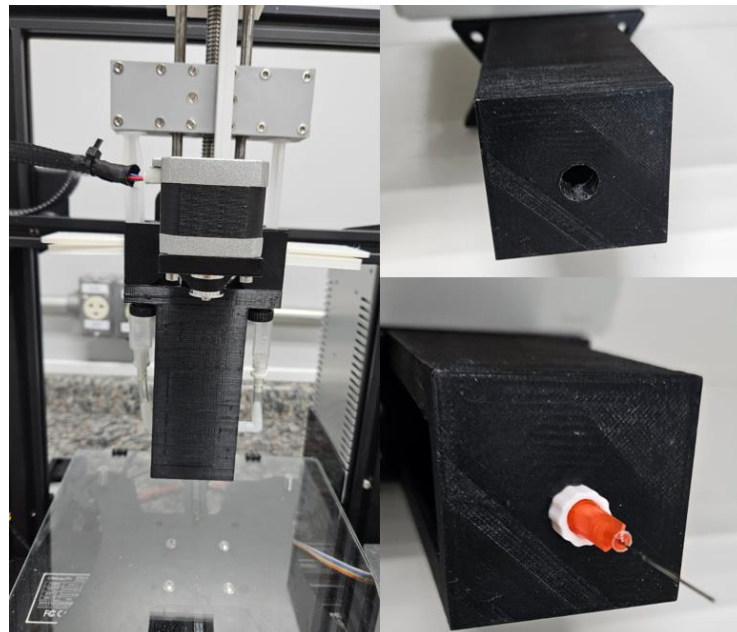
Figura 30 – Sistema de duas seringas montado no carro de impressão.



Fonte: Autor

A montagem das seringas ao sistema foi feita utilizando sistemas *luer-lock* com tubos de poliuretano com 4 mm de diâmetro interno e 6 mm de diâmetro externo. Para que os tubos e a agulha de impressão não ficassem em balanço, uma peça com encaixe aos suportes de seringa e com um furo na geometria dos conectores *luer-lock* foi projetada:

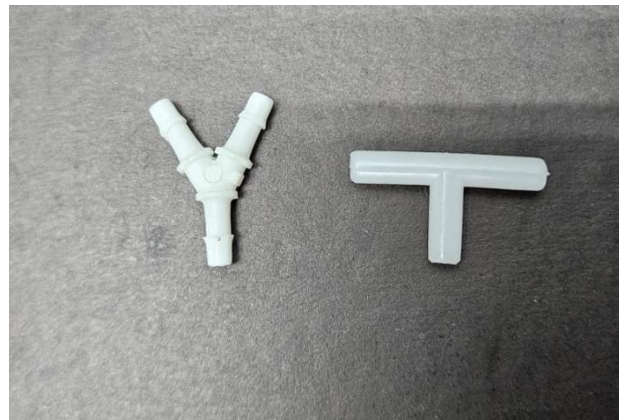
Figura 31 - Sistema de fixação da tubulação.



Fonte: Autor.

A proposta inicial de mistura das seringas ocorreu em um sistema de junção em T e em Y, com saída para outro conector *luer-lock* com agulha, conforme Figura 32:

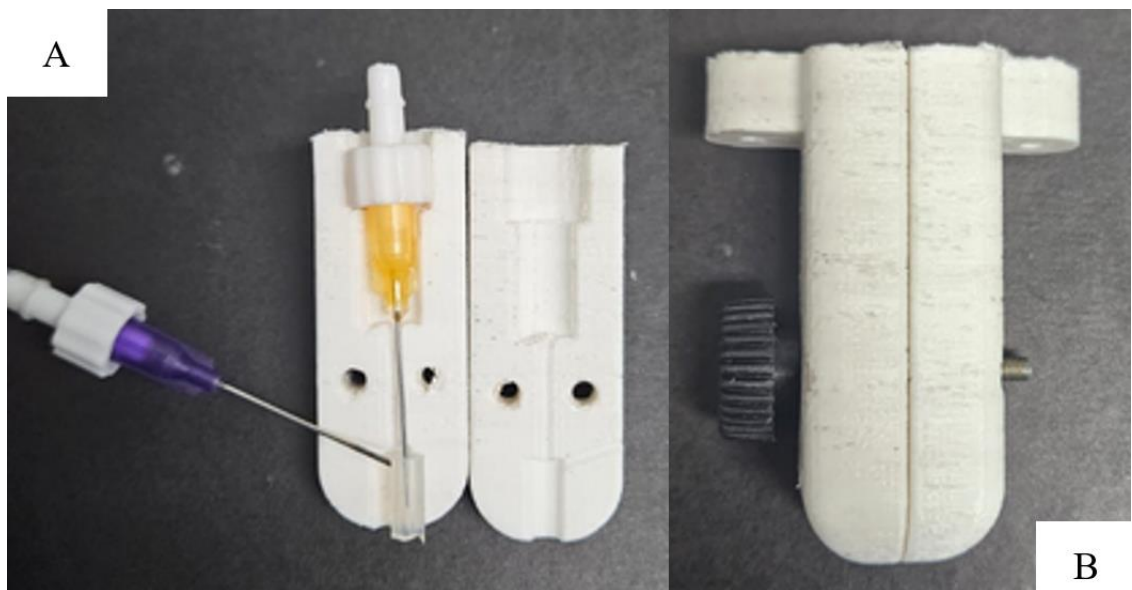
Figura 32 – Conectores *luer-lock* em Y e em T.



Fonte: Autor.

O misturador em T resultou em filamentos inconsistentes, com trechos reticulados em excesso e trechos sem reticulação, além de problemas com entupimento e acúmulo de pressão na agulha. Assim, a tentativa de utilizar um sistema de mistura em Y, reduzindo o ângulo de entrada dos fluidos. A necessidade de um bico de extrusão mais preciso para o funcionamento em coextrusão levou ao desenho final do sistema, conforme Figura 33:

Figura 33 – Bico de extrusão produzido para coextrusão, sendo a agulha superior para fluxo interno, e a agulha lateral para fluxo externo dentro do tubo de silicone. Em (A), o sistema bipartido desmontado para visualização. Em (B), o sistema montado e fechado para uso.



Fonte: Autor

O bico de coextrusão foi produzido para otimizar o fluxo de dois materiais, formando assim um fluxo efetivamente em coextrusão, onde a entrada superior é o fluxo interno em uma

agulha com diâmetros menores que 800  $\mu\text{m}$  e o fluxo externo (entrada lateral) é realizado a partir de um tubo de silicone/polietileno de 4 mm de diâmetro externo e 1 mm de diâmetro interno.

## 5.2 ESTUDO DOS HIDROGÉIS

Para avaliar teoricamente a relação de vazões entre as seringas, utilizando a equação 8 e assumindo a velocidade do êmbolo genérica de  $v = 1 \text{ mm/s}$ , estudou-se o fluxo teórico de cada seringa, comparando e obtendo a relação entre vazão da Seringa 1/vazão da Seringa 2:

Tabela 9 - Dados da análise de relação de vazão teórica das seringas utilizadas.

Relação entre vazões volumétricas (teórico, $v = 1 \text{ u.v.}$ )					
		Vazão Seringa 1			
		10 mL	5 mL	3 mL	1 mL
Vazão Seringa 2	10 mL	1,000	0,548	0,310	0,078
	5 mL	1,824	1,000	0,566	0,141
	3 mL	3,224	1,768	1,000	0,250
	1 mL	12,895	7,071	4,000	1,000

Fonte: Autor.

Ao utilizar os dados da Tabela 9, pode-se transformar as vazões volumétricas para vazões mássicas do alginato presente em soluções de 4% em peso e de átomos de cálcio presente em soluções de 5% em peso de  $\text{CaCl}_2$  em cada seringa (10 mL, 5 mL, 3 mL e 1 mL). Ao assumir soluções homogêneas, sabe-se que, para cada 100 mL (ou 100 g) de água, há 4 g de alginato e 5 g de  $\text{CaCl}_2$ . Portanto, em um fluxo genérico de 100 mLs, há 5 g de  $\text{CaCl}_2$  (ou 0,045 mol) fluindo por segundo e, conseqüentemente por relação molar, 1,8 g de íons cálcio em 100 mL/s.

$$Qm_{\text{alginato}} = Q_{\text{seringa}} * \frac{4 \text{ g}}{10^5 \text{ mm}^3} \quad (9)$$

$$Qm_{\text{Ca}} = Q_{\text{seringa}} * \frac{1,8 \text{ g}}{10^5 \text{ mm}^3} \quad (10)$$

Sendo  $Q_{\text{seringa}}$  como a medida de vazão teórica calculada para cada seringa e respectivos diâmetros. Assim, na Tabela 10, apresenta-se a relação entre vazão mássica de alginato em relação à vazão mássica de átomos de cálcio:

Tabela 10 – Estudo de relações mássicas para soluções de alginato 4% em peso e CaCl<sub>2</sub> 5% em peso,

Relação entre vazões mássicas [Qm Alg/Qm Ca]				
		Vazão mássica Ca 5%		
		10 mL	5 mL	3 mL
Vazão mássica alginato 4%	10 mL	2,220	4,048	7,155
	5 mL	1,217	2,220	3,924
	3 mL	0,689	1,256	2,220
	1 mL	0,172	0,314	0,555

Fonte: Autor.

Ao utilizar os valores da Tabela 4 como vazão, em transformação simples para 1 parte sendo 100 mL/s, têm-se uma vazão teórica de alginato em relação à vazão de íons cálcio. Ao comparar com os dados da Tabela 10 com a tabela 6, a proporção de íons de cálcio para cada grama de alginato no trabalho de Freeman e Kelly (2017) é menor do que nas relações aplicadas para as seringas presentes.

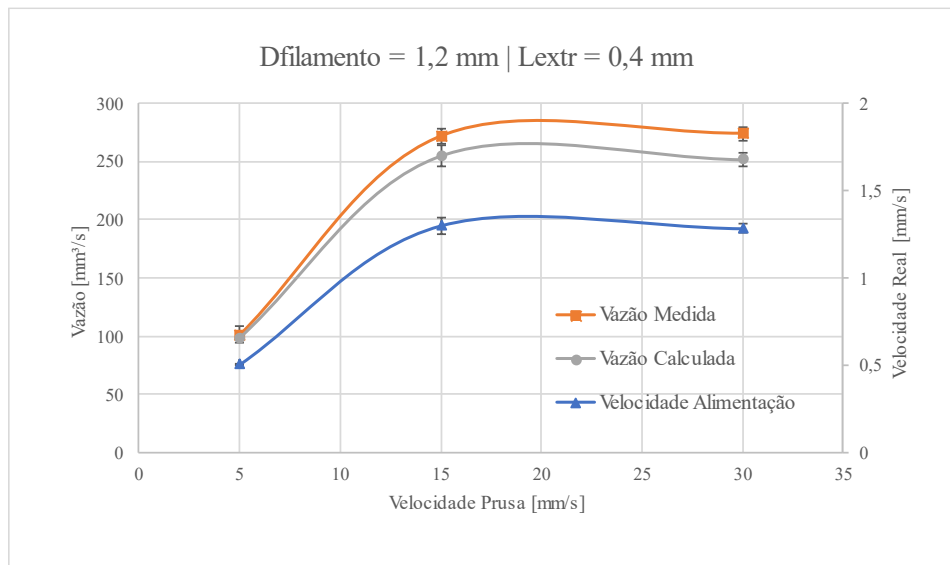
### 5.3 ESTUDO DAS VARIÁVEIS DE IMPRESSÃO

O estudo das variáveis de impressão que alteram o funcionamento do sistema em termos de velocidade foi realizado para avaliar a vazão e a velocidade real a partir das condições inseridas no software PrusaSlicer.

Ao analisar as velocidades do sistema, há duas velocidades: a velocidade de movimentação do eixo “ext”, ou seja, a velocidade de alimentação da seringa e a velocidade de deslocamento do sistema como um todo para tal deposição. A relação das duas velocidades em sistemas de impressão 3D tradicionais são proporcionais, onde cada trecho extrudado, deve ser depositado na mesa de impressão de forma uniforme, ou seja, para cada milímetro extrudado, a mesma distância deve ser movimentada ao bico de impressão para a deposição na mesa de impressão.

Ao fixar o diâmetro do filamento como 1,2 mm e a largura de extrusão em 0,4 mm, utilizando uma seringa de 10 mL de 15,8 mm de diâmetro interno, a velocidade no software foi alterada em 5 mm/s, 15 mm/s e 30 mm/s (Velocidade Prusa) para analisar a velocidade real de movimentação da barra transversal (Velocidade Real).

Figura 34 – Análise de variáveis de impressão. Diâmetro do filamento e largura de extrusão fixos. Velocidade Prusa (velocidade do software) variável.



Fonte: Autor.

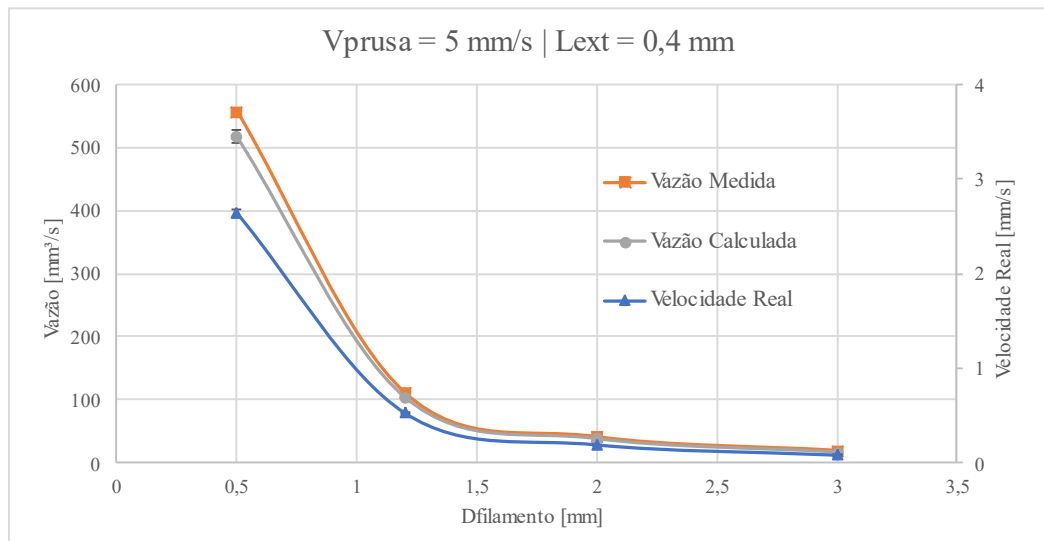
Para tais condições, a velocidade real de extrusão é cerca de 10 vezes menor do que a velocidade inserida no software, possuindo um máximo de 1,4 mm/s e tendenciando à uma estabilidade em assíntota. A diferença em questão possui variáveis correlatas com o sistema de impressão 3D FDM original da impressora, antes da adaptação, e ao sistema atual.

Ao utilizar o sistema original da impressora FDM, as condições aplicadas ao software calculam o funcionamento do motor de passo para extrusão de um filamento com diâmetro definido e a quantidade de material necessário para deposição com uma largura de extrusão definida. Assim, a alteração das variáveis de impressão altera o funcionamento da impressora conforme a extrusão de um filamento, mesmo que inexistente devido à adaptação para bioimpressão.

A adaptação ao sistema de bioimpressão possui um sistema de correia para transferir torque e energia para o eixo roscado. A relação de diâmetros entre o tensor do motor de passo e o tensor do eixo roscado é de 1 para 3. A adaptação do sistema da bioimpressora apresenta que a entrada do dado de 1 mm de movimentação no eixo de extrusão resulta em aproximadamente 1 mm de movimentação real do extrusor, porém para entrada de dados de 10 mm, por exemplo, o a movimentação real é de aproximadamente 15 mm.

Ao fixar a velocidade do software (Velocidade Prusa) em 5 mm/s, e a largura de extrusão em 0,4 mm e variar o diâmetro do filamento, têm-se:

Figura 35 – Análise de variáveis de impressão. Velocidade Prusa (software) e largura de extrusão fixos. Diâmetro do filamento variável.

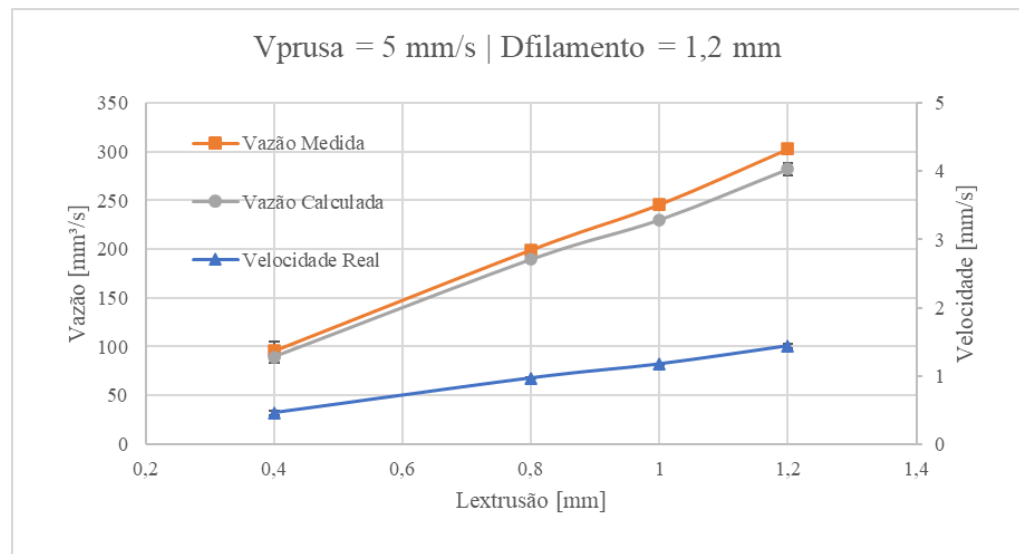


Fonte: Autor.

Assim como na variação de velocidade, a variação do diâmetro do filamento gerou uma tendência para valores menores que  $0,1 \text{ mm/s}$ . Para diâmetros de filamento menores que  $1$ , a velocidade (e conseqüentemente a vazão) aumentam consideravelmente. Sendo um filamento menor, surge a necessidade de um fluxo maior para complementar uma largura de extrusão de  $0,4 \text{ mm}$ , no caso de impressão 3D FDM tradicional. Ressalta-se que o diâmetro tradicional de um filamento comercial é de  $1,75 \text{ mm}$ . Nestas condições, o processamento de um filamento tradicional de  $1,75 \text{ mm}$  teria velocidade de aproximadamente  $0,2 \text{ mm/s}$ .

Assim, ao fixar a velocidade do software em  $5 \text{ mm/s}$  e o diâmetro do filamento em  $1,2 \text{ mm}$ :

Figura 36 – Análise de variáveis de impressão. Velocidade Prusa (software) e diâmetro do filamento fixos. Largura de extrusão variável.



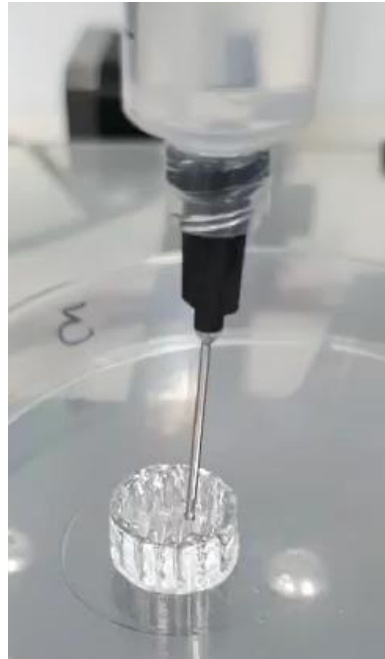
Fonte: Autor.

As vazões medidas e calculadas para todos os ensaios foram próximas, confirmando a hipótese de que o diâmetro interno da seringa rege a vazão do sistema junto com a velocidade. A diferença entre vazão calculada e vazão medida, provavelmente, está na irregularidade da circularidade da seringa.

O aumento da variável de "largura de extrusão" resultou no aumento da velocidade de extrusão e, conseqüentemente, das vazões. Ao utilizar o exemplo da impressora 3D tradicional, o aumento da largura de extrusão exige mais material para ser depositado em cada unidade de comprimento linear, ou seja, maior velocidade para aumentar a vazão.

O estudo das propriedades cercou as variáveis para condições de bioimpressão para funcionamento em torno de 0,5 mm/s de velocidade. Ao realizar uma bioimpressão teste com uma seringa, alimentada com poloxâmero 407 com 22% em peso e aquecido até 40 °C, o diâmetro do filamento de 1,2 mm, largura de extrusão de 0,4 mm e velocidade do software de 5 mm/s, a deposição foi consistente, mantendo a estrutura e geometria, conforme a Figura 37:

Figura 37 – Biopressão teste utilizando poloxâmero 407 em 20% em peso.



Fonte: Autor.

O uso das condições de processamento estudadas anteriormente se mostrou ideal para a bioimpressão de uma seringa com um hidrogel adequado para bioimpressão 3D, na qual reologia será discutida posteriormente. O teste de bioimpressão apresentado mostrou precisamente otimizado, sendo utilizado para discussão e comparação das propriedades de viscosidade do poloxâmero 407 posteriormente no tópico 5.5 “ANÁLISE REOLÓGICA DOS HIDROGÉIS”. Em vias de comparação, as vazões de uma seringa, assumindo velocidade genérica de 1 mm/s:

Tabela 11 – Vazão calculada para cada seringa utilizando  $v = 1$  mm/s.

Seringa	Vazão	Unidade
10 mL	784,267	mm <sup>3</sup> /s
5 mL	430,053	mm <sup>3</sup> /s
3 mL	243,285	mm <sup>3</sup> /s
1 mL	60,821	mm <sup>3</sup> /s

Fonte: Autor.

Ao realizar impressões com duas seringas, a vazão é composta pela vazão das duas seringas, como apresentado na Tabela 12 com velocidade genérica de 1 m/s e ignorando qualquer tipo de reação química ou física:

Tabela 12 – Análise de vazões em sistemas de duas seringas.

		Vazão Volumétrica final (Q1 + Q2) [mm <sup>3</sup> /s]			
		Vazão Seringa 1			
		10 mL	5 mL	3 mL	1 mL
Vazão Seringa 2	10 mL	1568,534	1214,320	1027,552	845,088
	5 mL	1214,320	860,105	673,338	490,874
	3 mL	1027,552	673,338	486,570	304,106
	1 mL	845,088	490,874	304,106	121,642

Fonte: Autor.

Assim, ao utilizar o sistema de duas seringas, a vazão é maior do que o sistema de uma, mas a velocidade de movimentação do sistema da bioimpressora é a mesma, ainda calculada sobre as funções originais da impressora. Ao comparar, por exemplo, o fluxo de uma seringa de 10 mL isolada e uma composição de uma seringa de 10 mL e uma de 3 mL, o fluxo do sistema duplo contém 31% mais material, resultando em acúmulo de material na ponta da impressora. As soluções serão discutidas posteriormente.

#### 5.4 PROTOTIPAGEM DO SISTEMA DE COEXTRUSÃO

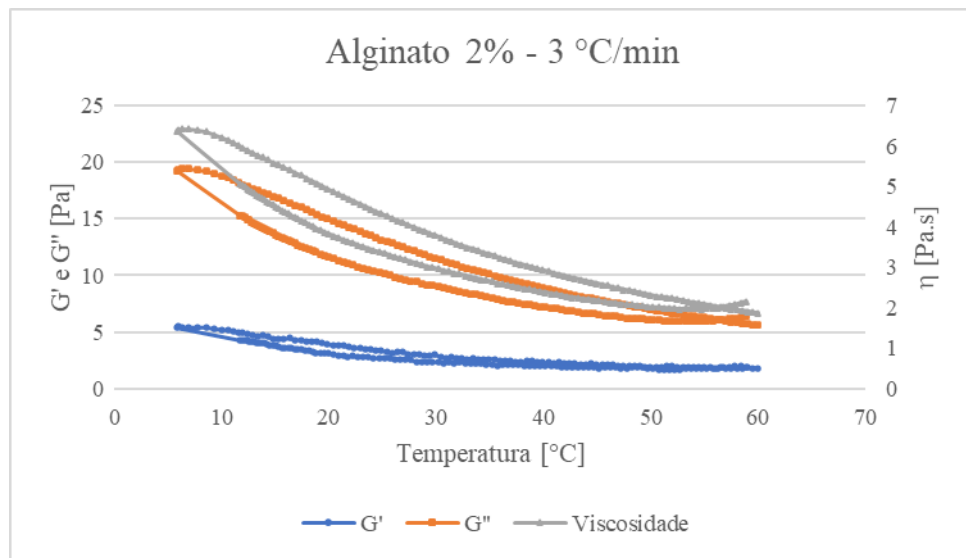
A proposta de desenvolver peças por impressão 3D FDM tradicional resultou na limitação de projeto da seringa de coextrusão pela dificuldade de impressão de paredes finas em peças compridas. Assim, a proposta de um sistema de coextrusão com duas seringas se tornou viável para simplificar o sistema, com sistemas adaptativos de fluxos internos e externos a partir das seringas utilizadas.

#### 5.5 ANÁLISE REOLÓGICA DOS HIDROGÉIS

O estudo do comportamento reológico dos componentes dos hidrogéis e das misturas mostrou a relação da capacidade de impressão de cada material e a viscosidade.

Apresenta-se o ensaio dos parâmetros reológicos  $G'$ ,  $G''$  e viscosidade em função da temperatura para o alginato 2% em peso:

Figura 38 – Ensaio em reometria oscilatório de viscosidade x temperatura 60 °C – 5°C – 60°C de alginato de sódio 2% em peso.

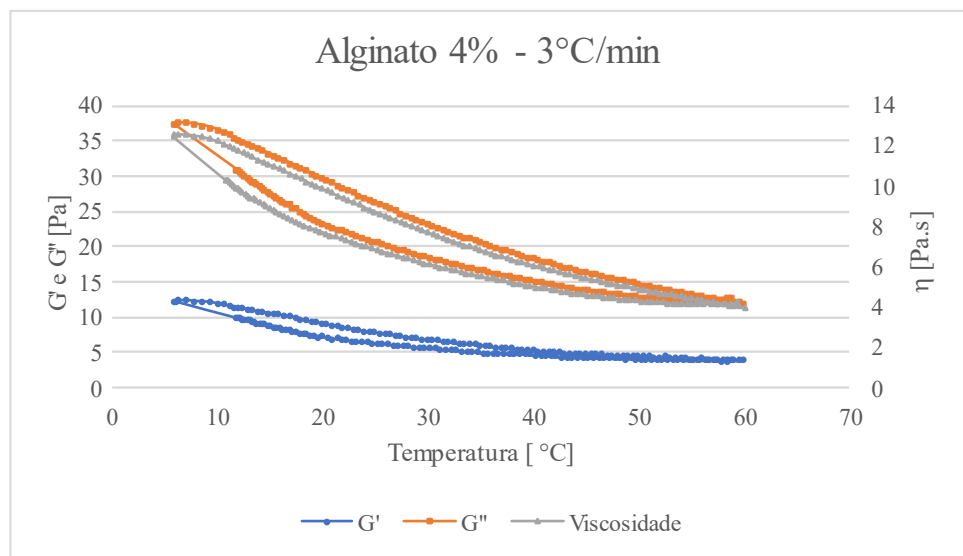


Fonte: Autor.

O ensaio de viscosidade do alginato de sódio 2% em peso ressaltou a influência da temperatura na viscosidade, principalmente abaixo de 30 °C. A viscosidade do alginato utilizado neste estudo possui um pico máximo de viscosidade a 5 °C de 6,4 Pa.s. A relação de  $G'$  e  $G''$  apresentou um fator viscoso ( $G''$ ) mais influente quando comparado ao ( $G'$ ), sendo um material com comportamento reológico predominantemente viscoso, e não elásticos, em toda extensão da temperatura estudada

A Figura 39 apresenta o ensaio de viscosidade em função da temperatura para o alginato 4% em peso:

Figura 39 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade x temperatura 60 °C – 5°C – 60°C de alginato de sódio 4% em peso.



Fonte: Autor.

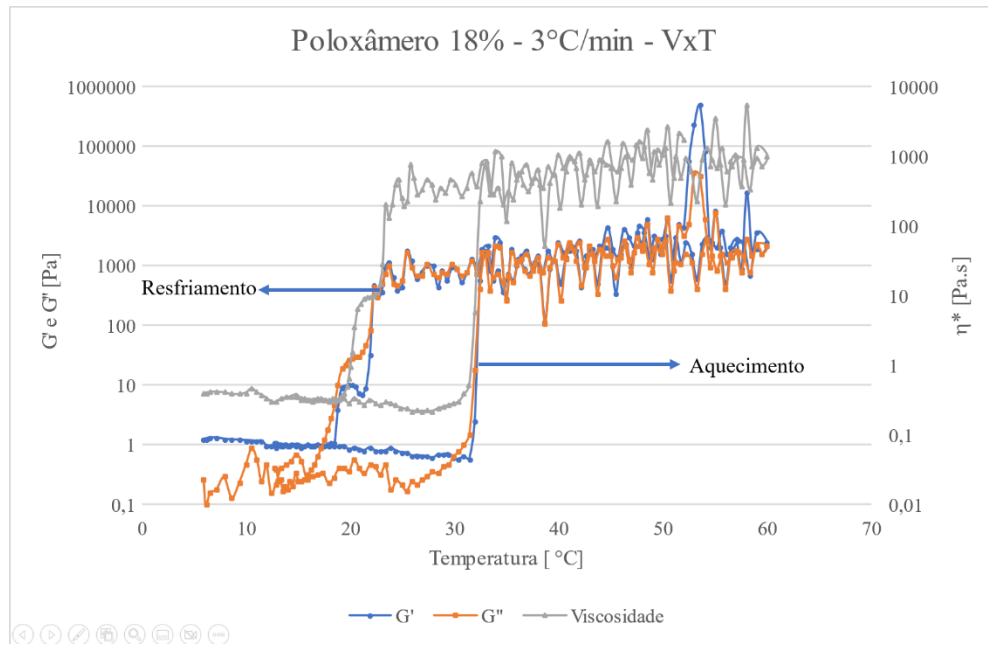
Assim como o alginato em 2% em peso, o alginato em 4% em peso apresentou mudança de comportamento reológico em temperaturas abaixo de 30 °C, com ascensão da viscosidade de 4,3 Pa.s (60 °C) para 12,6 Pa.s (5 °C). Outra semelhança é a relação superior de efeito viscoso ( $G''$ ) em relação ao efeito elástico ( $G'$ ), o que demonstra que o material se comporta essencialmente como um fluido viscoso e não como um hidrogel em função da ausência da reticulação.

O aumento no teor de alginato resultou no aumento da viscosidade para 60°C de 160% (1,8 Pa.s para 4,3Pa.s), e 97% para 5°C. O fator  $G'$  do alginato 2% em peso em 5 °C foi de 5,5 Pa, enquanto o alginato 4% em peso foi de 12,5 Pa, sendo uma mudança de 127%, mas ainda insuficiente para bioimpressão 3D. As duas concentrações apresentaram histerese no ciclo de temperatura, indicando que a redução de liberdade de movimentação molecular das cadeias ocasionada pela redução da temperatura possui não ocorre de forma instantânea e dependente da troca de calor dentro do próprio fluido.

Adhikari *et al.* (2020) estudaram a reologia do alginato de sódio em 5% em peso com 1% em peso de quitosana, onde a relação dos autores apresentou que a solução resultava em fatores elásticos mais influentes do que fatores viscosos. Ao comparar os resultados de Adhikari *et al.* (2020) com os resultados obtidos pela reologia, a diferença de viscosidade e relação  $G'/G''$  evidencia a dificuldade de bioimpressão encontrada com tipo de alginato utilizado para este trabalho (resultados apresentados posteriormente) [62].

Apresenta-se o ensaio de viscosidade em função da temperatura para amostra de 18% em peso de poloxâmero 407:

Figura 40 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade x temperatura 5 °C – 60°C – 5°C de poloxâmero 407 18% em peso.



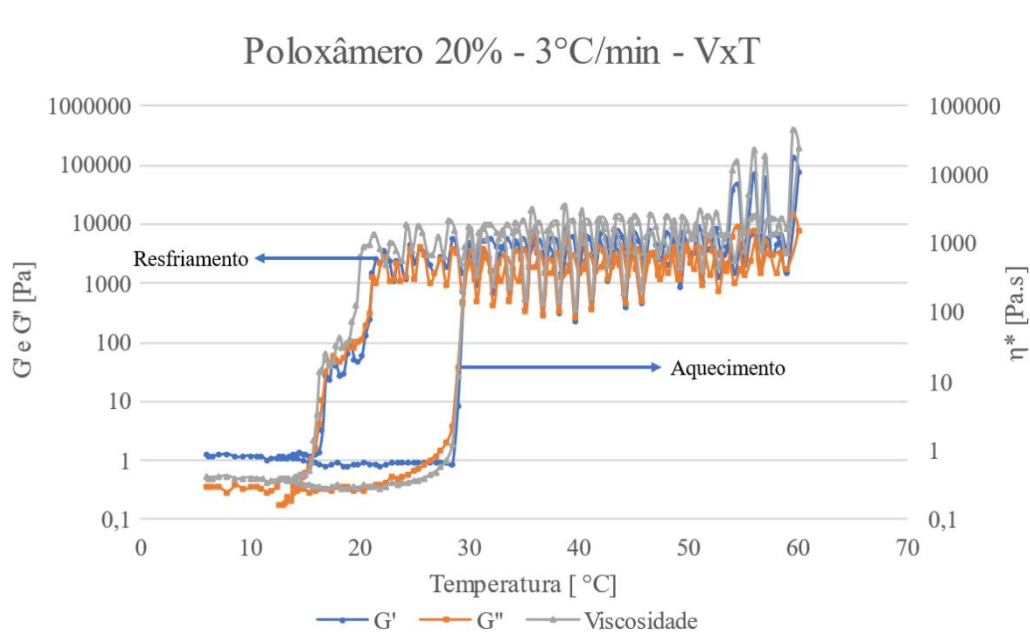
Fonte: Autor.

Ao estudar o poloxâmero 407, a propriedades mais influente na viscosidade do material é a alteração de propriedade com a temperatura. Em 32,4 °C, o poloxâmero formou micelas e gelificou com efeito termorreversível, onde a viscosidade e os fatores  $G'$  e  $G''$  aumentaram em 5 ordens de grandezas. A reversibilidade do sistema possui histerese no resfriamento (23,1 °C), gerando uma lacuna de trabalhabilidade sobre temperatura para o sistema.

Assim, apesar do sistema da bioimpressora não possuir controle de temperatura, as soluções de alginato devem ser bioimpressas em temperaturas entre 5 °C e 10 °C. Os hidrogéis de poloxâmero 407 devem ser bioimpressos em temperaturas acima de 30 °C, visto que estão em estado micelizado/gelificado.

Apresenta-se o ensaio de viscosidade em função da temperatura para o poloxâmero 407 20% em peso:

Figura 41 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade x temperatura 5 °C – 60°C – 5°C de poloxâmero 407 20% em peso.



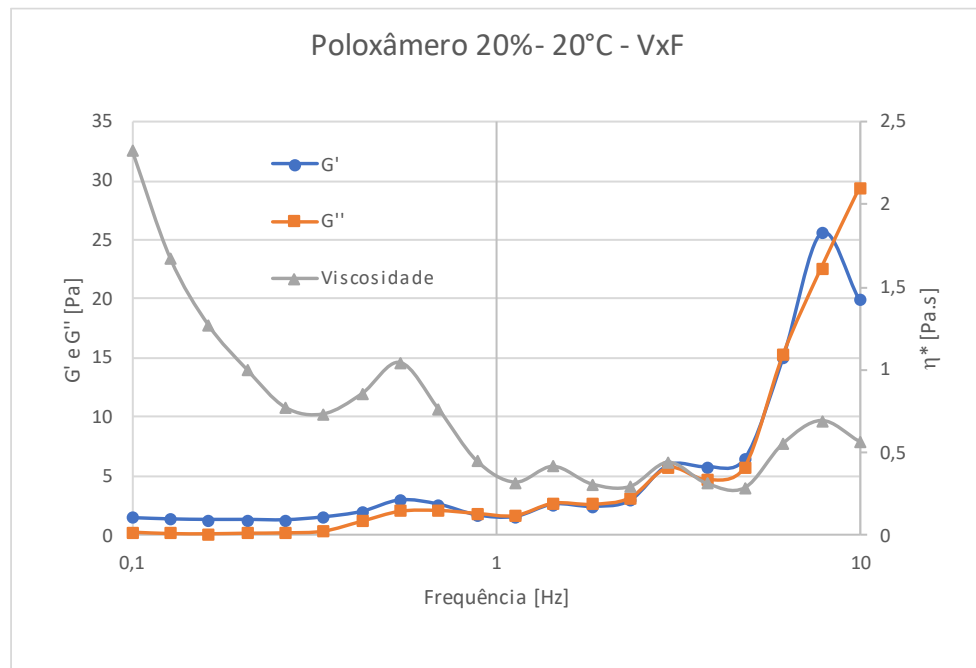
Fonte: Autor.

A flutuação de dados dos dois ensaios deve-se às micelas serem quebradas pela tensão necessária para deslocamento de aproximadamente 10° do ensaio, gerando um ciclo de montagem da estrutura micelar (pela temperatura) e quebra de tais estruturas (pela tensão do ensaio). A aproximação entre a influência viscosa ( $G''$ ) e a influência elástica ( $G'$ ) dos dois ensaios mostra que a estruturação do sistema possui maior equilíbrio entre as propriedades. A combinação entre elevados teores de  $G'$  e  $G''$  (acima de 10.000 Pa) e a viscosidade acima de 1000 Pa.s contribuem para que o poloxâmero seja referência para a *printability* de qualquer hidrogel. A impressão deste material será discutida posteriormente.

O poloxâmero 407 em 20% em peso apresentou menor temperatura de micelização (29,3 °C), mas ainda com histerese no resfriamento (19,3 °C) ao comparado com o poloxâmero com 18% em peso. Callan *et al.* (2017) apresentaram um estudo concluindo que, para maiores teores de poloxâmero, menor é a temperatura de micelização, justificado pelo número de agregados para formação de micelas em cada teor de poloxâmero: quanto mais material, mais núcleos de aglomeração e maior efeito à viscosidade, reduzindo a temperatura de transição [65].

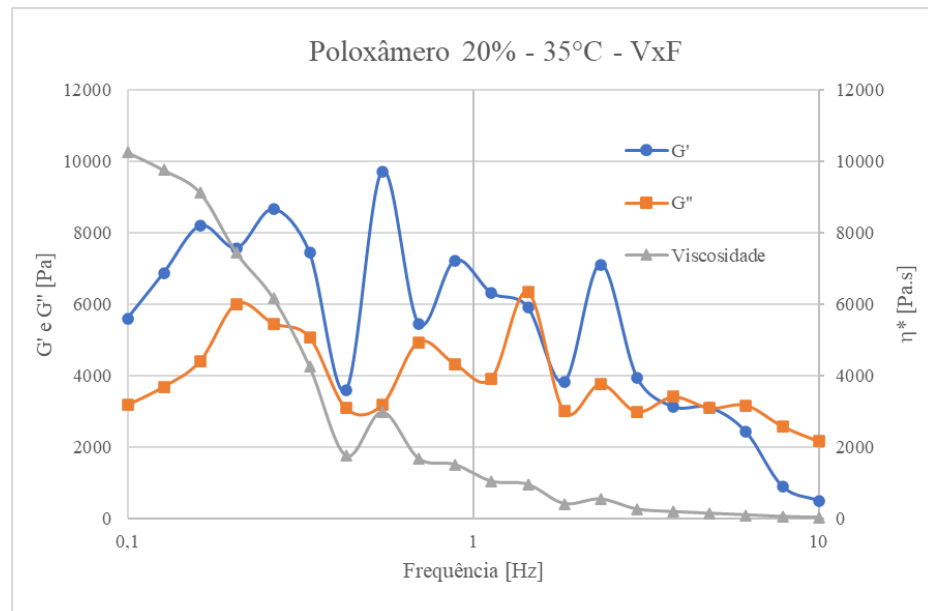
Ao ensaiar o poloxâmero de 20% em temperatura constante variando a frequência, têm-se o resultado apresentado nas figuras 42 e 43:

Figura 42 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade em função da frequência para Poloxâmero 20% em peso, ensaiado a 20°C.



Fonte: Autor.

Figura 43 – Ensaio em reometria oscilatória de viscosidade em função da frequência para Poloxâmero 20% em peso, ensaiado a 35°C.



Fonte: Autor.

A diferença de propriedades nas duas temperaturas em questão mostra que a estruturação das micelas do poloxâmero estabilizam as propriedades para bioimpressão 3D,

com aumento da viscosidade e dos fatores elásticos. A Figura 37 apresentou uma bioimpressão teste usando o poloxâmero 407 em 20% em peso realizada para teste e referência.

A estrutura cilíndrica de 20 mm de diâmetro foi bioimpressa como referência para as outras estruturas que serão discutidas posteriormente. A amostra bioimpressa apresentou elevada estabilidade em relação próprio peso, mantendo a forma conforme o projeto durante todo o processo de impressão. Ao estabilizar a temperatura com a temperatura ambiente, a estrutura bioimpressa se desfez pela desestruturação da estrutura micelar do poloxâmero. A fidelidade de forma e a *printability* do modelo de poloxâmero podem ser observadas com o contorno das linhas de preenchimento da amostra.

## 5.6 REPROJETO DA BIOIMPRESSORA 3D

Ao alterar a barra transversal do sistema, a bioimpressão em uma seringa foi melhorada. Ao evitar que a resistência ao escoamento do fluido da seringa reagisse como momento à barra transversal, flexionando a barra, a tensão exercida pelo motor de passo tornou o sistema mais preciso, dissipando menor energia do motor em forma de flexão. O carro de impressão produzido com encaixe simétrico entre as seringas apresentou um funcionamento similar ao inicial, mas permitiu a melhor acoplagem das seringas ao sistema.

Ao produzir o sistema de encaixes para duas seringas, o sistema simétrico foi responsável por otimizar flexões causadas por dois fluidos, assim equilibrando a barra transversal com as duas seringas em dois momentos fletores distintos, simétricos e opostos.

Ao utilizar o sistema de seringas com conectores em T com alginato 4% em peso na seringa de 10 mL e  $\text{CaCl}_2$  em 5% em peso na seringa de 5 mL, realizando de forma manual, foram produzidos filamentos promissores, conforme Figura 44:

Figura 44 – Filamento produzido manualmente com sistema de seringas em T.

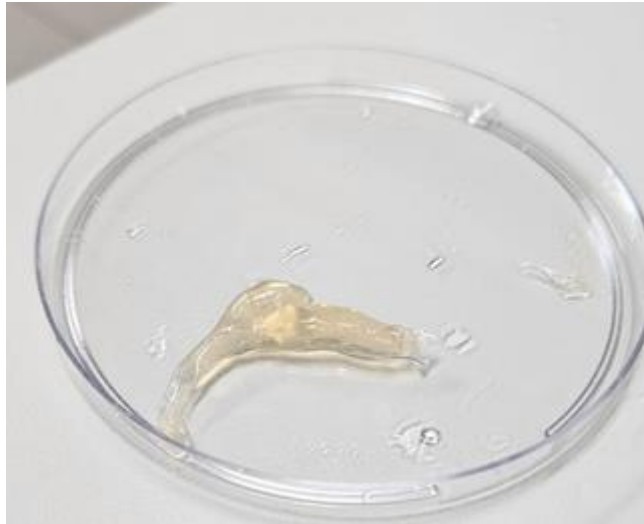


Fonte: Autor.

Ao utilizar uma agulha ao final do sistema em T, a reticulação do alginato de sódio não permitiu que o material se conformasse para fluir pela agulha, sejam agulhas mais grossas de 14G (1,8 mm de diâmetro interno) ou mais finas de 21 G (0,8 mm de diâmetro interno) Assim, o misturador em T apresentou uso possível, mas impreciso para as dimensões do sistema estudado, onde a espessura dos filamentos necessários é de 0,4 mm a 1 mm.

Anexando o sistema de mistura em T à bioimpressora, sem o uso de agulha para deposição, o sistema apresentou bolhas, com superfície reticulada e interior com alginato líquido. As bolhas foram causadas pela mistura não homogênea dos materiais, possivelmente causado pela mistura em 180°, onde o alginato é mais viscoso que o  $\text{CaCl}_2$  e, portanto, possui maior energia ao entrar no sistema em T.

Figura 45 – Bolha presente na mistura de alginato/ $\text{CaCl}_2$  em tentativa de bioimpressão 3D.



Fonte: Autor.

Com as dificuldades encontradas no sistema de mistura pela rápida cinética de reticulação do alginato de sódio em  $\text{CaCl}_2$ , o desenvolvimento de um bico de extrusão coaxial sanaria a dificuldade do ponto de mistura do sistema, evitando assim entupimentos, bolhas e falta de vazão de material. O bico de extrusão coaxial foi desenvolvido e incorporado à bioimpressora 3D.

Assim como no misturador em T, o teste do sistema feito com acionamento manual das seringas apresentou um filamento possível de ser bioimpresso, como mostra a Figura 46:

Figura 46 – Filamento produzido utilizando o bico de coextrusão projetado e construído, acionando as seringas manualmente.



Fonte: Autor.

O filamento produzido manualmente, tanto pelo misturador em T quanto pelo bico de extrusão coaxial, mostrou que a composição e estruturação dos materiais está de acordo com o necessário.

Os hidrogéis utilizados geraram filamentos adequados quando produzidos manualmente. O alginato de sódio (4%) e o  $\text{CaCl}_2$  (5%) mostrou que a necessidade de maior teor de agente reticulante é necessário para a formação do filamento. Porém, a impossibilidade de bioimpressão 3D é justificada pelo sistema da bioimpressora e a relação de velocidades.

A bioimpressora 3D possui duas velocidades, sendo a velocidade de movimentação dos eixos X e Y e a velocidade de extrusão de material. Nota-se que, nos testes manuais de mistura em T e extrusão coaxial, a deposição de um filamento foi adequada controlando a velocidade e a posição para que o filamento fosse contínuo e disperso nas placas de petri. Os dois métodos, ao serem anexados à bioimpressora 3D apresentam problemas para serem bioimpressos, gerando bolhas, filamentos não contínuos e deposição inadequada.

Ao utilizar a bioimpressora 3D em sistemas de mistura e extrusão coaxial, a deposição não ocorre na velocidade que deve ser realizada, pois a velocidade de extrusão é maior do que a velocidade dos eixos X e Y. Ao ser extrudado mais material reticulado do que a velocidade de movimentação dos eixos X e Y permite o material, ao invés de ser depositado, acumula na ponta do sistema, sendo arrastado junto ao bico de extrusão.

Para corrigir a relação de velocidades, pode-se alterar o tensor do motor de passo para um de maior diâmetro, alterando a relação de engrenagens e, portanto, reduzindo a velocidade do extrusor e, tornando-a comparável com a velocidade dos eixos de movimentação da impressora.

## 6 CONCLUSÕES

Os sistemas atuais de bioimpressão 3D possuem limitações relacionadas aos hidrogéis e às bioimpressoras, sendo de elevado custo e baixa disponibilidade. Ao produzir um sistema de extrusão de duas agulhas com controle de vazão pela seringa, a complexidade do sistema se reduz, assim como o custo, visto que a bioimpressora em questão é uma adaptação de uma Ender 3 v1 de FDM.

A estrutura projetada para impressão em duas seringas se mostrou promissora, com controle de vazão pela velocidade do sistema e diâmetro interno da seringa. Assim, as relações de vazão encontradas permitem que cada hidrogel seja adequado para a bioimpressão 3D a partir de cada necessidade.

Os hidrogéis de poloxâmoro 407 que obtiveram *printability* adequada mostram que as propriedades reológicas necessárias para bioimpressão 3D são adequadas quando comparado ao alginato utilizado, pois os fatores  $G'$  e  $G''$  são semelhantes em temperaturas acima de 30 °C, proporcionando o comportamento viscoelástico necessário para o processo. Assim, para obter um alginato que possui comportamento reológico adequado ao processo, mecanismos de reticulação podem ser utilizados, visto que a reação de reticulação é instantânea.

Os materiais utilizados para obtenção de hidrogéis foram materiais de baixo custo, sem controle reológico focado em bioimpressão, gerando filamentos promissores nos testes preliminares. Ao serem utilizados com sistemas de mistura em T, o filamento gerado para bioimpressão 3D foi heterogêneo com bolhas de fluido, regiões sem reticulação e regiões com reticulação acima do necessário, mas possíveis de serem bioimpressos se aperfeiçoados. Testes manuais mostraram que as dificuldades dos sistemas de mistura estão nas relações de velocidade da impressora, mas os hidrogéis foram adequados.

Assim, conclui-se que as condições dos hidrogéis foram satisfeitas para bioimpressão 3D, podendo-se obter hidrogéis possíveis de serem bioimpressos por meios de mistura e extrusão coaxial.

Conclui-se, também, que as alterações estruturais da bioimpressora 3D otimizaram o sistema e corrigiram erros existentes no projeto inicial da impressora, além de permitir a acoplagem e uso de duas seringas ao sistema. A impossibilidade de bioimpressão se deu pela adaptação inicial do sistema, onde as relações de velocidade e extrusão, por ser uma impressora adaptada, não foram satisfatoriamente adequadas para uma bioimpressora, a partir do projeto da impressora FDM tradicional.

Por fim, aperfeiçoamentos são necessários para que a impressora seja utilizada a fim de permitir a extrusão coaxial, na qual alterações no software e hardware da bioimpressora podem tornar o projeto viável e confiável, objetivando a bioimpressões para hidrogéis não-específicos. Alguns aperfeiçoamentos foram sugeridos, como alteração do tensor do motor de passo, montagem de um sistema independente para as duas seringas e alteração da programação da bioimpressora para se adequar às condições de coextrusão

## 7 SUGESTÕES DE APERFEIÇOAMENTOS E TRABALHOS FUTUROS

Alterações do sistema da bioimpressora podem ser realizadas, como a troca do motor de passo, procurando aumentar o torque intrínseco máximo do motor atual. Assim, um motor com maior torque poderia extrudar materiais mais viscosos que o poloxâmero 407 gelificado, sendo possível utilizar materiais ainda mais próximos daqueles ideais para bioimpressão 3D.

Por fim, a utilização de dois motores de passo independentes para o fluxo de polímero e agente reticulante torna o sistema ainda mais preciso para diferentes sistemas, sendo adaptados para diversos tipos materiais. Ainda, o uso de *Peltier* ou outros sistemas de aquecimento permitirá maior controle ao processo de bioimpressão, controlando ainda mais as condições de processamento dos materiais.

## REFERÊNCIAS

- [1] CLARA-TRUJILLO, Sandra; FERRER, Gloria Gallego; RIBELLES, José Luis Gómez. In Vitro Modeling of Non-Solid Tumors: how far can tissue engineering go?. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 21, n. 16, p. 5747-5778, 11 ago. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165747>.
- [2] KRUIJATZ, Felix; DANI, Sophie; WINDISCH, Johannes; EMMERMACHER, Julia; HAHN, Franziska; MOSSHAMMER, Maria; MURTHY, Swathi; STEINGRÖWER, Juliane; WALTHER, Thomas; KÜHL, Michael. Think outside the box: 3d bioprinting concepts for biotechnological applications recent developments and future perspectives. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 58, n. 1, p. 107930, set. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107930>.
- [3] HARDING, A.; PRAMANIK, A.; BASAK, A.K.; PRAKASH, C.; SHANKAR, S.. Application of additive manufacturing in the biomedical field- A review. **Annals Of 3D Printed Medicine**, [S.l.], v. 10, p. 100110, maio 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stlm.2023.100110>.
- [4] JACOB, Guillermo Tejada; PASSAMAI, Verónica E.; KATZ, Sergio; CASTRO, Guillermo R.; ALVAREZ, Vera. Hydrogels for extrusion-based bioprinting: general considerations. **Bioprinting**, [S.l.], v. 27, p. 212, ago. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00212>.
- [5] SHIN, Ji Youn; YEO, Yong Ho; JEONG, Jae Eun; PARK, Su A.; PARK, Won Ho. Dual-crosslinked methylcellulose hydrogels for 3D bioprinting applications. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 238, p. 116192, jun. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116192>.
- [6] GIBSON, Ian; ROSEN, David; STUCKER, Brent. **Additive Manufacturing Technologies: 3d printing, rapid prototyping, and direct digital manufacturing**. 2. ed. New York: Springer, 2015. 498 p.
- [7] GU, Zeming *et al.* Development of 3D bioprinting: from printing methods to biomedical applications. **Asian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, [S.l.], v. 15, n. 5, p. 529-557, set. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.003>.
- [8] KLEBE, R. Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. **Experimental Cell Research**, [S.l.], v. 179, n. 2, p. 362-373, dez. 1988. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90275-3](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90275-3).
- [9] ODDE, David J.; RENN, Michael J.. Laser-guided direct writing for applications in biotechnology. **Trends In Biotechnology**, [S.L.], v. 17, n. 10, p. 385-389, out. 1999. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799\(99\)01355-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-7799(99)01355-4).
- [10] LANDERS, Rüdiger *et al.* Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. **Biomaterials**, [S.L.], v. 23, n. 23, p. 4437-4447, dez. 2002. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00139-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00139-4).

- [11] WILSON, W. Cris; BOLAND, Thomas. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, [S.l.], v. 272, n. 2, p. 491-496, 15 abr. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ar.a.10057>.
- [12] SKARDAL, Aleksander *et al.* Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds. **Stem Cells Translational Medicine**, [S.l.], v. 1, n. 11, p. 792-802, 29 out. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2012-0088>.
- [13] NOOR, Nadav *et al.* 3D Printing of Personalized Thick and Perfusible Cardiac Patches and Hearts. **Advanced Science**, [S.l.], v. 6, n. 11, p. 1900344, 15 abr. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/advs.201900344>.
- [14] FOYT, Daniel A. *et al.* Exploiting Advanced Hydrogel Technologies to Address Key Challenges in Regenerative Medicine. **Advanced Healthcare Materials**, [S.l.], v. 7, n. 8, p. 1700939, 9 jan. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/adhm.201700939>.
- [15] AGARWAL, Swarnima *et al.* Current Developments in 3D Bioprinting for Tissue and Organ Regeneration—A Review. **Frontiers In Mechanical Engineering**, [S.l.], v. 6, 30 out. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmech.2020.589171>.
- [16] HOLBAN, A.M.; GRUMEZESCU, A. M. (eds.). **Materials for Biomedical Engineering: hydrogels and polymer-based scaffolds**. Amsterdam: Elsevier, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2017-0-04477-4>
- [17] COSTANTINI, Marco *et al.* Coaxial wet-spinning in 3D bioprinting: state of the art and future perspective of microfluidic integration. **Biofabrication**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 012001, 9 nov. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/1758-5090/aae605>.
- [18] TRUBY, Ryan L.; LEWIS, Jennifer A.. Printing soft matter in three dimensions. **Nature**, [S.l.], v. 540, n. 7633, p. 371-378, 14 dez. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature21003>.
- [19] WEI, Qinghua *et al.* Design and evaluation of sodium alginate/polyvinyl alcohol blend hydrogel for 3D bioprinting cartilage scaffold: molecular dynamics simulation and experimental method. **Journal of Materials Research And Technology**, [S.l.], v. 17, p. 66-78, mar. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.12.130>.
- [20] NI, Tianyu *et al.* 3D Bioprinting of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Laden Silk Fibroin Double Network Scaffolds for Cartilage Tissue Repair. **Bioconjugate Chemistry**, [S.l.], v. 31, n. 8, p. 1938-1947, 9 jul. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00298>.
- [21] NAGHIEH, Saman; CHEN, Xiongbiao. Printability—A key issue in extrusion-based bioprinting. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, [S.l.], v. 11, n. 5, p. 564-579, out. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2021.02.001>.
- [22] JONGPRASITKUL, Hatai; TURUNEN, Sanna; PARIHAR, Vijay Singh; KELLOMÄKI, Minna. Two-step crosslinking to enhance the printability of methacrylated gellan gum biomaterial ink for extrusion-based 3D bioprinting. **Bioprinting**, [S.l.], v. 25, mar. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00185>.

- [23] MUELLER, Eva *et al.* Click Chemistry Hydrogels for Extrusion Bioprinting: progress, challenges, and opportunities. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 23, n. 3, p. 619-640, 6 jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01105>.
- [24] HONG, Soyoung *et al.* Coaxial bioprinting of cell-laden vascular constructs using a gelatin–tyramine bioink. **Biomaterials Science**, [S.l.], v. 7, n. 11, p. 4578-4587, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/c8bm00618k>.
- [25] LI, Huan *et al.* Three-Dimensional Bioprinting of Perfusable Hierarchical Microchannels with Alginate and Silk Fibroin Double Cross-linked Network. **3D Printing And Additive Manufacturing**, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 78-84, 1 abr. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/3dp.2019.0115>.
- [26] FREEMAN, Fiona E.; KELLY, Daniel J.. Tuning Alginate Bioink Stiffness and Composition for Controlled Growth Factor Delivery and to Spatially Direct MSC Fate within Bioprinted Tissues. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 7, n. 1, 6 dez. 2017 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-17286-1>.
- [27] AHMED, Enas M.. Hydrogel: preparation, characterization, and applications. **Journal Of Advanced Research**, [S.l.], v. 6, n. 2, p. 105-121, mar. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [28] WANG, Shanshan *et al.* Receptor-Mediated Drug Delivery Systems Targeting to Glioma. **Nanomaterials**, [S.l.], v. 6, n. 1, p. 3, 28 dez. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nano6010003>.
- [29] YAN, Le-Ping *et al.* Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [S.l.], v. 95, n. 2, p. 465-475, 20 jul. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.32869>.
- [30] ROVETTA, R.; PALLAVICINI, A.; GINESTRA, P.s.. Bioprinting process optimization: case study on pva (polyvinyl alcohol) and graphene oxide biocompatible hydrogels. **Procedia Cirp**, [S.l.], v. 110, p. 145-149, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procir.2022.06.027>.
- [31] MURAB, Sumit *et al.* Alginate based hydrogel inks for 3D bioprinting of engineered orthopedic tissues. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 296, p. 119964, nov. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119964>.
- [32] FERNÁNDEZ, Emiliano *et al.* Rheological and thermal properties of agarose aqueous solutions and hydrogels. **Journal Of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, [S.l.], v. 46, n. 3, p. 322-328, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/polb.21370>.
- [33] ZHANG, Ling-Min *et al.* Synthesis and characterization of a degradable composite agarose/HA hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 88, n. 4, p. 1445-1452, maio 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.050>.
- [34] Tđđđđ, R. Seda; KARAKEÇILI, Ayşe; GÜMÜŞDERELIOđLU, Menemşe. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree.

**Journal Of Materials Science: Materials in Medicine**, [S.l.], v. 18, n. 9, p. 1665-1674, 5 maio 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-007-3066-x>.

[35] ZHANG, Hengtong; CHENG, Junqiu; AO, Qiang. Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. **Marine Drugs**, [S.l.], v. 19, n. 5, p. 264, 10 maio 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/md19050264>.

[36] AXPE, Eneko; OYEN, Michelle. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 17, n. 12, p. 1976, 25 nov. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17121976>.

[37] KULSENG, Bård *et al.* Transplantation of alginate microcapsules. **Transplantation**, [S.l.], v. 67, n. 7, p. 978-984, abr. 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-199904150-00008>.

[38] ANDERSEN, Therese *et al.* Alginates as biomaterials in tissue engineering. **Carbohydrate Chemistry**, [S.l.], p. 227-258, 12 dez. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/9781849732765-00227>.

[39] RHEIN-KNUDSEN, Nanna *et al.* Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: sargassum spp. and padina spp.. **Food Hydrocolloids**, [S.l.], v. 71, p. 236-244, out. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.016>.

[40] REAKASAME, Supachai; BOCCACCINI, Aldo R.. Oxidized Alginate-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications: a review. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 19, n. 1, p. 3-21, 11 dez. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01331>.

[41] LI, Liangbin *et al.* Reexamining the Egg-Box Model in Calcium–Alginate Gels with X-ray Diffraction. **Biomacromolecules**, [S.l.], v. 8, n. 2, p. 464-468, 4 jan. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/bm060550a>.

[42] HARPER, B. Allison *et al.* Effect of Various Gelling Cations on the Physical Properties of “Wet” Alginate Films. **Journal Of Food Science**, [S.l.], v. 79, n. 4, p. 562-567, 24 fev. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.12376>.

[43] BOONTHEEKUL, Tanyarut; KONG, Hyun-Joon; MOONEY, David J.. Controlling alginate gel degradation utilizing partial oxidation and bimodal molecular weight distribution. **Biomaterials**, [S.l.], v. 26, n. 15, p. 2455-2465, maio 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.044>.

[44] BOCIAGA, Dorota *et al.* Sodium Alginate/Gelatine Hydrogels for Direct Bioprinting—The Effect of Composition Selection and Applied Solvents on the Bioink Properties. **Materials**, [S.l.], v. 12, n. 17, p. 2669, 22 ago. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ma12172669>.

[45] MONAVARI, Mahshid *et al.* 3D printing of alginate dialdehyde-gelatin (ADA-GEL) hydrogels incorporating phytotherapeutic icariin loaded mesoporous SiO<sub>2</sub>-CaO nanoparticles for bone tissue engineering. **Materials Science And Engineering: C**, [S.l.], v. 131, p. 112470, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2021.112470>.

- [46] IGLESIAS-MEJUTO, Ana; GARCÍA-GONZÁLEZ, Carlos A.. 3D-printed alginate-hydroxyapatite aerogel scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science And Engineering: C**, [S.l.], v. 131, p. 112525, dez. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2021.112525>.
- [47] PATEL, Vijay *et al.* Pluronics® based Penta block copolymer micelles as a precursor of smart aggregates for various applications: a review. **Journal Of Molecular Liquids**, [S.l.], v. 372, p. 121140, fev. 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2022.121140>.
- [48] HIBBERT, Monja; VILJOEN, Joe M.; DUPLESSIS, Lissinda H.. Print parameter optimisation for a Pluronic F-127 and alginate hybrid hydrogel. **Bioprinting**, [S.l.], v. 30, abr. 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00257>.
- [49] NEVES, Afonso Batista das. **Geles Termorreversíveis na Veiculação de Fármacos**. 2019. 45 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias Escola de Ciências e Tecnologias de Saúde, Lisboa, 2019.
- [50] PARHI, Rabinarayan. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: a review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 515-530, 31 dez. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2017.064>.
- [51] GRASSI, G. *et al.* Rheological properties of aqueous Pluronic–alginate systems containing liposomes. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.l.], v. 301, n. 1, p. 282-290, set. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2006.04.068>.
- [52] CHANDRAN, Nithin; C, Sarathchandran; THOMAS, Sabu. Introduction to rheology. **Rheology Of Polymer Blends And Nanocomposites**, [S.l.], p. 1-17, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816957-5.00001-x>.
- [53] MILLS, Nj. Simple mechanical tests. **Polymer Foams Handbook**, [S.l.], p. 85-114, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-075068069-1/50006-4>.
- [54] MARANZANO, Brent J.; WAGNER, Norman J.. The effects of particle size on reversible shear thickening of concentrated colloidal dispersions. **The Journal Of Chemical Physics**, [S.l.], v. 114, n. 23, p. 10514-10527, 15 jun. 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.1373687>.
- [55] MEZGER, Thomas G. Introdução: rheology, rheometry and viscoelasticity. In: MEZGER, Thomas G. **The Rheology Handbook**: for users of rotational and oscillatory rheometers. Hanover: Vincentz, 2020. p. 15-18.
- [56] BABY, Deepa K.. Rheology of hydrogels. **Rheology Of Polymer Blends And Nanocomposites**, [S.l.], p. 193-204, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816957-5.00009-4>.
- [57] THEUS, Andrea S. *et al.* Bioprintability: biomechanical and biological requirements of materials for 3d bioprinting processes. **Polymers**, [S.l.], v. 12, n. 10, p. 2262, 1 out. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/polym12102262>.
- [58] GORROÑOGOITIA, Izar *et al.* A Study of the Printability of Alginate-Based Bioinks by

3D Bioprinting for Articular Cartilage Tissue Engineering. **Polymers**, [S.l.], v. 14, n. 2, p. 354, 17 jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/polym14020354>.

[59] JANG, Tae-Sik *et al.* 3D printing of hydrogel composite systems: recent advances in technology for tissue engineering. **International Journal Of Bioprinting**, [S.l.], v. 4, n. 1, p. 1-1, 19 jan. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.18063/ijb.v4i1.126>.

[60] FERMANI, Maria *et al.* 3D-Printed Scaffolds from Alginate/Methyl Cellulose/Trimethyl Chitosan/Silicate Glasses for Bone Tissue Engineering. **Applied Sciences**, [S.l.], v. 11, n. 18, p. 8677, 17 set. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/app11188677>.

[61] OUARHIM, Wafa *et al.* Rheology of polymer nanocomposites. **Rheology Of Polymer Blends And Nanocomposites**, [S.l.], p. 73-96, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816957-5.00005-7>.

[62] ADHIKARI, Jaideep *et al.* Development of hydroxyapatite reinforced alginate–chitosan based printable biomaterial-ink. **Nano-Structures & Nano-Objects**, [S.l.], v. 25, p. 100630, fev. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100630>.

[63] 3DJAKE. **Como funciona o "Vase Mode" do Cura**. 2024. Disponível em: <https://www.3djake.pt/info/dicas/como-funciona-o-vase-mode-do-cura>. Acesso em: 03 fev. 2024.

[64] CREALITYSTORE. **Impressora 3d Creality ender-3 Max neo - 1001020479**. 2024. Disponível em: <https://www.crealitystore.com.br/impressora-3d-creality-ender-3-max-neo-1001020479>. Acesso em: 02 jan. 2024.

[65] CALLAN, Michael *et al.* Characterization of Pluronic F127 for the Controlled Drug Release Vancomycin in the Spinal Column. **J. Undergrad. Chem. Eng. Res**, [S.l.], v. 6, p. 6-19, 2017.

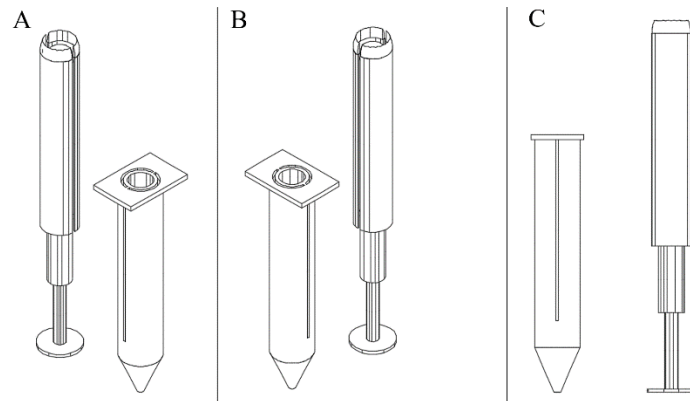
[66] WHEELER, Vert. **Hot Wheels: Acceleracers – A Corrida Final**. [S.l.]: Mainframe Entertainment, 2005. 1 vídeo (4 min 42 segs.). Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=xEocnT79UWk>. Acesso em: 02 jan. 2024.

## APÊNDICE A – SERINGA DE COEXTRUSÃO

Em um primeiro momento, a produção de uma seringa de coextrusão foi estudada para o objetivo do sistema de coextrusão. A necessidade de uma precisão dimensional elevada trouxe dificuldades ao sistema. A proposta inicial se baseava em um escoamento interno de alginato de sódio e um escoamento externo de  $\text{CaCl}_2$ , assim resultando na reticulação externa do fluxo de alginato.

O projeto inicial da seringa de coextrusão é composta por duas peças, sendo a seringa de dois reservatórios e o êmbolo duplo, conforme Figura 47:

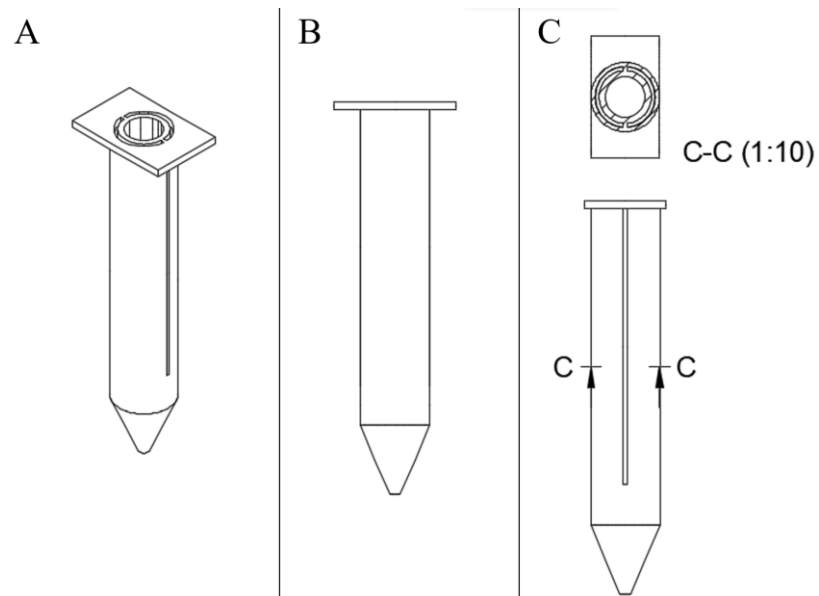
Figura 47 – Projeto da seringa de coextrusão. Em (A), vista isométrica noroeste. Em (B) vista isométrica nordeste. Em (C) vista frontal.



Fonte: Autor, Autodesk Fusion 360.

A Figura 48 apresenta a seringa de dois reservatórios:

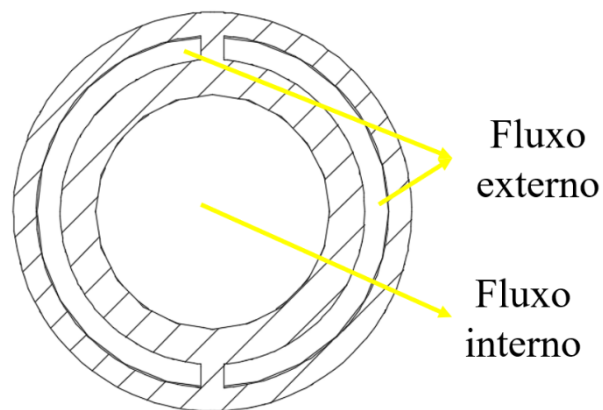
Figura 48 - Desenho da seringa de dois reservatórios. Em (A), a vista isométrica noroeste. Em (B), a vista frontal. Em (C) a vista lateral com corte C-C.



Fonte: Autor, Autodesk Fusion 360.

Assim, define-se os fluxos internos e externos a partir da Figura 49:

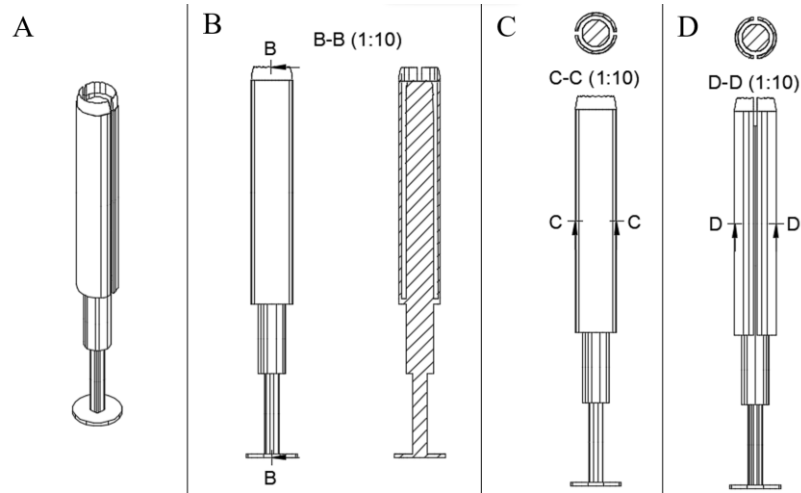
Figura 49 - Esquema de fluxos internos e externos na seringa de coextrusão



Fonte: Autor, Autodesk Fusion 360.

A Figura 50 apresenta o êmbolo para a seringa de dois reservatórios:

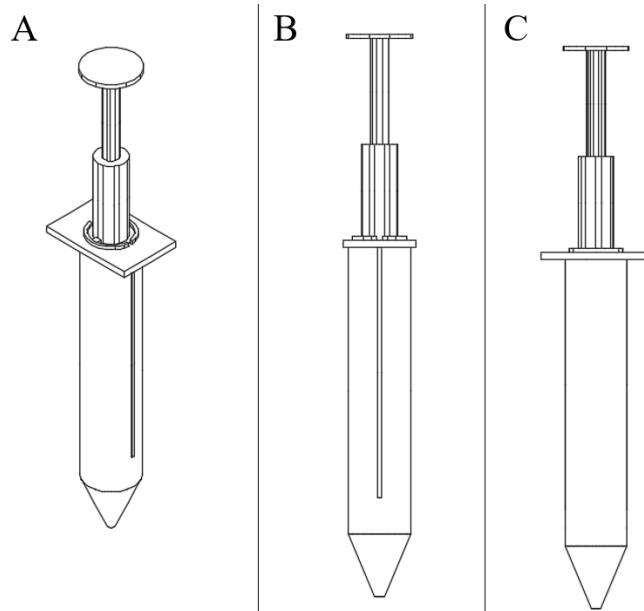
Figura 50 – Desenho do êmbolo de dois reservatórios. Em (A), a vista isométrica noroeste. Em (B), a vista frontal com corte B-B. Em (C) a vista frontal com corte C-C. Em (D) a vista lateral com corte D-D.



Fonte: Autor, Autodesk Fusion 360.

A montagem do sistema de seringa está apresentada na Figura 51:

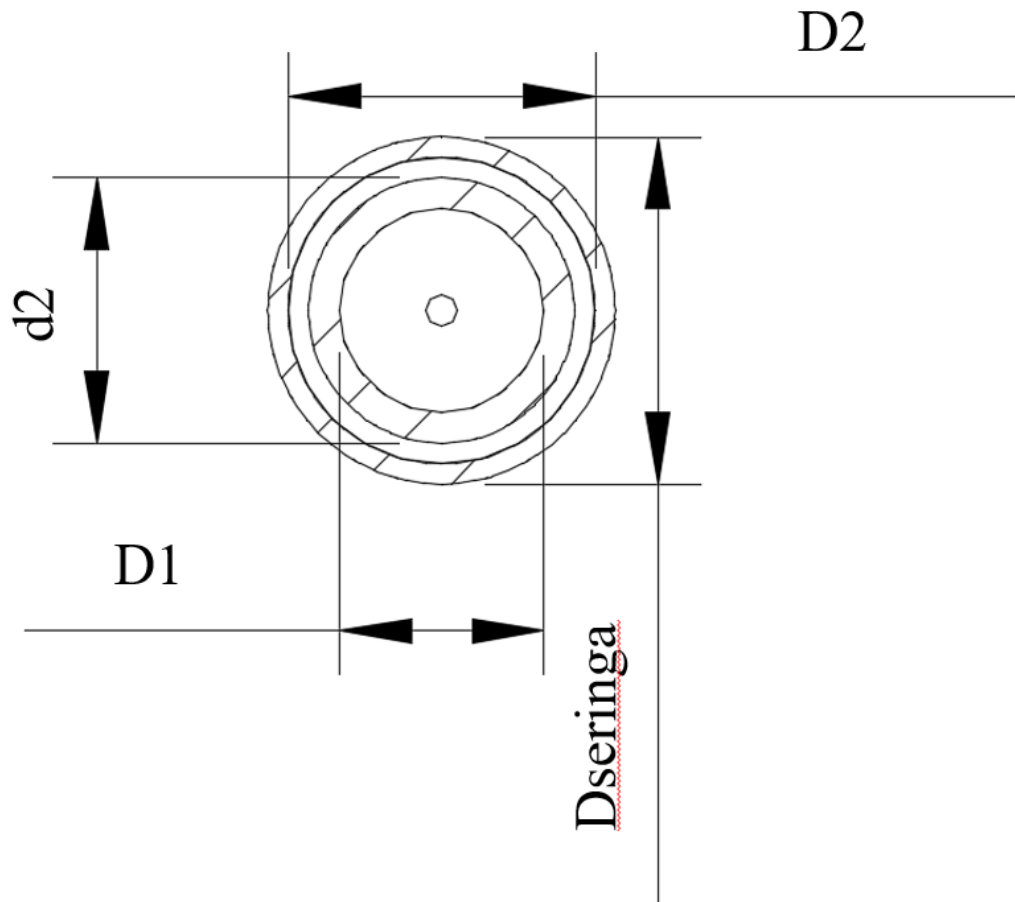
Figura 51 - Montagem do sistema de seringa de coextrusão com êmbolo duplo.



Fonte: Autor, Autodesk Fusion 360.

As respectivas dimensões foram nomeadas para os cálculos de vazões, conforme Figura 52:

Figura 52 – Nomenclatura das dimensões da seringa de coextrusão



Fonte: Autor, Autodesk Fusion 360.

A partir das dimensões genéricas, valores foram assumidos para calcular as vazões internas e externas e a relação entre tais vazões. Assumindo que a velocidade de escoamento interno e externo seja a mesma e genérica de  $v = 1 \text{ mm/s}$ , visto que o mesmo êmbolo seria utilizado para ambos os escoamentos, a velocidade seria a mesma, definida pela velocidade do sistema de impressão vext (velocidade de extrusão). Esses valores foram comparados aos trabalhados por Freeman e Kelly (2017) sobre alginato de sódio de baixa viscosidade em proporção 25:9 (2,777...) [26].

Demonstra-se os cálculos a partir das equações 9, 10 e 11:

$$Q_{\text{interna}} = v \cdot \frac{\pi}{4} \cdot D_1^2 \quad (9)$$

$$Q_{\text{externa}} = v \cdot \frac{\pi}{4} \cdot (D_2^2 - D_1^2) \quad (10)$$

$$\text{Relação de vazões} = \frac{Q_{int}}{Q_{ext}} \quad (11)$$

Assim, apresenta-se a tabela com possíveis dimensões e cálculos de vazões:

Tabela 13 – Análise de dimensões e vazões da seringa de coextrusão. Valores em destaque são aqueles onde a relação é maior que 25:9 (2,777...)

Modelos	Dimensões [mm]				Vazões [mm <sup>3</sup> /s]		
	Dseringa	D2	d2	D1	Qint	Qext	Qint/Qext
1	20	18	13	10	78,540	121,737	0,645
2	19	17	13	10	78,540	94,248	0,833
3	18	16	13	10	78,540	68,330	1,149
4	17	15	13	10	78,540	43,982	1,786
5	16	14	13	10	78,540	21,206	<b>3,704</b>
6	20	18	13	10	78,540	121,737	0,645
7	20	18	14	11	95,033	100,531	0,945
8	20	18	15	12	113,097	77,754	1,455
9	20	18	16	13	132,732	53,407	2,485
10	20	18	17	14	153,938	27,489	<b>5,600</b>
11	25	23	18	15	176,715	161,007	1,098
12	25	23	19	16	201,062	131,947	1,524
13	25	23	20	17	226,980	101,316	2,240
14	25	23	21	18	254,469	69,115	<b>3,682</b>
15	25	23	22	19	283,529	35,343	<b>8,022</b>
16	30	28	23	20	314,159	200,277	1,569
17	29	27	23	20	314,159	157,080	2,000
18	28	26	23	20	314,159	115,454	2,721
19	27	25	23	20	314,159	75,398	<b>4,167</b>
20	26	24	23	20	314,159	36,914	<b>8,511</b>

Fonte: Autor.

O comprimento total da seringa de coextrusão, baseada em uma seringa comercial comum, é de 97 mm, enquanto o comprimento total do êmbolo duplo é de 140 mm. As dificuldades encontradas no processamento limitaram o uso deste projeto para o sistema em questão. A impressão 3D da seringa de coextrusão é limitada pelo processo de impressão 3D por FDM, visto que a impressão na direção longitudinal não seria eficiente por ser uma amostra com a relação comprimento/diâmetro elevada. A resolução de 0,1 mm (e.g. Ender 3 Max Neo) se torna outra limitação para a produção da seringa <sup>[64]</sup>.

Assim, o projeto da seringa de coextrusão foi descartada e o desenvolvimento se tornou focado em um sistema de coextrusão em duas seringas.