



**Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Printabilidade de biotinta para processos de bioimpressão 3D por
extrusão: abordagem de design e parâmetros de impressão**

GABRIELA MENDES DA ROCHA VAZ

Brasília
2021

Agradecimentos

Agradeço a todos os acontecimentos na minha vida que me levaram a estar onde estou hoje, ao Universo e toda sua sequência de coincidências que me permitiram chegar nesse momento, no meu atual agora.

Agradeço aos meus pais, Gildete Maria e José Eduardo, que sempre estiveram comigo em todos os instantes da minha vida, me motivando, me amando e vivendo ao meu lado.

Agradeço as minhas amigas com as quais dividi inúmeras experiências e sem as quais nem sei quem seria.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LNANO que garantiram que essa experiência pudesse ser a melhor possível, compartilhando pensamentos e ideias, e acima de tudo estando presente nos momentos que tudo parecia desandar.

Agradeço ao meu orientador, Luciano Paulino da Silva, que além de verdadeiramente me nortear nessa jornada, sempre me motivou a explorar a criatividade e me mostrou o olhar científico em relação ao que acontece a nosso redor.

Agradeço às instituições e agências, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Universidade de Brasília, CNPq, CAPES e FAPDF que fomentaram, financiaram e possibilitaram a minha jornada acadêmica.

Agradeço às empresas que desenvolveram as bioimpressoras que permitiram a execução desse projeto.

Desenvolver um projeto de bancada durante uma pandemia não é uma tarefa fácil, portanto eu sou grata também ao processo e aos resultados obtidos.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que passaram na minha vida. Obrigada por me ensinarem a viver e a entender mais sobre mim mesma e sobre o mundo.

Resumo

A bioimpressão tridimensional (3D) é uma estratégia de biofabricação provinda da manufatura aditiva que permite a construção de estruturas 3D a partir da deposição controlada camada a camada de um volume determinado de biotintas. As biotintas são composições de biomateriais, em geral biopolímeros que apresentam características diversas em relação a propriedades reológicas como viscosidade, às quais é possível realizar a adição de células. Atualmente, na bioimpressão 3D por extrusão, muito tem se desenvolvido e pesquisado em relação ao aprimoramento das biotintas. Dentro desse contexto, surge o conceito de printabilidade que agrupa diversos parâmetros para caracterização e estabelece uma forma macro de avaliar a performance de uma biotinta em um processo de bioimpressão 3D. Na literatura, o conceito de printabilidade, apesar de ser comumente empregado, considera diferentes aspectos variando de trabalho a trabalho. Em geral, alguns parâmetros que são colocados como chaves no processo são: design do constructo, composição da biotinta e parâmetros da bioimpressão 3D. Em relação ao design do constructo, fatores como a orientação (vertical e horizontal), espaçamento (tamanho de poros), altura da camada, diferentes padrões de preenchimento e modelos computacionais que desafiem as biotintas de forma estrutural devem ser considerados a fim de analisar a printabilidade. Biotintas compostas por combinações entre polímeros têm se mostrado a escolha mais comum na área da biofabricação, uma vez que é possível combinar características e, com isso, alcançar resultados melhores. Por fim, os parâmetros de bioimpressão como calibre da agulha, pressão para extrusão e velocidade são também utilizados para avaliar a printabilidade. A motivação comum dos processos de bioimpressão 3D são as possíveis aplicações na medicina regenerativa e na engenharia tecidual, então, avaliar a viabilidade celular e a citocompatibilidade se tornam necessárias. De modo geral, na literatura existem diferentes abordagens para estabelecer a printabilidade e diferentes formas de caracterização já foram testadas. O objetivo desse estudo foi estabelecer um processo de caracterização da printabilidade de uma biotinta por meio de uma abordagem de design com o desenvolvimento de modelos CAD (*Computer Aided Design*) e pela aplicação de modelos matemáticos e estatísticos para otimização do processo de escolha de parâmetros. Os modelos CAD foram desenvolvidos de modo que possibilitassem a caracterização de estruturas quanto à forma após a bioimpressão. Uma sequência de modelos foi estabelecida de modo que em cada etapa fosse possível analisar um aspecto importante em relação à manutenção de forma em estruturas bioimpressas. Outros modelos foram criados como proposta de uma abordagem diferente em relação ao design de estruturas para a bioimpressão. Quanto aos parâmetros de bioimpressão, a otimização de três parâmetros (diâmetro da agulha, *extrusion multiplier* e velocidade de impressão) por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) utilizando o Composto Central foi conduzida em 4 bioimpressoras diferentes. A variável avaliada nessa metodologia foi a largura do filamento extrusado em relação ao diâmetro da agulha utilizada. A partir dos resultados, foi possível propor uma forma de acessar a printabilidade de modelos CAD e, por meio da MSR, estabelecer a significância ou não dos parâmetros estudados em relação à largura do filamento para cada bioimpressora, além de mostrar as variações entre diferentes máquinas. Conclui-se que a caracterização da printabilidade de biotintas utilizadas em processos de bioimpressão 3D tem se tornado uma etapa necessária quando se trata da técnica e diferentes propostas de métodos foram sugeridas a fim de acessar a printabilidade de uma biotinta nos processos de extrusão.

Palavras-chave: biofabricação, bioimpressão 3D, printabilidade, biomaterial, biotintas, modelagem CAD, Metodologia de Superfície de Resposta

Abstract

Three-dimensional (3D) bioprinting is a biofabrication strategy from additive manufacturing that allows the construction of 3D structures through layer-by-layer bioink controlled volume deposition. Bioinks are composed of biopolymers that have different rheological properties such as viscosity, and to which it is possible to add cells. Currently, when it comes to extrusion 3D bioprinting, much has been developed and researched concerning the improvement of bioinks. Within this context, the concept of printability arises. Printability groups several parameters for characterization and establishes a macro way of evaluating the performance of a bioink in a 3D bioprinting process. In the literature, the concept of printability, despite being commonly used, considers different aspects varying from work to work. In general, some parameters that are key in the process are: construct design, bioink composition and 3D bioprinting parameters. Regarding the design of the construct, factors such as orientation (vertical and horizontal), spacing (pore size), layer height, different filling patterns and computational models that structurally challenge bioinks should be considered in order to analyze the printability. Bioinks composed of combinations between polymers have been shown to be the most common choice in biofabrication, since it is possible to combine characteristics and, therefore, achieve better results. Finally, bioprinting parameters such as needle diameter, extrusion pressure and speed are also used to assess printability. The common motivation of 3D bioprinting processes is the possible applications in regenerative medicine and tissue engineering, so evaluating cell viability and cytocompatibility becomes necessary. In general, in the literature there are different approaches to establish printability and different forms of characterization have already been tested. The aim of this study was to establish a process for characterizing the printability of a bioink through a design approach with the development of CAD (Computer Aided Design) models and through the application of mathematical and statistical models to optimize the process of parameter choices. The CAD models were developed in such a way as to enable the characterization of structures in terms of shape after bioprinting. A sequence of models was established so that at each step it was possible to analyze an important shape aspect of bioprinted structures. Other models were created as a proposal for a different approach to the design of structures for bioprinting. As for the bioprinting parameters, the optimization of three parameters (needle diameter, extrusion multiplier and printing speed) through the Surface Response Methodology (SRM) using the Central Composite was conducted in 4 different bioprinters. The variable evaluated in this methodology was the width of the extruded filament in relation to the diameter of the needle used. From the results, it was possible to propose a way to access printability through CAD models and, through SRM, establish the significance or not of the studied parameters in relation to the filament width for each bioprinter, in addition to showing the variation between different machines. Therefore, it is concluded that the characterization of the printability of bioinks used in 3D bioprinting processes has become a common step when it comes to the technique and different method proposals have been suggested in order to access the printability of a bioink in 3D bioprinting processes by extrusion.

Keywords: biofabrication, 3D bioprinting, printability, biomaterial, bioinks, CAD modeling, Surface Response Methodology

Lista de Figuras

- Figura 1. Diagrama exemplificando diferentes técnicas de biofabricação. Em destaque e no centro, tem-se a bioimpressão 3D que pode ser subdividida conforme a forma pela qual se dá a produção de estruturas 3D..... 13
- Figura 2. Etapas envolvidas no processo de bioimpressão 3D: modelagem CAD e geração de um arquivo no formato STL; fatiamento em *software* com ajustes dos parâmetros adequados resultando em um arquivo GCODE; importação desse arquivo para um *software* que controle a bioimpressora; processo de bioimpressão e obtenção da estrutura final. 16
- Figura 3. Diagrama com a representação da abordagem escolhida para abordar a printabilidade nesse trabalho. 22
- Figura 4. Sólidos utilizado como base para desenvolvimento de modelos na plataforma Tinkercad. Do lado esquerdo, tem-se um paralelepípedo e do lado direito, um cilindro. 25
- Figura 5. Fluxograma composto pela sequência de seis modelos (duas versões do quarto modelos) propostos para avaliação da printabilidade de uma biotinta em processo de bioimpressão 3D por extrusão, criados na plataforma Tinkercad. 28
- Figura 6. Modelos propostos para explorar posicionamento tridimensionais diferenciados na bioimpressão 3D. Da esquerda para direita: modelo inspirado em um ovo desenvolvido por Antoni_Nosek, modelo desenvolvido por Clockspring no formato de vaso, modelo de semiesfera desenvolvido no Tinkercad e redimensionado volumetricamente no Blender, modelo de pirâmide desenvolvido no Tinkercad e redimensionado volumetricamente no Blender .. 29
- Figura 7. Modelo para calibração de impressora 3D desenvolvido por usuário do Thingiverse e disponibilizado publicamente. Fonte: majda107, Thingiverse..... 30
- Figura 8. Modelo para avaliar a distância mínima entre filamentos na qual é possível extrusar a biotinta sem que os filamentos se fusionem. Esse modelo consiste em linhas paralelas posicionadas de forma que a distância entre elas aumente gradativamente milímetro a milímetro a partir de 1 mm até 7 mm..... 30
- Figura 9. Sobreposição do modelo de zigue-zague, criado no Tinkercad, possibilita a avaliação da distância mínima na qual é possível depositar dois filamentos sem que haja uma fusão, bem como analisar o comportamento de dois filamentos quando posicionados perpendicularmente. 31
- Figura 10. Modelo para avaliar a capacidade de empilhar e a formação de poros criado no Tinkercad. Esse modelo é composto de camadas alternadas de linhas orientadas na vertical e horizontal, permitindo a formação de espaços, considerados os poros..... 32
- Figura 11. Modelo para avaliar a sustentação vertical, ou seja, a manutenção da forma criado no Tinkercad. Do lado esquerdo, a primeira versão do modelo, composto de estruturas que não se conectam entre si e do lado direito, o modelo é composta de uma estrutura única..... 33

Figura 12. Modelo para avaliar sustentação de estruturas com orifício criado no Tinkercad. Essa estrutura consiste em um tubo, no qual o diâmetro do orifício equivale à 1/3 do diâmetro total do tubo.....	34
Figura 13. Modelo para avaliar a sustentação de estruturas inclinadas criados no Tinkercad. A estrutura mais a esquerda possui um ângulo de 90° em relação a linha onde está apoiada, e esse ângulo sofre um incremento de 15° a cada estrutura à direita.	35
Figura 14. Representação do modelo bioimpresso e dos pontos, marcados por pequenos círculos amarelos, nos quais foram medidas as larguras do filamento (linha) extrusado utilizado como base de comparação para avaliação da condição ideal.	45
Figura 15. Primeira avaliação de caracterização qualitativa da printabilidade de uma biotinta. A) Esquema de dois comportamentos possíveis da biotinta: seringa do lado esquerdo representa uma biotinta com viscosidade muito baixa formando uma gota, sendo inadequada para a bioimpressão 3D; e do lado direito, uma seringa com biotinta formando um filamento quando extrusada, sendo esta adequada para extrusão. B) Extrusão de uma biotinta composta por gelatina 11% e alginato 4% através de uma agulha de 22G utilizando a bioimpressora 1.	49
Figura 16. Bateria de 17 ensaios executados na Bioimpressora 1, de acordo com as condições estabelecidas pelo PCC. Os ensaios estão dispostos no sentido de cima para baixo e da esquerda para a direita.	50
Figura 17. Gráfico de medição × predição gerados pelo <i>software</i> Chemoface em relação ao modelo linear estabelecido pela Bioimpressora 1 com os dados de duas baterias de testes. ...	55
Figura 18. Gráfico do modelo linear obtido no <i>software</i> Chemoface com os dados relativos à Bioimpressora 1. Os eixos representam o diâmetro da agulha, <i>extrusion multiplier</i> e o percentual de diferença entre o filamento extrusado e a agulha empregada (medição considerada como resultado no modelo). Os círculos representam os dados obtidos experimentalmente nos ensaios conduzidos.....	55
Figura 19. Ensaios executados na Bioimpressora 2, de acordo com as condições estabelecidas pelo PCC. Os ensaios estão dispostos no sentido de cima para baixo e da esquerda para a direita.	56
Figura 20. Ensaios executados na Bioimpressora 3, de acordo com as condições estabelecidas pelo PCC. Os ensaios estão dispostos no sentido de cima para baixo e da esquerda para a direita.	59
Figura 21. Ensaios executados na Bioimpressora 4, de acordo com as condições estabelecidas pelo PCC. Os ensaios estão dispostos no sentido de cima para baixo e da esquerda para a direita.	62
Figura 22. Representação esquemática do caminho percorrido pela seringa para testes de printabilidade. As setas representam a direção do movimento, as linhas cheias representam o comando de extrusão, ou seja, a localização do modelo em que há deposição de biomaterial pela bioimpressora. A) Bioimpressora 1, B) Bioimpressora 2, C) Bioimpressora 3 e D) Bioimpressora 4.	67

Lista de Tabelas

Tabela 1. Matriz de Planejamento Composto Central com três variáveis. Os valores de X representam a posição na qual os valores das variáveis escolhidas para o estudo são utilizadas. Os valores iguais a -1,68179 e 1,68179 representam os extremos.	39
Tabela 2. Valores das variáveis (fatores) utilizados no Planejamento do Composto Central no <i>software</i> Chemoface para Bioimpressora 1.	42
Tabela 3. Valores das variáveis (fatores) utilizados no Planejamento do Composto Central no <i>software</i> Chemoface para Bioimpressora 2, 3 e 4.	42
Tabela 4. Valores para os ensaios segundo o PCC, utilizando como variáveis o diâmetro da agulha, o <i>extrusion multiplier</i> , e a velocidade. Os valores entre parênteses nas colunas de Diâmetro da agulha e Velocidade representam os tamanhos de agulha e velocidades que foram efetivamente utilizados para cada condição.	43
Tabela 5. Parâmetros mantidos constantes nas configurações do Slic3r. A configuração desses parâmetros pôde ser feita em <i>Filament Settings</i> (Diâmetro do filamento), <i>Print Settings</i> (Saia) e <i>Printer Settings</i> (Retração) no <i>software</i> Slic3r.	44
Tabela 6. Parâmetros que foram ajustados conforme a agulha utilizada. A configuração desses parâmetros pôde ser feita em <i>Printer Settings</i> (Diâmetro da agulha) e <i>Print Settings</i> (Altura da camada) no <i>software</i> Slic3r.	44
Tabela 7. Artigos que apresentam os termos “ <i>gelatin</i> ”, “ <i>alginate</i> ” e “ <i>bioink</i> ” ou “ <i>gelatin</i> ”, “ <i>alginate</i> ” e “ <i>hydrogel</i> ” no título e que foram utilizados para a escolha das concentrações de alginato e gelatina para compor a biotinta testada.	48
Tabela 8. Medições da primeira bateria em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 1. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.	51
Tabela 9. Dados obtidos no <i>software</i> Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 1 com os dados referentes apenas a uma bateria de testes, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à <i>extrusion multiplier</i> e X3 refere-se à velocidade de impressão.	52
Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados referentes a apenas a uma bateria de testes com a Bioimpressora 1.	52
Tabela 11. Medições da segunda bateria de testes em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 1. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.	53
Tabela 12. Dados obtidos no <i>software</i> Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 1 com os dados referentes a duas baterias de testes, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à <i>extrusion multiplier</i> e X3 refere-se à velocidade de impressão 3D.	54

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados referentes às duas baterias de testes com a Bioimpressora 1.	54
Tabela 14. Medições em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 2. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.	57
Tabela 15. Dados obtidos no <i>software</i> Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 2, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à <i>extrusion multiplier</i> e X3 refere-se à velocidade de impressão.	58
Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados da Bioimpressora 2.	58
Tabela 17. Medições em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 3. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.	60
Tabela 18. Dados obtidos no <i>software</i> Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 3, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à <i>extrusion multiplier</i> e X3 refere-se à velocidade de impressão.	61
Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados da Bioimpressora 3.	61
Tabela 20. Medições em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 4. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.	63
Tabela 21. dados obtidos no <i>software</i> Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 4, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à <i>extrusion multiplier</i> e X3 refere-se à velocidade de impressão.	64
Tabela 22. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados da Bioimpressora 4.	64

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C: graus Celsius

3D: tridimensional

CAD: *Computer Aided Design* (Desenho assistido por computador)

CATE: *Computer Aided Tissue Engineering*

cm: centímetro

DA: Diâmetro da Agulha

DOE: *Design of Experiments* (Desenho Experimental)

g: grama

G: Gauge

h: hora

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

mm: milímetro

mm/s: milímetro por segundo

MSR: Metodologia de Superfície de Resposta

PCC: Planejamento Composto Central

PCL: *Polycaprolactone* (Policaprolactona)

PLA: *Polylactic Acid* (Ácido polilático)

STL: *Standard Triangle Language* ou *Standard Tessellation Language*

Sumário

CAPÍTULO I – PRINTABILIDADE: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. BIOFABRICAÇÃO.....	12
1.2. BIOIMPRESSÃO 3D.....	14
1.3. BIOMATERIAIS.....	16
1.4. PRINTABILIDADE	19
2. MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVO	21
3.1. OBJETIVO GERAL.....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	22
4.1. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	23
CAPÍTULO II – ABORDAGEM DE DESIGN PARA A BIOIMPRESSÃO 3D	24
1. INTRODUÇÃO.....	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. MODELOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE BIOTINTAS PARA BIOIMPRESSÃO 3D.....	24
2.2. OUTROS MODELOS.....	27
3. RESULTADOS.....	28
3.1. SEQUÊNCIA DE MODELOS	28
3.2. OUTROS MODELOS.....	29
4. DISCUSSÃO.....	29
4.1. PROPOSTA PARA AVALIAR PRINTABILIDADE ABORDAGEM DE DESIGN	29
4.1.1. <i>Primeiro e segundo modelos</i>	30
4.1.2. <i>Terceiro modelo</i>	32
4.1.3. <i>Quarto modelo</i>	33
4.1.4. <i>Quinto modelo</i>	34
4.1.5. <i>Sexto modelo</i>	34
4.2. OUTROS MODELOS.....	35
4.3. LIMITAÇÕES	36
5. CONCLUSÃO	36
CAPÍTULO III – BIOTINTA E PARÂMETROS DE BIOIMPRESSÃO	37
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1. LISTA DE REAGENTES	40
2.2. LISTA DE MATERIAIS.....	40
2.3. LISTA DE EQUIPAMENTOS.....	41
2.4. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	41
2.4.1. <i>Escolha do biomaterial para testes utilizando a MSR</i>	41

2.4.2. <i>Produção do biomaterial</i>	41
2.4.3. <i>Planejamento do Composto Central</i>	42
2.4.4. <i>Bioimpressão</i>	43
3. RESULTADOS	47
3.1. ESCOLHA DOS POLÍMEROS PARA COMPOR A BIOTINTA	47
3.2. BIOIMPRESSÃO DE BIOTINTA COMPOSTA POR GELATINA E ALGINATO.....	49
3.2.1. <i>Bioimpressora 1</i>	49
3.2.2. <i>Bioimpressora 2</i>	56
3.2.3. <i>Bioimpressora 3</i>	59
3.2.4. <i>Bioimpressora 4</i>	62
4. DISCUSSÃO	65
4.1. LIMITAÇÕES	69
5. CONCLUSÃO	70
PERSPECTIVAS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
LINK DOS MODELOS STL CITADOS	77
ANEXO I	78
1. APRESENTAÇÕES EM FORMATO PÔSTER.....	78
2. PRÊMIO OBTIDO.....	78
3. PUBLICAÇÃO.....	78
ANEXO II	79
ANEXO III	82
ANEXO IV	86
ANEXO V	88
ANEXO VI	90

Capítulo I – Printabilidade: Revisão Bibliográfica

1. Introdução

1.1. Biofabricação

O termo biofabricação já foi utilizado em diferentes situações ao longo da história, sob diferentes contextos e, por esse motivo, assumindo significados diversos (Grool *et al*, 2016). A falta de consenso na literatura sobre a utilização do termo por si só representa um desafio adicional da área no que tange ao desenvolvimento de pesquisa. Durante esse século, quando o termo começou a ser efetivamente empregado e periódicos específicos da área foram lançados, alguns pesquisadores perceberam essa deficiência e buscaram formas de unificar a terminologia (Mironov *et al*, 2009; Grool *et al*, 2016; Moroni *et al*, 2018). Entretanto, mesmo após a publicação de diversos artigos, ainda há diferenças de abordagem e uso dos conceitos conforme áreas de pesquisa. Existem definições abrangentes em que o termo é definido com base na própria terminologia: a parte “bio” implica no envolvimento de partes biológicas no processo, seja no material utilizado, seja no produto ou ainda na própria inspiração estrutural. E a parte “fabricação” tem relação com a construção ou estruturação de algo a partir de componentes que outrora estavam apresentados de outra forma). Essa forma de conceituar é adequada, mas pode acabar sendo extremamente abrangente no sentido de abordar não só apenas o escopo da biofabricação, como também de outras áreas e até mesmo processos naturais (Grool *et al*, 2016), sendo ainda passível de aprimoramento futuro.

De modo geral, uma definição que une diferentes aspectos conceituais já citados pela literatura e que será considerada nesse trabalho é a biofabricação como uma área de pesquisa multidisciplinar inovadora derivada da bioengenharia, que combina ideias da engenharia, biologia e ciências dos materiais em processos de manufatura resultando na criação de biomiméticos, bioprodutos e bioestruturas (Silva, 2019). E salvo particularidades de contextos em que esse conceito pode acabar assumindo sinônimos e especificações, essa definição costuma ser adequada e aqui condizente com o que se propõe. As possibilidades que o surgimento dessa abordagem cria vão desde provas de conceitos e avanço de conhecimento, até a realização de ideias que sempre foram colocadas como ficção científica.

As formas de biofabricar são diversas, seja por meio da modulação do biomaterial que servirá como *scaffold* (arcabouço), seja modulando como a estruturação desse material será produzida para servir de matriz para crescimento celular, e até mesmo pelo direcionamento

direto de células para formação de estruturas (Mironov *et al*, 2009). Considerando diferentes formas de estruturação utilizadas na biofabricação, tem-se a bioimpressão 3D (baseada em extrusão, baseadas em luz – estereolitografia, jato de tinta e combinada com outras técnicas de biofabricação como a eletrofiação) (Sun *et al*, 2020); manufatura subtrativa (Tan *et al*, 2009; Sachlos *et al*, 2003); induzida por campo magnético (Parfenov *et al*, 2017; Anil-Inevi *et al*, 2018), como exemplos de técnicas de biofabricação 3D (Figura 1). A maioria das tecnologias comumente utilizadas foram originalmente idealizadas dentro do escopo da manufatura aditiva para prototipagem rápida (Moroni *et al*, 2018), mas foram posteriormente incluídas entre as técnicas de biofabricação com a ampliação das possibilidades de atuação no campo. De modo geral, todas as formas de biofabricação buscam o desenvolvimento de biomateriais que se assemelham ao máximo ao microambiente celular dos tecidos e órgãos de organismos vivos (Bajaj *et al*, 2014), tanto no sentido estrutural, como no sentido de sinalização celular (Khang *et al*, 2006).

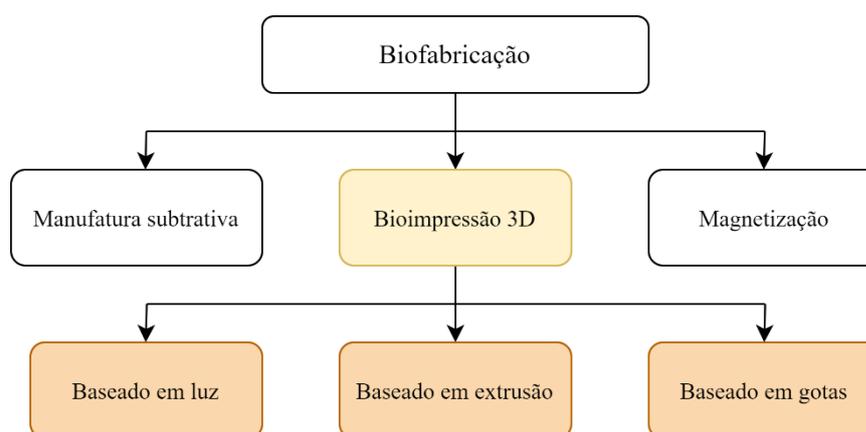


Figura 1. Diagrama exemplificando diferentes técnicas de biofabricação. Em destaque e no centro, tem-se a bioimpressão 3D que pode ser subdividida conforme a forma pela qual se dá a produção de estruturas 3D.

Na biofabricação, para o desenvolvimento de órgãos funcionais há a necessidade de integrar três fatores (Ozbolat & Yu, 2013): tecnologia de células, relacionada à necessidade de se obter células que funcionem nas condições desejadas para aplicação clínica (Tsiapalis & O’Driscoll, 2020); tecnologia de biomanufatura (biofabricação), relacionada com a combinação das células e biomateriais de modo que possam ser de fato utilizados em uma configuração 3D (Biswal, 2021); e por fim, tecnologias que possibilitem a integração do tecido biomanufaturado com o organismo que receberá a estrutura, de modo que haja aceitação (Murphy, De Coppi &

Atala, 2020). Diante desses três fatores, tem-se que o primeiro direciona para tecnologias de obtenção, aprimoramento de condições e utilização de células compatíveis; o segundo que abarca o processo de biofabricação em si com o desenvolvimento, aprimoramento e escolha de biomateriais compatíveis com as células que possibilitem um posicionamento no espaço; e o terceiro leva em conta uma aplicação da estrutura desenvolvida (Ozbolat & Yu, 2013). Pensando em aplicações desejadas pela pesquisa atualmente, o segundo fator se sobressai ao unir a necessidade da escolha de um biomaterial que seja compatível com as células do primeiro fator e que seja planejado para a aplicação final do terceiro (Murphy, De Coppi & Atala, 2020).

Considerando as portas que são criadas e abertas quando uma tecnologia de produção de miméticos de estruturas vivas com o metabolismo compatível com o de humanos é desenvolvida, diversos debates serão ainda levantados (Mironov *et al*, 2009). Entretanto, para que a produção de órgãos verdadeiramente funcionais a partir de um amontoado de células saia da ficção científica e se torne uma ação rotineira em hospitais, muitos desafios, até mesmo em relação à forma de estudar as estruturas, ainda precisam ser contornados e, para isso e algumas situações entendidas dentro da engenharia de tecidos.

1.2. Bioimpressão 3D

Diversas técnicas de biofabricação derivam da tecnologia de manufatura aditiva, também chamada de impressão 3D, que apesar de existir desde a década de 80, apenas mais recentemente obteve maiores avanços. Considerando a utilização de materiais diversos e seleção de células para a fabricação de bioestruturas, e munido do conceito de manufatura aditiva, o termo biofabricação passou ser comumente associado à bioimpressão. Vale ressaltar que, historicamente, esses termos tiveram suas evoluções muito interligadas, muitas vezes sendo difícil discernir os limites dos empregos de cada um deles e, por isso, são muitas vezes erroneamente empregados indistintamente apesar de conceitualmente abrangerem tópicos distintos (Grool *et al*, 2016; Lee *et al*, 2018).

Esse crescente interesse recente pelas técnicas de manufatura aditiva se dá tanto devido à queda do custo, como devido à expansão do conhecimento e das possibilidades de aplicações dessa tecnologia (Randazzo *et al*, 2016). Na área da saúde, essa tecnologia é vista como revolucionária com a possibilidade de ser utilizada em diversas situações; desde a bioimpressão de órgãos e tecidos, incluindo o desenvolvimento de próteses personalizadas, implantes, modelos anatômicos e até mesmo nas pesquisas farmacêuticas que envolvem triagem de

princípios ativos (Schubert, Van Langeveld & Donoso, 2014; Satpathy *et al*, 2018; Nie *et al*, 2020). Em 2003, Mironov *et al* garantiram: “é seguro prever que no século XXI, impressoras de órgãos serão tão amplamente utilizadas como ferramentas biomédicas quanto o microscópio eletrônico no século XX”.

Dentre as muitas aplicações da bioimpressão 3D, comumente o transplante de órgãos é citado como grande promessa e objetivo da tecnologia. Isso porque, atualmente, o transplante comumente é o único tratamento para o estágio final da falência de um órgão, como coração ou fígado (WHO, 2018). Pensando nacionalmente, segundo o Registro Brasileiro de Transplantes, em março de 2018, no Brasil, a lista de espera para transplante de órgãos era de 32 mil pessoas. Considerando esse número de pacientes à espera de um órgão, aliada ao fato de que o número de doadores diminuiu em 2018 em relação ao ano anterior (ABTO, 2018), tem-se que, de fato, a bioimpressão 3D de órgãos funcionais, biologicamente compatíveis, seria uma ferramenta com grande potencial para ajudar a reduzir essa fila e oferecer uma alternativa viável a muitos destes pacientes. Apesar do grande desejo e da grande mobilização para chegar nesse objetivo, outras aplicações de grande impacto terão que ocorrer anteriormente e possibilitarão aquisição de *know-how*. Por exemplo, a personalização de tratamentos, em que seria possível a partir de uma imagem médica e células de biópsias manufaturar uma estrutura do paciente para testar fármacos e tratamentos específicos (Michalski & Joss, 2014), possibilitando a obtenção de respostas únicas relacionadas ao metabolismo de cada indivíduo, e assim, aumentando a precisão de um tratamento paciente-dirigido. Nessa direção, por exemplo, modelos de glioblastoma, um tipo de tumor cerebral, foram desenvolvidos utilizando a bioimpressão 3D. Essas estruturas se mostraram capazes de mimetizar as condições tumorais *in vivo*, ou seja, foram desenvolvidas representações valiosas e reais de tumores que servem como teste de drogas terapêuticas (Sánchez-Salazar, Álvarez & Trujillo-de-Santiago, 2020).

A bioimpressão 3D tem origem na impressão 3D, que consiste na formação de objetos a partir da deposição e sobreposição de múltiplas camadas, essas podem ter como base polímeros, metais, cerâmicas, líquidos e, até mesmo, células – nesse caso assumindo o nome de bioimpressão 3D (Schubert *et al*, 2014). As etapas que envolvem o processo de manufatura são (Figura 2): se inicia com um modelo de desenho assistido por computador (CAD) criado geralmente em programas de computador ou a partir do escaneamento de estruturas reais. *Software* especializados separam a estrutura em camadas (fatiamento) que podem ser enviadas à impressora 3D para que a estrutura seja efetivamente impressa (Campbell *et al*, 2011). A

utilização de recursos biológicos como material para impressão é especificamente denominada bioimpressão 3D, mas o termo não se limita à apenas essa possibilidade.

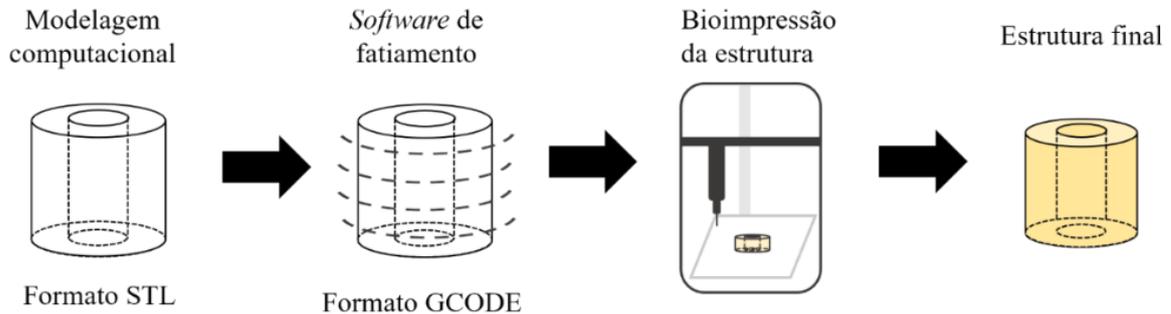


Figura 2. Etapas envolvidas no processo de bioimpressão 3D: modelagem CAD e geração de um arquivo no formato STL; fatiamento em *software* com ajustes dos parâmetros adequados resultando em um arquivo GCODE; importação desse arquivo para um *software* que controle a bioimpressora; processo de bioimpressão e obtenção da estrutura final.

A bioimpressão 3D é uma tecnologia que se diferencia da impressão 3D pelo aspecto biológico empregado, ou seja, a formação de estruturas tridimensionais é realizada pela deposição de volumes determinados de células, juntamente ou não de substratos que irão formar os *scaffolds*, ou direcionando o desenvolvimento celular por meio de estímulos, como fatores de crescimento (Derby, 2013, Freeman *et al*, 2020). Existem diferentes abordagens em desenvolvimento para bioimpressão 3D a fim de que se tenha no futuro um órgão humano funcional que mantenha suas propriedades estruturais e mecânicas, sendo o principal desafio reproduzir os componentes e estrutura da microarquitetura da matriz celular em toda a sua complexidade e os múltiplos tipos celulares em resolução suficiente para manutenção das funções biológicas (Murphy & Atala, 2014).

1.3. Biomateriais

Acompanhando o termo biofabricação, a palavra biomaterial já foi utilizada em diferentes contextos ao longo da história, tanto para se referir a materiais derivados de recursos biológicos como para materiais que são utilizados em terapias, sendo aplicados diretamente no organismo (Griffith, 1999). Em um contexto de engenharia tecidual, biomaterial assume um sentido de estrutura que serve como arcabouço, sendo assim, um elemento essencial de fundação na biofabricação (Khang *et al*, 2006).

Quando se trata de bioimpressão 3D, as propriedades ideais desses materiais ainda representam uma questão não resolvida, e é motivo de intensa pesquisa. Isso porque os biomateriais podem apresentar características diversas e devem ser adaptados conforme a aplicação final. Entretanto, existem algumas características consideradas como fundamentais que devem ser alcançadas durante o desenvolvimento de biomateriais aplicáveis em processos de bioimpressão 3D. São elas: formação de arcabouços com propriedades mecânicas adequadas, com manutenção da fidelidade da forma e alta resolução, grau de geleificação adequado para extrusão com relativa facilidade, formação de arcabouços que se assemelham ao microambiente celular (estudo dos componentes da biotinta), biocompatibilidade, possibilidade de modificações químicas, escalabilidade com pequenas variações entre os lotes, entre outras (Kyle *et al*, 2017).

Na bioimpressão 3D, um termo usualmente utilizado é biotinta, e comumente substitui o uso da palavra biomaterial, entretanto, Groll e colaboradores, em 2018, definiram biotintas e biomateriais como termos distintos. Para esses autores, biotinta é o termo utilizado para os biomateriais que são empregados no processo de biofabricação quando esses já estão carregados de células, isso é, quando a célula em si é um componente que faz parte da formulação independente da forma que ela esteja: como agregados ou esferoides, como células livres ou mesmo apenas recobrando alguma estrutura. E, por outro lado, tem-se biomaterial como o termo empregado quando a formulação é composta exclusivamente por polímeros e o contato com as células ocorre após o processo de biofabricação. Para o trabalho em questão, essa distinção não será considerada, uma vez que se entende que os processos de desenvolvimentos de biomateriais na área são muitas vezes voltados para aplicação final em que as células são importantes, mesmo que em dado momento elas não estejam presentes.

Conforme demonstrado, os biomateriais são os elementos que tomam forma na bioimpressão, portanto, são fundamentais. Considerando que o biomaterial utilizado deve simular o microambiente de matriz extracelular, a composição e a organização ultraestrutural são fundamentais para determinar o destino da célula (Khang *et al*, 2006). Hidrogeis são comumente empregados para esse fim, por serem capazes de reter grandes quantidades de água, serem citocompatíveis e se apresentarem como géis – isso é, apresentam uma viscosidade que possibilita seu uso na bioimpressão, são adequados garantindo a viabilidade celular e uma manutenção mínima de estruturas (Ahmed, 2015; Hospodiuk *et al*, 2017). Há uma grande gama

de polímeros comumente utilizados para formação dos hidrogéis nos processos de biofabricação.

Entre os hidrogéis de polímeros comumente utilizados estão aqueles à base de alginato, um biomaterial biocompatível, que pode ser gelificado (processo conhecido como *crosslinking* - reticulação) (Hospodiuk *et al*, 2017). É um polissacarídeo natural linear aniônico que pode ser gelificado por diferentes mecanismos: alterando o pH ou pela adição de uma solução de cloreto de cálcio ou sulfato de cálcio; se apresentando como material de grande interesse na engenharia de tecidos, especificamente na composição de biotintas para bioimpressão 3D (Jungst *et al*, 2016; Hospodiuk *et al*, 2017).

Outro componente muito utilizado para formar as biotintas é a gelatina, um biomaterial proteico solúvel obtido pela hidrólise parcial do colágeno constituinte de ossos, cartilagens e pele. A capacidade de geleificação da gelatina possibilitou aplicações em diversas indústrias, desde a farmacêutica, passando pela alimentícia alcançando até a cosmética (Gómez-Guillén *et al*, 2011). Na engenharia tecidual, por promover a adesão celular e a proliferação, é de grande interesse (Wu *et al*, 2011; Bongo *et al*, 2013).

O alginato combinado com gelatina já foi empregado anteriormente em um processo bem-sucedido de bioimpressão de válvulas cardíacas. Nesse estudo foi possível obter estruturas contendo células, e estas apresentaram alta viabilidade e um fenótipo compatível com o de cultura celular (Duan *et al*, 2013). Outros estudos envolvendo o desenvolvimento de biomateriais com diferentes características buscaram explorar outras composições para as biotintas desenvolvidas, empregando polímeros como a quitosana (Demitas *et al*, 2017) funcionalizando-os e combinando com outros polímeros (Ng *et al*, 2016) ou também com carboximetilcelulose (Habib *et al*, 2018). Assim, o uso de multimateriais surge como uma alternativa para superar as limitações que determinado polímero apresenta quando é exclusivo na formulação (Chimene *et al*, 2016). Nesse caso, por exemplo, a combinação de alginato com gelatina gera a possibilidade de geleificação por mecanismos diversos: adição de cloreto de cálcio, pH e temperatura. Além de funcionalizações, outra forma de modular as características dos biomateriais é por meio da utilização de agentes reticulantes que alteram a forma que o biomaterial se estrutura. Assim, os polímeros que podem ser utilizados são diversos, e seu emprego, bem como seu processamento depende da aplicação desejada.

No desenvolvimento de uma biotinta para a bioimpressão 3D, alguns parâmetros quantitativos associados são mencionados pela literatura para caracterização das mesmas

quando aplicáveis em processos de bioimpressão sendo estes: reologia, composição e concentração dos componentes da biotinta; variáveis relacionadas à agulha; dimensões do biomaterial extrusado; geometria do grid; ângulo da impressão; resolução determinada por microtomografia; e concentração de oxigênio no microambiente de impressão (Kyle *et al*, 2017). Cada biomaterial adicionado em uma bioimpressora se comportará de forma diferente, sendo então necessário avaliar todas as características para cada nova formulação elaborada. De modo geral, muitos parâmetros analisados em relação a uma biotinta são agrupados em um mesmo conceito: printabilidade, um termo que remete à performance (desempenho) de determinado biomaterial (composição de polímeros) no processo de extrusão e manutenção da estrutura após esse processo (Naghieh & Chen, 2021).

1.4. Printabilidade

Na biofabricação, a fim de classificar e uniformizar a análise dessas tecnologias em termos de eficiência de fabricação e poder de manufatura, Moroni e colaboradores introduziram uma caracterização quantitativa de um processo, ressaltando a capacidade de uma técnica em produzir *scaffolds* (arcabouços) com detalhes em um determinado período de tempo, sendo essa avaliação dada pela fórmula da resolução espacial/tempo de manufatura (RTM) (Moroni *et al*, 2018). Esse estudo mostra a necessidade de métodos para demonstrar quantitativamente e qualitativamente os processos de biofabricação e padronização quando se fala de um campo que ainda tem muito espaço para desenvolvimento no quesito inovação.

O conceito de printabilidade emerge da necessidade de estabelecer uma forma de classificar, uniformizar, comparar e avaliar biomateriais em processos de bioimpressão 3D. Essa ideia é importante porque a diferença entre o design planejado e a estrutura impressa determina o sucesso da fabricação (Naghieh & Chen, 2021). Existem três aspectos principais que envolvem esse conceito: (i) abordagem de design, (ii) aspectos relacionados ao biomaterial, e (iii) parâmetros de impressão por si (Naghieh *et al*, 2020). Apesar dessa definição de aspectos, no processo de desenvolvimento e otimização (aperfeiçoamento) de uma biotinta, os limites entre eles são extrapolados devido à interdependência entre esses fatores. Isso é demonstrado pela necessidade de otimização de todos os parâmetros para cada biotinta com o estabelecimento de metodologias para alcançar esse objetivo (Habib *et al*, 2018; Naghieh *et al*, 2020; Webb & Doyle, 2017).

Em relação à abordagem de design, podem-se direcionar duas questões: o desenvolvimento de modelos, uma parte pouco explorada pela literatura quando se trata de bioimpressão 3D; e uma abordagem de adaptação de modelos CAD à aplicação que se deseja e ao biomaterial que será empregado (Naghieh & Chen, 2021). A geração de modelos pode ser realizada a partir de métodos de aquisição de imagens comumente utilizados na medicina diagnóstica, como a tomografia computadorizada e ressonância magnética. A modelagem realizada a partir de imagens pode apresentar informação em resolução espacial adequada para o desenvolvimento de bioimpressos com microarquitetura espacial definida (Murphy & Atala, 2014). Outra abordagem é o desenvolvimento de modelos bioinspirados *ab initio* ou inspirados em estruturas diferentes com outras propriedades estruturais.

Se tratando do desenvolvimento de biotintas são levados em consideração aspectos reológicos, como a viscosidade, e aspectos relacionados à manutenção da viabilidade celular, como citocompatibilidade, citotoxicidade, promoção da proliferação celular, moléculas que facilitem a adesão e sinalização celular (Chimene *et al*, 2016; Gopinathan & Noh, 2018; Gungor-Ozkerim *et al*, 2018).

Por fim, parâmetros de impressão como diâmetro da agulha, velocidade de impressão e pressão de extrusão são algumas variáveis que podem ser programadas em *software* de bioimpressão e são comumente testadas para alcançar um processo otimizado de impressão (Weeb & Doyle, 2017).

O grande desafio em se tratando de printabilidade está na seleção da metodologia a ser utilizada para testar diferentes parâmetros e condições para de fato caracterizar a adequação de biotintas para comparações de resultados. Nos últimos anos, propostas de abordagens para avaliar a printabilidade de biotintas já foram sugeridas, cada uma levando em consideração diferentes aspectos como fundamentais a serem avaliados (Paxton *et al*, 2017; Habib *et al*, 2018; Naghieh *et al*, 2020; O'Connel *et al*, 2020, Gillispie *et al*, 2020).

2. Motivação e justificativa

Considerando que a biofabricação é uma abordagem em crescente desenvolvimento, principalmente referindo às suas aplicações no que tange à área de engenharia de tecidos, há a necessidade de estudos para o aprimoramento da técnica em si bem como sua uniformização. Para tal, ainda são necessários estudos de avaliação dos biomateriais utilizados, além do

desenvolvimento e aprimoração dos mesmos bem como estudos que possibilitem aprofundar o estudo de técnicas pouco exploradas normalmente.

Sendo a bioimpressão 3D considerada padrão ouro na biofabricação, muitas pesquisas têm focado nessa estratégia, e por isso, muitos desafios têm surgido ressaltando a necessidade de pesquisas na área com novas propostas e abordagens conceituais e experimentais.

Dessa forma, a fim de padronizar a aplicação de biomateriais em processos de bioimpressão 3D, especificamente por extrusão, há espaço para o desenvolvimento de uma metodologia que possibilite o acesso a informações sobre a adequabilidade da biotinta no sentido estrutural, sendo esse então o que se propõe a seguir. Esse trabalho propõe estabelecer uma forma para obtenção de dados qualitativos e quantitativo em estudos para avaliação da printabilidade de biotintas para processos de bioimpressão baseados em extrusão em relação à manutenção da forma utilizando como base ferramentas de planejamento experimental.

3. Objetivo

3.1. Objetivo geral

Explorar diferentes abordagens para a caracterização da printabilidade de biotintas aplicáveis ao processo de bioimpressão 3D por extrusão.

3.2. Objetivos específicos

- Confeccionar modelos CAD que possibilitem caracterizar constructos bioimpressos no sentido estrutural (Capítulo II);
- Estabelecer uma sequência de testes com os modelos CAD propostos para a caracterização (Capítulo II);
- Propor novos modelos CAD que possam ser utilizados em bioimpressão 3D (Capítulo II);
- Determinar o biomaterial a ser utilizado nos testes de printabilidade utilizando uma abordagem assistida pelo buscador Google (Capítulo II);
- Determinar quais as variáveis serão consideradas para avaliar a printabilidade (Capítulo III);
- Utilizar o Planejamento experimental do tipo Composto Central (PCC) para o delineamento experimental (DOE) e testar o biomaterial utilizado nas condições geradas pelo PCC em 4 bioimpressoras diferentes (Capítulo III);

- Validar os modelos matemáticos criados a partir da aplicação do PCC estatisticamente (Capítulo III).

4. Estratégia experimental

Nesse trabalho, o conceito da printabilidade foi considerado sob duas perspectivas diferentes: abordagem de design e parâmetros de impressão (Figura 3), sendo as duas partes desenvolvidas de modo independente.

Na abordagem de design, foram desenvolvidos modelos CAD a partir de uma revisão bibliográfica de artigos na literatura na área de biofabricação. Esses modelos computacionais não foram empregados no processo de bioimpressão em si.

Em relação aos parâmetros de bioimpressão 3D, foi determinada a composição e concentração de polímeros para compor uma biotinta (gelatina e alginato de sódio) para a os ensaios com diferentes configurações dos parâmetros (teste alterando diâmetro da agulha, *extrusion multiplier*, velocidade de impressão). O modelo CAD utilizado foi diferente dos modelos gerados anteriormente, visando a simplificação do modelo matemático. Essa biotinta foi testada em diferentes condições de ensaios geradas a partir de um delineamento experimental do tipo PCC (Planejamento Composto Central) em 4 bioimpressoras. As condições variavam em relação a três parâmetros de impressão.

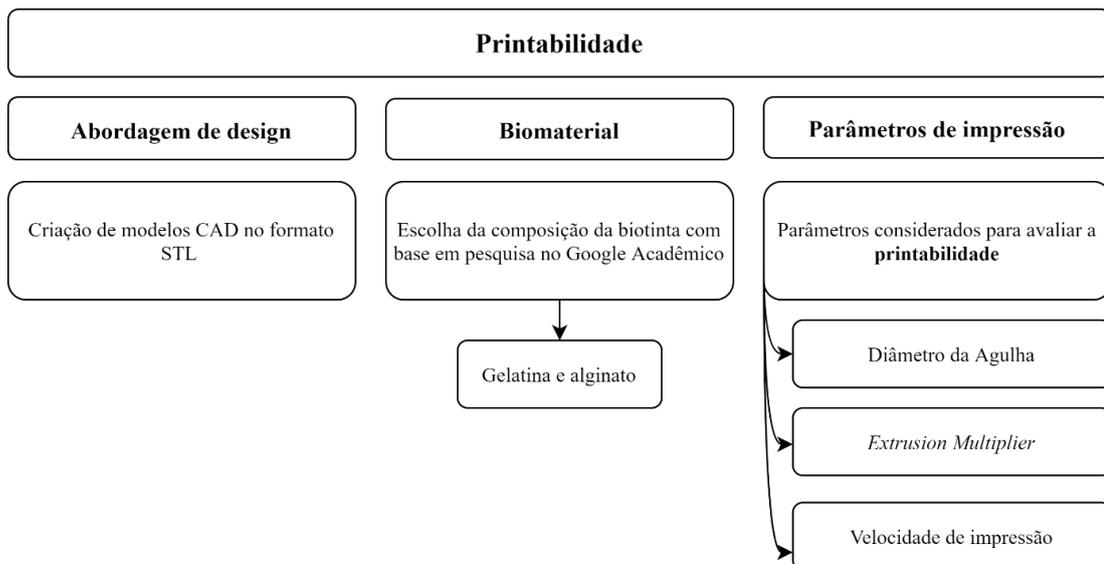


Figura 3. Diagrama com a representação da abordagem escolhida para abordar a printabilidade nesse trabalho.

4.1. Estrutura da Dissertação

Essa dissertação foi dividida em três capítulos. No capítulo que aqui se encerra (Capítulo I), foram destacados conceitos e terminologias na área de biofabricação, realçada a importância do estudo na forma da motivação e justificativa e delimitados os objetivos geral e específicos.

O Capítulo II volta-se para a abordagem de design na bioimpressão 3D dentro do conceito de printabilidade, buscando a caracterização através do uso de diferentes modelos CAD.

No Capítulo III, é proposta uma abordagem estatística inovadora na área de bioimpressão para a configuração dos parâmetros em bioimpressoras, em que o conceito de printabilidade é explorado agora sob a perspectiva de equipamentos e *software* que são utilizados na área.

Por fim, algumas considerações finais são dadas na forma de perspectivas futuras seguida da referência bibliográfica e dos anexos.

Capítulo II – Abordagem de design para a bioimpressão 3D

1. Introdução

As etapas da bioimpressão 3D são: a modelagem de estruturas computacionalmente, a escolha de biomaterial, a escolha de parâmetros e a impressão em si. Considerando a primeira etapa, o desenvolvimento de modelos, tem-se as abordagens de design como parte fundamental na bioimpressão 3D. Nos últimos anos, por ser uma área de grande importância dentro da área da engenharia tecidual, o emprego de tecnologia assistidas por computador na Bioengenharia estabelece um termo próprio: Engenharia de Tecidos Assistida por Computador (CATE) (Sun *et al*, 2005). As tecnologias voltadas para a modelagem são diversas e possibilitam o desenvolvimento de modelos com diferentes características explorando a diversidade de aplicações dentro da área de biofabricação.

De forma geral, o ponto principal colocado é o de que o design deve ser voltado para a aplicação desejada final, pois a partir do critério escolhido e em relação a características desejáveis e mandatórias, o comportamento final do constructo pode ser modulado e adaptado. Isso é, por exemplo, para a manutenção da viabilidade celular para uma futura implantação, há a necessidade de escolha de biomateriais compatíveis e de uma porosidade adequada que proporcione a vascularização. Portanto, há a necessidade de desenvolvimento de modelos que permitam o fluxo de nutrientes, fatores de crescimento e trocas gasosas. Em outra situação, diante da possibilidade de construção de estruturas grandes, as propriedades mecânicas devem ser de maneira que a forma seja mantida à medida que as camadas são depositadas (Giannitelli *et al*, 2014; Ozbolat & Gudapati, 2016). Entretanto, modelos desenvolvidos especificamente para a bioimpressão 3D ainda são pouco explorados na literatura.

A partir da diversidade de abordagens de design na biofabricação e na engenharia de tecidos, no contexto de printabilidade, esses modelos surgem com uma possibilidade de caracterização e validação de biotintas desenvolvidas para a bioimpressão 3D, além de direcionar a possível aplicação delas conforme o comportamento observado.

2. Material e Métodos

2.1 Modelos para caracterização de biotintas para bioimpressão 3D

O desenvolvimento de modelos para testar a adequabilidade de biomateriais em processos de bioimpressão 3D foi realizado após uma abrangente revisão na literatura em

relação ao estado da arte do que já foi testado para esse fim e observação de ideias aplicadas por usuários de impressoras 3D. Após essa revisão, foi estabelecida uma sequência de diferentes modelos que pudessem desafiar os biomateriais de diferentes formas e definir as prioridades caracterizando qualitativamente e macroscopicamente um biomaterial empregável em processos de bioimpressão.

Os modelos CAD foram criados na plataforma Tinkercad, uma plataforma aberta para modelagem CAD que permite exportar arquivos no formato STL, um formato (extensão) de arquivo adequado para uso em bioimpressoras. Na plataforma Tinkercad (<https://www.tinkercad.com/>), os modelos foram criados a partir de adaptações de estruturas já disponibilizadas pelo *software* (Figura 4). As formas básicas, como cubos, foram redimensionadas e reestruturadas conforme a necessidade para a criação de estruturas novas. Os modelos foram criados com dimensões adaptadas para bioimpressão utilizando três diâmetros de agulhas distintos: 0,41 mm; 0,84 mm; 1,5 mm.

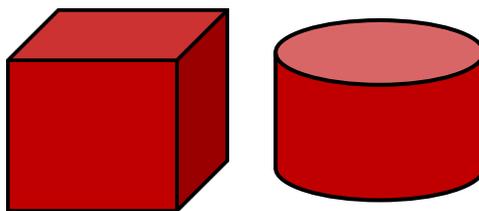


Figura 4. Sólidos utilizado como base para desenvolvimento de modelos na plataforma Tinkercad. Do lado esquerdo, tem-se um paralelepípedo e do lado direito, um cilindro.

Primeiro modelo: Para a criação do modelo, paralelepípedos foram manipulados e posicionados de forma a compor o modelo e fusionados através do comando “Agrupar” do Tinkercad. Ao todo, 17 paralelepípedos foram criados, 9 formando o modelo na horizontal e 8 na vertical.

Os paralelepípedos que compõe o modelo na horizontal, isso é, cada “linha”, possuíam dimensões variáveis que foram ajustadas para testes de bioimpressão. Como três diâmetros de agulhas diferentes (0,41 mm; 0,84 mm; 1,5 mm) foram considerados no desenvolvimento de modelos, as dimensões finais dos paralelepípedos orientados na Figura 8 de forma horizontal foram distintas entre os modelos, sendo a medida final de cada um dada por $10 \text{ mm} \times \text{DA} \times \text{DA}$, sendo DA o diâmetro da agulha.

Os paralelepípedos que compõem o modelo na vertical, possuíam dimensões variáveis de forma que o espaçamento entre os paralelepípedos na horizontal fosse de 1 mm, 2 mm, 3 mm, 4 mm, 5 mm, 6 mm e 7 mm. Para que essa separação pudesse ser mantida, as dimensões foram $(2DA + X) \times DA \times DA$, em que, DA é o Diâmetro da Agulha, e X é o espaçamento entre as “linhas” do modelo. Dessa forma, para a primeira agulha, as dimensões do paralelepípedo menor seria: $1,82 \times 0,41 \times 0,41$ mm.

Todos os paralelepípedos foram posicionados com auxílio das setas para os lados do teclado a fim de alcançar a precisão desse posicionamento. E, por fim, cada modelo foi exportado no formato STL, resultando em 3 modelos com dimensões distintas para ser utilizado em testes de bioimpressão 3D.

Segundo Modelo: O segundo modelo é uma adaptação do primeiro no Tinkercad. O primeiro modelo foi duplicado, um deles foi rotacionado 90° e posicionado sobrepondo o outro. O modelo novamente foi exportado no formato STL.

Terceiro modelo: Assim como para o primeiro, o sólido base, na forma de um paralelepípedo, foi utilizado para a modelagem da estrutura tridimensional. As dimensões do modelo foram também adaptadas para o diâmetro de três agulhas, (as mesmas utilizadas nos modelos anteriores). Para obter o posicionamento preciso, as setas foram novamente utilizadas, dessa vez, inclusive a seta voltada para cima. Em seguida, assim como nos modelos anteriores, a ferramenta “Agrupar” foi utilizada para a fusão dos paralelepípedos, resultando em uma estrutura única. A dimensão do poro também foi variável conforme o tamanho da agulha, uma vez que o valor da altura foi adaptado para cada diâmetro de agulha para o qual o modelo foi desenvolvido. O modelo foi exportado no formato STL.

Quarto modelo: Para o desenvolvimento desse modelo, quatro paralelepípedos foram redimensionados separadamente, cada um deles com a altura adaptada para 15, 20, 25 e 30 camadas conforme os três diferentes diâmetros da agulha: 0,41 mm; 0,84 mm e 1,5 mm. Dessa forma, o quarto modelo para a primeira agulha era composto de paralelepípedos de 6,15 mm; 8,2 mm; 10,25 mm e 12,3 mm. O modelo formatado por 4 paralelepípedos em conjunto foi exportado no formato STL.

Quinto modelo: Para a construção dessa estrutura, o sólido utilizado como base foi o cilindro. Para criar o orifício interno no cilindro, ou seja, para a formação da estrutura tubular, foi utilizada a opção “Orifício” em um cilindro menor. Essa ferramenta possibilita uma operação de subtração da estrutura selecionada com a função “Orifício” da estrutura selecionada

como “Sólida”. As dimensões das estruturas sólidas seguiram a fórmula: $(60 \times DA) \times (60 \times DA) \times (30 \times DA)$, e as do orifício foram $(20 \times DA) \times (20 \times DA) \times (30 \times DA)$, DA igual ao Diâmetro da Agulha (0,41 mm; 0,84 mm e 1,5 mm). O posicionamento foi executado com o auxílio das setas do teclado e da ferramenta “Alinhar”. O modelo foi exportado no formato STL.

Sexto modelo: Para esse modelo, as dimensões consideradas para o redimensionamento do cubo em um paralelepípedo foram fixas, são elas: $5 \times 10 \times 20$ mm. E os ângulos entre o paralelepípedo e a base foram de 15° , 30° , 45° , 60° , 75° e 90° . O modelo composto por 5 paralelepípedos foi exportado em formato STL.

2.2 Outros modelos

Outros modelos propostos como forma de exploração da bioimpressão 3D, foram desenvolvidos e adaptados no *software* Blender (Community, 2018; versão 2.92.0) a partir do que já existe disponível em bancos de modelos CAD no formato STL, no *Thingiverse* e *Myminifactory*. A partir de uma pesquisa utilizando os termos: “egg”, “organic vase” nos dois bancos de modelos citados, foi possível a seleção de estruturas que podem ser utilizadas, após adaptações na bioimpressão 3D. Nesse caso, apenas o redimensionamento foi feito através da definição de volume dentro da ferramenta “*Scene Properties*”, dessa forma, pensando em bioimpressão é possível adequar as dimensões em relação ao volume de hidrogel.

Estruturas inspiradas em ovos, modeladas por Antoni_Nosek: são doze modelos com características diferentes entre si, com diversos padrões superficiais que foram importados no Blender, dimensionados para uma aplicação na bioimpressão 3D. Arquivos originais disponíveis em: <https://www.thingiverse.com/thing:2829553>.

Estrutura no formato de vaso, modelado por Clockspring: estrutura com um orifício interno passível de modificações no Blender. Arquivo original disponível em: <https://www.myminifactory.com/object/3d-print-pinstriped-table-vase-71432>.

Além de estruturas complexas utilizadas na impressão 3D que já se encontram disponíveis em bancos de modelos e que podem ser adaptadas e redimensionadas. Modelos de cubo, cilindro, pirâmide, semiesfera e toroide foram criados no Tinkercad a partir de sólidos iniciais já disponíveis, e redimensionados no Blender de forma que o volume final de cada estrutura fosse de 512 mm^3 , 2197 mm^3 e 4096 mm^3 .

3. Resultados

3.1. Sequência de modelos

Uma sequência de modelos CAD que possam caracterizar diferentes aspectos de uma biotinta empregada no processo de bioimpressão 3D foi proposto. Na Figura 5 estão apresentados seis modelos sequenciais, bem como algumas características as quais são extraídas com cada um deles. Esses modelos estão disponíveis em um [Google Drive](#) para visualização e *download*.

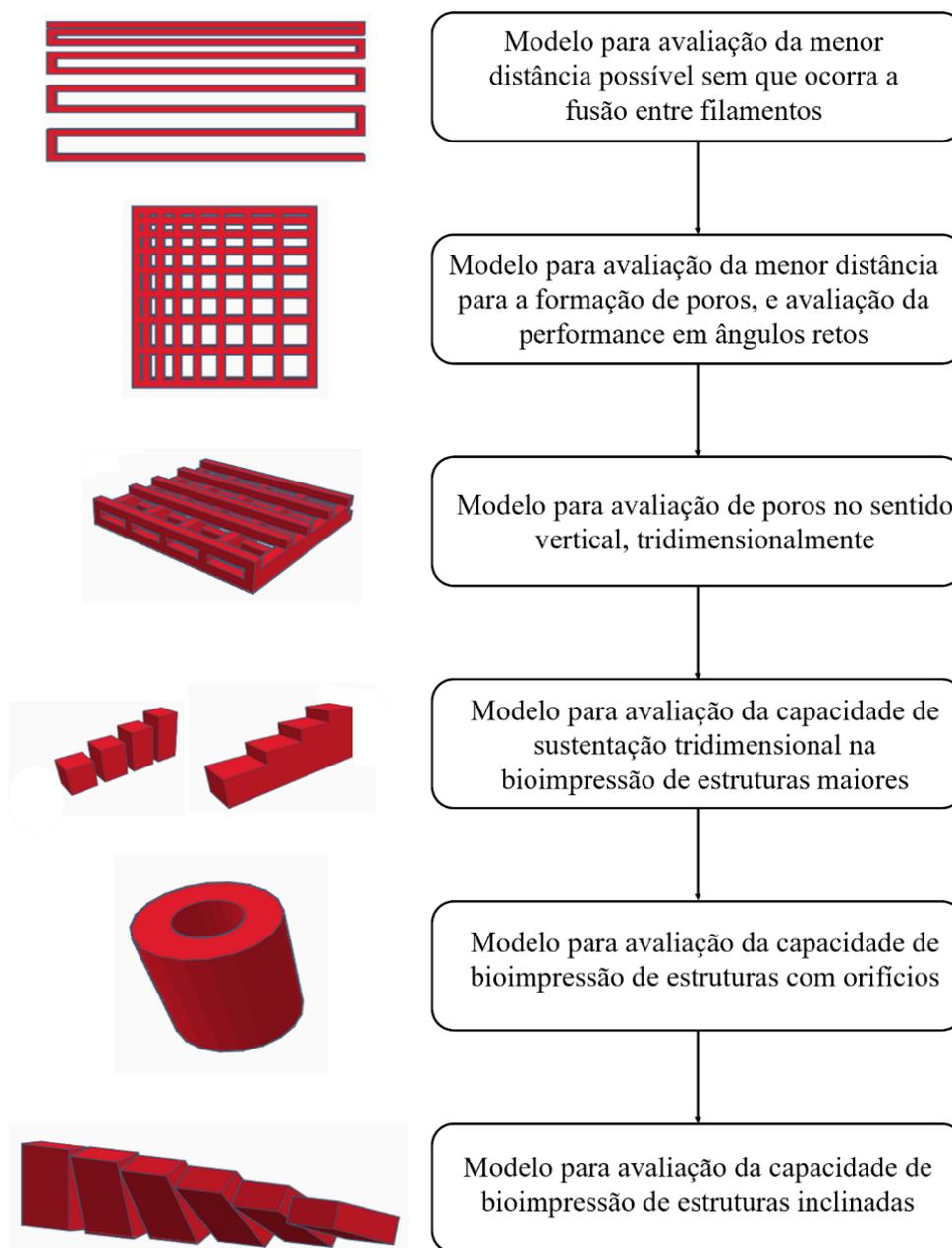


Figura 5. Fluxograma composto pela sequência de seis modelos (duas versões do quarto modelo) propostos para avaliação da printabilidade de uma biotinta em processo de bioimpressão 3D por extrusão, criados na plataforma Tinkercad.

3.2. Outros modelos

Considerando a bioimpressão 3D como oportunidade para explorar a possibilidade de produzir bioestruturas com formatos diversos, outros modelos que poderiam ser testados de forma a apresentar características possivelmente distintas são apresentados como possibilidades de inovação. Extrapolando a possibilidade de utilizar os modelos como formas de caracterizar biomateriais, modelos com diferentes arquiteturas e padrões podem ser utilizados para alcançar diferentes propriedades. Para exemplificar essas possibilidades alguns modelos foram adaptados e são propostos como exemplos ainda a serem explorados em processos de bioimpressão.

Cubos, semiesferas, cilindros, toroide e pirâmides foram modelos criados para bioimpressão 3D. A proposta desses modelos é apresentarem o mesmo volume para serem comparáveis entre si em relação à estabilidade. Assim, modelos com três volumes diferentes foram criados.



Figura 6. Modelos propostos para explorar posicionamento tridimensionais diferenciados na bioimpressão 3D. Da esquerda para direita: modelo inspirado em um ovo desenvolvido por Antoni_Nosek, modelo desenvolvido por Clockspring no formato de vaso, modelo de semiesfera desenvolvido no Tinkercad e redimensionado volumetricamente no Blender, modelo de pirâmide desenvolvido no Tinkercad e redimensionado volumetricamente no Blender.

4. Discussão

4.1. Proposta para avaliar printabilidade abordagem de design

Considerando os três aspectos principais levados em consideração para avaliação da printabilidade (abordagem de design, escolha do biomaterial e configuração de parâmetros), a criação de modelos 3D que sirvam como base para realização dos testes é fundamental. Uma sequência de modelos a seguir é proposta para testes mecânicos e estruturais de biomateriais em processos de bioimpressão 3D por extrusão. Tendo a bioimpressão como uma tecnologia de manufatura aditiva derivada da impressão 3D, os modelos estabelecidos foram inspirados em testes de impressão 3D (Figura 7) que são comumente realizados por usuários de máquinas de

impressão com plástico para avaliar parâmetros de impressão, calibração (ALL3DP), mas adaptados às necessidades da bioimpressão e, principalmente, de avaliação dos biomateriais.



Figura 7. Modelo para calibração de impressora 3D desenvolvido por usuário do Thingiverse e disponibilizado publicamente. Fonte: majda107, Thingiverse.

4.1.1. Primeiro e segundo modelos

O primeiro modelo (Figura 8) foi desenvolvido com base no que pesquisadores já costumam analisar inicialmente em relação a biotintas, e surge da necessidade de conhecimento do comportamento básico de um biomaterial em relação a expansão ou retração após passar pelo processo de extrusão, bem como a viscosidade e a tensão superficial que pode acarretar em diferentes comportamento quando o biomaterial é posicionado em ângulos retos (Paxton *et al*, 2017, Habib *et al*, 2018; Naghieh *et al*, 2019).

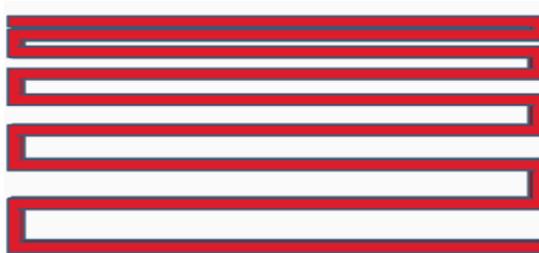


Figura 8. Modelo para avaliar a distância mínima entre filamentos na qual é possível extrudar a biotinta sem que os filamentos se fusionem. Esse modelo consiste em linhas paralelas posicionadas de forma que a distância entre elas aumente gradativamente milímetro a milímetro a partir de 1 mm até 7 mm.

Esse modelo (Figura 8) consiste em linhas paralelas do biomaterial são depositadas em zigue zague conforme modelo da Figura. A distância entre filamentos varia tipicamente de 1 a 8 mm, sendo o incremento sempre de 1 mm. Conforme Habib e colaboradores (2018), esse modelo deve ser testado em duas orientações, o que permitiria avaliar também a calibração da bioimpressoras em si.

Por meio deste teste é possível perceber qual a resolução espacial mínima que uma biotinta tem com o emprego de agulhas de diferentes diâmetros, sendo a distância mínima em que é possível diferenciar duas linhas como linhas independentes, o valor correspondente à resolução. O mesmo vale para análise do quadrado (Figura 9), em que é possível também avaliar a resolução quando há o cruzamento das estruturas extrusadas. Resultados possíveis são de fusão nas junções de 90° de modo que os vértices do quadrado não se mantenham, e no lugar delas, haja uma formação arredondada e o de manutenção do ângulo reto.

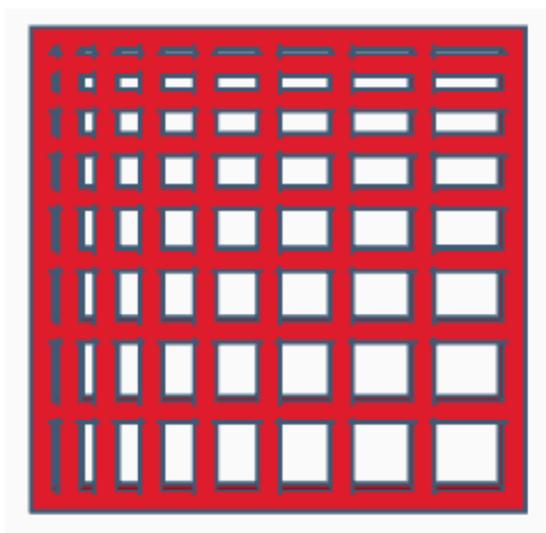


Figura 9. Sobreposição do modelo de zigue-zague, criado no Tinkercad, possibilita a avaliação da distância mínima na qual é possível depositar dois filamentos sem que haja uma fusão, bem como analisar o comportamento de dois filamentos quando posicionados perpendicularmente.

Nessa avaliação, uma biotinta ideal para aplicação em processos de bioimpressão baseada em extrusão seria aquela que apresente um valor para distância entre dois filamentos sem fundir pequena (quanto menor esse número, maior o controle sobre a localização do hidrogel extrusado) e que na avaliação do quadrado mantém os vértices dos quadrados internos do modelo definidos, uma análise previamente denominada geometria do poro (Habib *et al*, 2018). Caso essas condições sejam satisfeitas, há um indício de que a biotinta possui uma capacidade de manutenção de forma adequada para o posicionamento espacial bidimensional

fidedigno em relação ao idealizado pelo modelo. Quanto menor for a distância entre o design do modelo e a estrutura impressa, mais fácil é projetar estruturas que possam ter sua função direcionada pelo design.

Além disso, a formação clara de um poro, isso é, a não fusão de filamentos supre uma necessidade já demonstrada pela literatura no quesito manutenção da viabilidade e proliferação celular em arcabouços celularizados (Khoda, Ozbolat & Koc, 2013).

4.1.2. Terceiro modelo

Para avaliar a capacidade de uma biotinta em sustentar uma camada sobre a outra com intervalos de espaços referentes aos poros em um espaço tridimensional propõe-se o seguinte modelo para teste: camadas de biotinta são depositadas em um padrão jogo da velha (de grade). O modelo consiste em linhas sobrepostas a um padrão de colunas perpendiculares, formando um jogo da velha, e por fim, mais uma camada de linhas orientadas da mesma forma que a primeira camada. Nesse modelo (Figura 10), há uma distância entre a primeira e a terceira camadas que correspondem a poros verticais e esse espaço é o motivo para a realização do teste e, por isso, o resultado a ser analisado. Para esse teste, os parâmetros da impressora são extremamente importantes, sendo a altura da camada o fator que determina o sucesso da avaliação, isso porque é esse valor que vai determinar o espaço que será analisado.

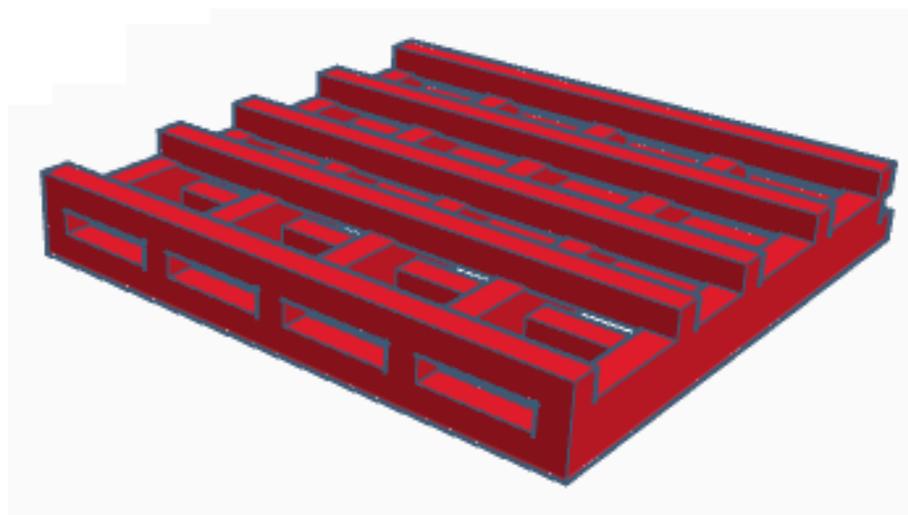


Figura 10. Modelo para avaliar a capacidade de empilhar e a formação de poros criado no Tinkercad. Esse modelo é composto de camadas alternadas de linhas orientadas na vertical e horizontal, permitindo a formação de espaços, considerados os poros.

Considerando a formação de bioestruturas com células, a presença de poros nesses arcabouços serve como possibilidade para aumentar a eficiência da sementeira de células ou mesmo esferoides. Estudos mostram que a presença de um gradiente de poros aumenta a eficiência da sementeira das células em cerca de 35% (Lee *et al*, 2010; Sobral *et al*, 2011; Khoda, Ozbolat & Koc, 2013).

4.1.3. Quarto modelo

Considerando a aplicação da bioimpressão 3D na engenharia de tecidos no que tange à produção de tecidos e órgãos, por exemplo, há a necessidade de obtenção de biotintas que sejam capazes de formarem estruturas com tamanho (volume) consideravelmente grande e com manutenção da forma.

Essa avaliação mecânica e estrutural permite ter uma ideia de qual o tamanho de estruturas que determinada biotinta é capaz de sustentar no eixo z (altura). Para essa análise, dois modelos poderiam ser utilizados, mas com resultados ligeiramente diferentes. No modelo escada, a estrutura é única, sendo construída a cada degrau por vez e permitindo maior estabilidade (Figura 11). Assim, nesse resultado o tamanho máximo que a estrutura pode alcançar tende a ser maior. Por outro lado, tem-se que o modelo em que cada degrau é separado em um objeto independente, cada estrutura realmente sustenta apenas a si própria (resultado diferencial de cada um dos modelos).

Com esses resultados é possível inferir qual o tamanho das estruturas que uma biotinta é capaz de bioimprimir mantendo a forma. Diante desses dados, é possível utilizar o valor de altura encontrado nesse teste como referência para desenvolvimentos de formulações no futuro.

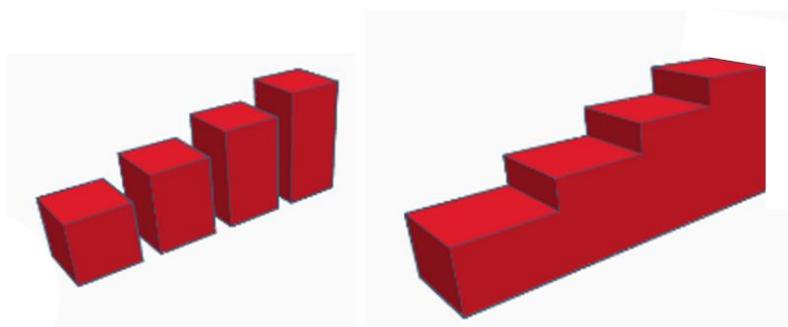


Figura 11. Modelo para avaliar a sustentação vertical, ou seja, a manutenção da forma criado no Tinkercad. Do lado esquerdo, a primeira versão do modelo, composto de estruturas que não se conectam entre si e do lado direito, o modelo é composta de uma estrutura única.

Da mesma forma que no modelo anterior, parâmetros relacionados à altura da camada e tipos de preenchimento devem ser considerados para essa avaliação a cada caso, uma vez que afetam diretamente a forma final do constructo (Gleadall *et al*, 2018). Para que bioimpressos tenham um tamanho clinicamente relevante, é necessário avaliar como uma biotinta se comporta na formação dessas estruturas, bem como diferentes parâmetros podem ser otimizados para o escalonamento (Malda *et al*, 2013).

4.1.4. Quinto modelo

Assim como a capacidade de manutenção de estruturas grandes, é necessário também avaliar se a biotinta é capaz de formar estruturas que mesmo sem ser completamente sólidas, como por exemplo, com orifícios no meio (ocas), consigam manter a estrutura, como é possível observar na Figura 12 (modelo). Neste caso, a espessura da parede das estruturas é um outro aspecto a ser considerado, bem como altura da camada

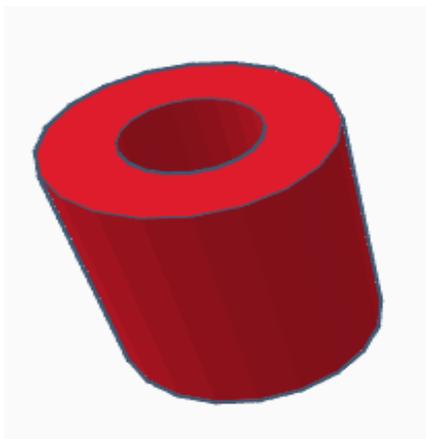


Figura 12. Modelo para avaliar sustentação de estruturas com orifício criado no Tinkercad. Essa estrutura consiste em um tubo, no qual o diâmetro do orifício equivale à 1/3 do diâmetro total do tubo.

Para a impressão de modelos sólidos ocos como esse, parâmetros relacionados à altura e ao padrão interno de preenchimento afetam diretamente a resolução da impressão e devem ser otimizados quanto ao processo para a realização dessa avaliação.

4.1.5. Sexto modelo

O teste de estruturas inclinadas é comumente executado para avaliar impressões 3D utilizando termoplásticos para avaliação da superfície formada quando o modelo apresenta geometrias complexas. Adaptado, ele pode ser utilizado também na bioimpressão 3D com

hidrogeis (Figura 13). Este tipo de teste é necessário considerando ainda a necessidade de desenvolver arquiteturas desafiantes em estruturas semelhantes às que órgãos podem ter.

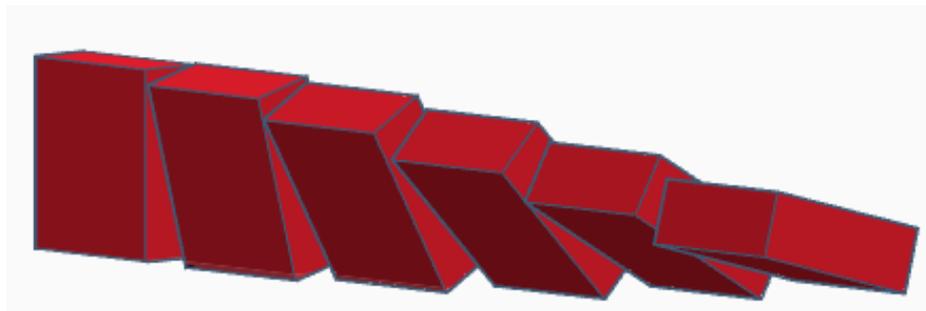


Figura 13. Modelo para avaliar a sustentação de estruturas inclinadas criados no Tinkercad. A estrutura mais a esquerda possui um ângulo de 90° em relação a linha onde está apoiada, e esse ângulo sofre um incremento de 15° a cada estrutura à direita.

4.2. Outros modelos

Formas ovais são utilizadas na arquitetura ao longo da história por diferentes povos por se mostrar adequada para sustentação (Huerta, 2007). Nesse sentido, desconsiderando o material, o resgate da ideia do design arquitetônico estrutural para o processo de bioimpressão 3D pode se mostrar interessante. No presente trabalho, um modelo bioinspirado no ovo de galinha foi redimensionado a partir de modelos já existentes para exemplificar essa ideia, bem como modelos orgânicos de vasos com formatos não convencionais na bioimpressão 3D são mostrados para exemplificar as possibilidades de modelos que podem ser explorados.

Esses modelos são corroborados por abordagens para otimização de topologia visando à criação de arcabouços já propostos na engenharia de tecidos para geração de modelos porosos (Hollister & Lin, 2007; Bidan *et al*, 2012). Embora essa abordagem ainda se restrinja a arcabouços voltados para biofabricação de ossos com hidroxiapatita, um material com uma forma de fabricação bem diferente da impressão com hidrogeis, mostra que há espaço para expansão nas estratégias de modelagem. Por serem materiais com comportamentos diferentes esses modelos não servem diretamente para a bioimpressão 3D com hidrogeis, mas sinalizam uma aplicação de técnicas de otimização para geração de modelos adaptados para esse tipo de biofabricação.

Além dos modelos por si só, os diferentes padrões de preenchimento possíveis (linhas, colmeia, triângulos, círculos concêntricos, entre outros) também se apresentam como possibilidade de experimentação na obtenção de comportamentos variados (Kolind *et al*, 2012). Estudos de engenharia tecidual já relataram a importância do micropadrão de biomateriais,

apesar de novamente em um contexto de biocerâmicas (Xing *et al*, 2019). Contudo, com o desenvolvimento e avanço das técnicas de bioimpressão 3D por extrusão esse conhecimento deverá ser aplicado e sua adoção será possivelmente necessária.

Portanto, abordagens de design para desenvolvimento de modelos aplicáveis na bioimpressão 3D tanto como forma de caracterização de hidrogéis como para explorar as possibilidades da técnica representam um espaço ainda a ser explorado. O controle do comportamento celular pode ser alcançado por meio de modelagens específicas, o que corrobora a necessidade de desenvolvimento de novos modelos na área.

4.3. Limitações

Embora a sequência inicial de modelos busque caracterizar a biotinta em relação à possibilidade de aplicação de microestruturas internas, os outros modelos desenvolvidos possibilitam a caracterização da printabilidade em relação principalmente à geometria externa e avaliações mecânicas macroscópicas de manutenção de forma.

Diferentes tipos e níveis de preenchimentos dos modelos na bioimpressão 3D propriamente dita podem resultar em comportamentos bem distintos em relação às macroestruturas iguais. Essa propriedade e os possíveis comportamentos não foram delineados por esse trabalho.

5. Conclusão

A sequência de modelos permite avaliações iniciais em relação à biotinta empregada no processo de bioimpressão 3D, como possibilidade de formação de poro que são fundamentais para o desenvolvimento de constructos funcionais e são voltados para a estrutura interna. Foram desenvolvidos modelos para testes utilizando três diâmetros de agulhas distintos na bioimpressão, mas é possível adaptá-los para ajustá-los conforme a necessidade.

Os outros modelos gerados indicam um caminho a ser explorado no desenvolvimento de constructos bioinspirados na bioimpressão 3D.

Considerando que as biotintas são comumente compostas por hidrogéis, variações entre o design e a estrutura final impressa devem ser levadas em consideração para o processo de caracterização, uma vez que manter a fidedignidade com o modelo computacional em 100% não deve ser o objetivo final.

Capítulo III – Biotinta e Parâmetros de Bioimpressão

1. Introdução

Metodologias para avaliar a impressão de biotintas ainda não representam um consenso na literatura, apesar de proposições diferentes para caracterizar a printabilidade (Paxton *et al*, 2017; Habib *et al*, 2018; Naghieh *et al*, 2020; O’Connel *et al*, 2020, Gillispie *et al*, 2020). Modelos matemáticos podem ser de grande valia para entender a influência de parâmetros de impressão, bem como otimizar o processo em si da bioimpressão 3D. Nesse sentido surge a ideia da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) como ferramenta de planejamento experimental que pode ser aplicada à bioimpressão, especificamente na otimização de parâmetros para impressão de uma biotinta.

A MSR desenvolvida por Box e Wilson (1951) é utilizada no planejamento experimental a fim de otimizar processos e design de produtos. Essa metodologia combina modelos matemáticos (funções polinomiais lineares e quadráticas) a testes estatísticos, buscando o ajuste desses modelos aos dados experimentais com o objetivo de realizar previsões estatisticamente válidas (Myers *et al*, 2004). A ideia é que os coeficientes da função sejam ajustados aos dados experimentais exigindo o menor número de experimentos possível e condições para avaliação do modelo (Bezerra *et al*, 2018)

Esse método tem sido muito utilizado por diversos setores da indústria na otimização de processos para, por exemplo, redução de custos e tempo, e aumento de produtividade. Outras áreas que também se beneficiam dessa metodologia vão desde ciências sociais e psicologia (Qu *et al*, 2021) até física e química (Mousavi *et al*, 2021).

Para o entendimento da MSR, alguns conceitos se fazem necessários. Desenho experimental (*Design of Experiments - DOE*) é o conjunto de condições experimentais que dita os diferentes níveis de combinações entre as variáveis. Fatores são as variáveis experimentais (independentes) que são controladas. Níveis das variáveis são os valores que cada valor pode assumir. Respostas estão relacionadas aos dados obtidos como resultado no experimento. Finalmente, resíduos são as diferenças obtidas entre as respostas calculadas e obtidas que permitem a avaliação da adequabilidade do modelo (Bezerra *et al*, 2008).

Para aplicar a MSR algumas etapas precisam ser completadas: é necessário selecionar as variáveis independentes que influenciam o sistema, escolher o DOE, escolher o tratamento

matemático e estatístico que se ajustem aos dados obtidos, avaliar o modelo de ajuste e determinar as condições ótimas (Bezerra *et al*, 2008).

A escolha de variáveis é realizada de acordo com as variáveis que podem ser controladas no processo e que se deseja analisar e otimizar, assim como os níveis delas. As condições com as combinações de variáveis são dadas pelo desenho experimental.

O modelo para o desenho experimental mais simples que pode ser utilizado em MSR baseia-se em funções lineares (de primeira ordem) que geram uma superfície de resposta plana. Descrita pela Equação 1, tem-se uma função linear, em que β_i representa os coeficientes das variáveis lineares, x_i são as variáveis e o ε é o erro aleatório associado ao modelo.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (1)$$

Entretanto, o modelo de primeira ordem não apresenta curvatura na resposta, e por isso, não representa sistemas com fatores com mais de dois níveis. Nesse caso, funções de segunda ordem são indicadas para esses sistemas (Box e Draper, 1987), descritos na Equação 2, em que se adiciona os coeficientes de interação entre as variáveis.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

Por fim, modelos que utilizam a função polinomial quadrática (Equação 3) possibilitam a análise de pontos críticos de um sistema. Dentre os modelos quadráticos, existem os planejamentos fatoriais de três níveis, Box-Behnken, Composto Central e Doehlert.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

Para cada modelo, os valores das variáveis são codificados para os níveis experimentais e em seguida, por meio do método dos quadrados mínimos (regressão múltipla), o ajuste do modelo matemático aos dados experimentais é aplicado. A partir desses dados, gráficos de superfície de resposta que permitem identificar condições ótimas são plotados (Bezerra *et al*, 2008).

A avaliação do modelo de ajuste é importante para garantir que o modelo é capaz de fazer previsões adequadas sobre o sistema. Para isso, a análise de variância é utilizada para avaliar os coeficientes do modelo e a interferência na resposta. A ANOVA é utilizada para entender se os coeficientes do modelo interferem significativamente na modelagem da superfície de resposta (Galdámez 2002). Para a avaliação do ajuste do modelo matemático em relação aos dados, utilizando o teste de Fisher é possível comparar os valores de F, F falta de

ajuste/ F erro puro em relação ao F tabelado, caso o primeiro seja menor que o segundo, o modelo pode ser considerado satisfatório (Teófilo e Ferreira, 2006).

O Planejamento Composto Central (PCC) é um tipo de MSR que conta com as condições experimentais dadas pela combinação dos pontos fatoriais (-1 e +1), pontos axiais (- e + α) e ponto central (nível zero) dos níveis das variáveis escolhidas para serem estudadas. Sendo os pontos fatoriais os valores de máximo e mínimo escolhidos para cada fator, os pontos axiais são os valores extremos para cada fator ($\alpha = \sqrt[4]{2^k}$, sendo k o número de fatores), e o ponto central é a média dos valores máximo e mínimo (Teófilo & Ferreira, 2006). Esses pontos e os valores para α podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz de Planejamento Composto Central com três variáveis. Os valores de X representam a posição na qual os valores das variáveis escolhidas para o estudo são utilizadas. Os valores iguais a -1,68179 e 1,68179 representam os extremos.

Ensaio	X1	X2	X3	
1	-1	-1	-1	
2	-1	-1	1	
3	-1	1	-1	
4	-1	1	1	Planejamento fatorial
5	1	-1	-1	
6	1	-1	1	
7	1	1	-1	
8	1	1	1	
9	-1,68179	0	0	
10	1,68179	0	0	Pontos axiais
11	0	-1,68179	0	
12	0	1,68179	0	
13	0	0	-1,68179	
14	0	0	1,68179	
15	0	0	0	Ponto central

Para a escolha das variáveis e dos níveis das variáveis que serão utilizadas no PCC, pode ser feita uma revisão na literatura ou até mesmo utilização de conhecimento prévio a respeito do processo que se deseja otimizar. A partir da escolha das variáveis e dos valores que essas

podem assumir, isso é, os níveis delas, é possível obter as condições nas quais devem ser conduzidos os experimentos para que seja possível adequar um modelo matemático.

Em relação à printabilidade, há vários aspectos que devem ser considerados para a caracterização da biotinta, e nesse sentido as configurações e parâmetros podem ser adaptados conforme cada aplicação final. Dessa forma, estabelecer o modelo matemático pode ser útil para avaliar as possibilidades de modulação de comportamento da biotinta conforme a aplicação pretendida. Além disso, através da MSR é possível avaliar a influência das variáveis estudadas no processo de bioimpressão 3D.

2. Material e Métodos

2.1. Lista de reagentes

- Água destilada - tipo III (Gehaka, Brasil);
- Água ultrapura - tipo I (Gehaka, Brasil);
- Alginato de sódio (CRQ, Brasil);
- Gelatina em pó (Vetec, Brasil).

2.2. Lista de materiais

- Agulhas hipodérmicas descartáveis (Descarpack, Brasil);
- Agulhas hipodérmicas sem bisel de 15G, 18G, 20G, 22G e 24G;
- Barcas para pesagem;
- Barras magnéticas;
- Bastões de vidro;
- Canetas permanentes coloridas (Pilot, Japão);
- Espátulas tipo canaletas e colher (Laborglas, Brasil);
- Filme plástico de uso laboratorial (Parafilm M[®], American National 26 Can, EUA);
- Frascos de vidro tipo Béquer com capacidade para 100, 250 e 500 mL (Qualividros, Brasil);
- Luvas para procedimento não cirúrgico (Super Max, Malásia);
- Papel alumínio (Wyda pratic, Brasil);
- Pastas “L” Delloplast (Dello, Brasil);
- Seringas Luer Lock com capacidade volumétrica de 5 e 60 mL (Rymco, Brasil).

2.3. Lista de equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (LUCA-01/09-E, Lucadema, Brasil);
- Agitador magnético com aquecimento (Q261, Quimis, Brasil);
- Agitador magnético (Q261, Quimis, Brasil);
- Ar-condicionado (Carrier, EUA);
- Balança analítica (Ax200, Shimadzu, Japão);
- Banho de ultrassom (Q335D, Quimis, Brasil)(1);
- Banho de ultrassom com aquecimento (Cristófoli, Brasil)(2);
- Smartphone S7 (Samsung);
- Sistema para ultrapurificação de água (Gehaka, Brasil);
- Timer digital (Cronobio);
- 4 Bioimpressoras de 3 fabricantes diferentes (mantidas com identificação restrita em função do foco não ser relacionado à comparação direta entre modelos e fabricantes).

2.4. Metodologia de Superfície de Resposta

2.4.1. Escolha do biomaterial para testes utilizando a MSR

A escolha do biomaterial a ser testado quanto à printabilidade foi realizada com auxílio do buscador Google Acadêmico, em julho de 2021. No campo de pesquisa dessa ferramenta, os seguintes termos foram utilizados: “*alginate*”, “*gelatin*” e “*bioink*”. Todos os artigos que apresentavam “*gelatin*” e “*alginate*” no título, juntamente com o termo “*bioink*” ou “*hydrogel*” quando empregado em um contexto de bioimpressão 3D foram considerados, totalizando 26 artigos. Artigos que apresentavam os termos indicados, mas se relacionavam a modificação na estrutura dos polímeros, como é o caso da “*gelatina metacryloyl*” e do “*alginate dialdehyde*”, foram excluídos, resultando em 23 artigos, os quais foram considerados (Tabela 7). As concentrações de alginato de sódio e gelatina utilizadas em cada um dos trabalhos foram tabuladas, plotadas e o valor médio foi escolhido para o teste de printabilidade.

2.4.2. Produção do biomaterial

Conforme a concentração obtida com auxílio da ferramenta de busca Google Acadêmico, o hidrogel foi produzido com a contração de 11% gelatina e 4% alginato de sódio (p/v). Água ultrapura (tipo I) foi aquecida em um béquer no agitador magnético com aquecimento até atingir a temperatura próxima a 55°C, momento no qual foi acionada a agitação

do equipamento e os reagentes pesados previamente em balança analítica foram adicionados à água até completa dissolução. Durante todo o processo de manufatura do hidrogel, papel alumínio foi utilizado para cobrir a abertura do béquer. Posteriormente, o biomaterial foi colocado em banho de ultrassom (1) durante 1,5 h. Em seguida, cada lote do hidrogel foi vertido em seringas de 60 mL e mantido à temperatura ambiente por aproximadamente 24 h.

Para utilização nas bioimpressoras, cada seringa carregada com o hidrogel foi aquecida em banho maria a uma temperatura próxima de 50°C e submetida a mais um ciclo de 30 min no banho de ultrassom (2). Finalmente, seringas luer lock de 5 mL foram carregadas com esse hidrogel e mantidas no banho maria na mesma temperatura até seu uso nas bioimpressoras.

2.4.3. Planejamento do Composto Central

As variáveis consideradas foram escolhidas com base em uma busca na literatura voltada para estudos desenvolvidos na área de bioimpressão 3D por extrusão e nos parâmetros que poderiam ser manipulados dentro do *software* Slic3r: diâmetro da agulha, *extrusion multiplier* e velocidade de impressão.

As Tabela 2 e Tabela 3 mostram os valores utilizados no *software* Chemoface (Nunes *et al*, 2012; versão 1.64), no modo *Experimental Design*, *Design type: Central Composite* para gerar as condições experimentais.

Tabela 2. Valores das variáveis (fatores) utilizados no Planejamento do Composto Central no *software* Chemoface para Bioimpressora 1.

Fatores	-1	1
Diâmetro da agulha (G)	17,62	22,38
<i>Extrusion Multiplier</i>	0,0586	0,2014
Velocidade da impressão (mm/s)	2,823	8,177

Tabela 3. Valores das variáveis (fatores) utilizados no Planejamento do Composto Central no *software* Chemoface para Bioimpressora 2, 3 e 4.

Fatores	-1	1
Diâmetro da agulha (G)	17,62	22,38
<i>Extrusion Multiplier</i>	0,00586	0,02014
Velocidade da impressão (mm/s)	2,823	8,177

Utilizando o PCC com os valores estabelecidos, foram geradas 15 condições experimentais distintas, sendo que o experimento foi realizado com três repetições na condição central, resultando em 17 ensaios no total, como pode ser visto na Tabela 4. Os valores testados de diâmetro da agulha foram arredondados para aqueles com o diâmetro mais próximo e de velocidade para o número inteiro mais próximo, exceto para a condição 13.

Tabela 4. Valores para os ensaios segundo o PCC, utilizando como variáveis o diâmetro da agulha, o *extrusion multiplier*, e a velocidade. Os valores entre parênteses nas colunas de Diâmetro da agulha e Velocidade representam os tamanhos de agulha e velocidades que foram efetivamente utilizados para cada condição.

Ensaio (Condições)	Diâmetro da agulha (G)	<i>Extrusion Multiplier</i> (Bioimpressora 1)	<i>Extrusion Multiplier</i> (Bioimpressoras 2, 3 e 4)	Velocidade (mm/s)
1	17,62 (18G)	0,0586	0,00586	2,823 (3)
2	17,62 (18G)	0,0586	0,00586	8,177 (8)
3	17,62 (18G)	0,2014	0,02014	2,823 (3)
4	17,62 (18G)	0,2014	0,02014	8,177 (8)
5	22,38 (22G)	0,0586	0,00586	2,823 (3)
6	22,38 (22G)	0,0586	0,00586	8,177 (8)
7	22,38 (22G)	0,2014	0,02014	2,823 (3)
8	22,38 (22G)	0,2014	0,02014	8,177 (8)
9	15,99(15G)	0,1300	0,01300	5,500 (5,5)
10	24,00 (24G)	0,1300	0,01300	5,500 (5,5)
11	20,00 (20G)	0,0099	0,00099	5,500 (5,5)
12	20,00 (20G)	0,2501	0,02501	5,500 (5,5)
13	20,00 (20G)	0,1300	0,01300	0,998 (1)
14	20,00 (20G)	0,1300	0,01300	10,000 (10)
15	20,00 (20G)	0,1300	0,01300	5,500 (5,5)
16	20,00 (20G)	0,1300	0,01300	5,500 (5,5)
17	20,00 (20G)	0,1300	0,01300	5,500 (5,5)

2.4.4. Bioimpressão

As condições geradas pelo PCC no *software* Chemoface foram testadas, o modelo utilizado foi uma linha de 7 cm (Figura 14) e as configurações das condições foram realizadas no *software* Slic3r (Fedorov *et al*, 2012; versão 1.3.0). O Slic3r é um *software* que permite a

importação de arquivo no formato STL, a configuração de parâmetros de interesse através de uma interface de configuração separada em três tipos: *Print Settings*, *Filament Settings* e *Printer Settings* e a geração de um GCODE que pode ser utilizado em um programa que tenha o controle de bioimpressoras, nesse caso, o Pronterface. O Pronterface é um *software* livre desenvolvido inicialmente para o controle de máquinas de impressão 3D através da conexão de um cabo USB entre o computador e o equipamento. Através de uma interface simples, é possível controlar a movimentação da máquina nos eixos X, Y e Z, além de permitir o controle através da digitação de linhas de código.

A fim de configurar o *software* de fatiamento (Slic3r), para cada condição foi gerado um arquivo CONFIG, os parâmetros de configuração que não se relacionavam com o diâmetro, *extrusion multiplier* e velocidade foram mantidos fixos (Tabela 5), e aqueles que se relacionavam, além deles próprios, foram ajustadas conforme o planejamento experimental (Tabela 6).

Tabela 5. Parâmetros mantidos constantes nas configurações do Slic3r. A configuração desses parâmetros foi realizada em *Filament Settings* (Diâmetro do filamento), *Print Settings* (Saia) e *Printer Settings* (Retração) no *software* Slic3r.

Parâmetros mantidos constantes	Valor
Diâmetro do filamento	1 mm
Retração	Desativada
Saia	1 volta a 20 mm do objeto

Tabela 6. Parâmetros que foram ajustados conforme a agulha utilizada. A configuração desses parâmetros foi realizada em *Printer Settings* (Diâmetro da agulha) e *Print Settings* (Altura da camada) no *software* Slic3r.

Agulhas utilizadas	Diâmetro da agulha	Altura da camada
15G	1,60 mm	1,60 mm
18G	1,20 mm	1,20 mm
20G	0,90 mm	0,90 mm
22G	0,70 mm	0,70 mm
24G	0,55 mm	0,55 mm

O modelo utilizado para os ensaios foi uma linha com 7 cm de comprimento (Figura 14) que foi fatiado no Slicer conforme configurações estabelecidas e carregado no Pronterface

(Kliment Yanev, versão 18nov2017) para o envio às impressoras. A bioimpressão foi realizada em uma superfície plástica azul (pasta “L” Delloplast) para facilitar a visualização, cortada posteriormente com tesoura de papel nos tamanhos adequados para cada mesa da bioimpressora.

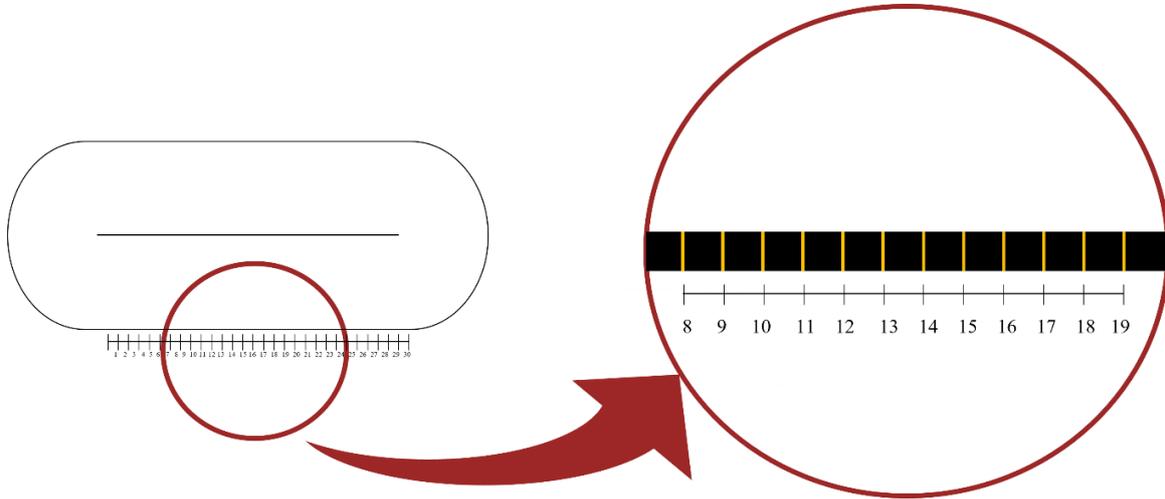


Figura 14. Representação do modelo bioimpresso. À esquerda, há a representação do modelo utilizado para extrusão, bem como uma marcação de 30 pontos nos quais foi medido a largura do filamento. À direita, um destaque de parte do modelo, ressaltando 12 posições das 30 medições realizadas (sequência de 8 a 19). Em amarelo, tem-se a medição realizada no ImageJ referente à largura do filamento extrusado.

Imediatamente após cada bioimpressão foi obtida uma fotografia, com o equipamento celular *smartphone*, que posteriormente foi utilizada para análise da largura do filamento extrusado. Cada imagem foi analisada com auxílio do *software* ImageJ (Wayne Rasband *et al*, 1997 – 2018; versão 1.53e). Para a análise nesse *software*, 30 medidas do filamento na vertical distribuídas ao longo de 6 cm foram utilizadas, sendo uma medição feita aproximadamente a cada 2 mm. Os valores de média (M), desvio padrão (DP) foram calculados no Microsoft Excel (Versão 2109 Build 16.0.14430.20224).

O valor da % de Desvio Padrão (% DP) foi calculado conforme a Equação 4

$$\%DP = \frac{DP \times 100}{M} \quad (4)$$

O valor da Diferença (D_i) e o % Diferença conforme as Equações 5 e 6, respectivamente, em que, M é a média e A é o diâmetro interno da agulha utilizada.

$$D_i = M - A \quad (5)$$

$$\%D_i = \frac{D_i \times 100}{A} \quad (6)$$

2.4.4.1. Bioimpressora 1

Para a realização da bioimpressão algumas etapas foram necessárias:

- a) Conexão da bioimpressora através do cabo USB no computador e abertura do programa Pronterface
- b) Colocação da seringa carregada com o hidrogel e com a agulha adequada conforme as configurações da bioimpressora
- c) Extrusão inicial para assegurar o fluxo de hidrogel
- d) Ajuste da altura da mesa em relação à agulha através do Pronterface
- e) Carregamento do modelo no programa Pronterface (*Load file*) no formato GCODE e início da bioimpressão.

2.4.4.2. Bioimpressora 2 e 4

Para a realização da bioimpressão algumas etapas foram necessárias:

- a) Conexão da bioimpressora através do cabo USB no computador e abertura do programa Pronterface
- b) Ajuste das configurações em relação ao OFFSET para cada agulha no Slic3r
- c) Colocação da seringa carregada com o hidrogel e com a agulha adequada conforme as configurações da bioimpressora
- d) Extrusão inicial para assegurar o fluxo de hidrogel
- e) Carregamento do modelo no programa Pronterface (*Load file*) no formato GCODE e início da bioimpressão.

2.4.4.3. Bioimpressora 3

Para a realização da bioimpressão algumas etapas foram necessárias:

- a) Conexão da bioimpressora através do cabo USB no computador e abertura do programa Pronterface
- b) Colocação da seringa carregada com o hidrogel e com a agulha adequada conforme as configurações da bioimpressora
- c) Extrusão inicial para assegurar o fluxo de hidrogel
- d) Ajuste da altura da mesa manualmente
- e) Carregamento do modelo no programa Pronterface (*Load file*) no formato GCODE e início da bioimpressão.

3. Resultados

3.1. Escolha dos polímeros para compor a biotinta

A mistura de alginato com outros polímeros é uma alternativa comumente utilizada por pesquisadores da área de bioimpressão 3D e dentre as combinações de polímeros com alginato, a gelatina é o que mais apresenta artigos científicos publicados (considerando a composição relatada no título do artigo, conforme pesquisado – Metodologia). Nessa composição, a possibilidade de diferentes formas de *crosslink* (reticulação), físico (gelatina) e/ou químico (alginato de sódio) é interessante para validar o processo de caracterização sugerido.

Na Tabela 7, estão listados os 23 artigos selecionados na revisão e levantamento de literatura. As concentrações utilizadas consideradas mais adequadas no experimento segundo os autores (quando apenas aparece um valor) e todas testadas (quando aparece mais de um valor) foram plotadas e podem ser visualizadas na Tabela 7. Analisando os dados, percebe-se que as concentrações empregadas nos estudos variam, principalmente, para a gelatina. Assim, para a gelatina, a menor concentração encontrada foi de 3% e a maior 50%, enquanto para o biopolímero alginato ocorreram variações nas concentrações entre 1% e 10%. Da mesma forma, o solvente utilizado em cada artigo variou muito entre soluções tampão, meio de cultivo e água.

Para esse trabalho, o valor inteiro da média aritmética das concentrações listadas foi considerado, sendo definidas as concentrações de 11% para a gelatina e 4% para o alginato de sódio, ambos dissolvidos em água. Para calcular a média nos artigos que foram testadas mais de uma concentração e não destacada qual foi a mais adequada, foi considerado valor médio. O uso dessa estratégia de escolha por meio do valor médio inteiro das condições apresentadas na literatura, foi possível alcançar uma concentração ainda não testada em nenhum trabalho acadêmico anteriormente publicado dentre os listados, mas coerente e que precisava ser validado para bioimpressão 3D. Estratégia semelhante pode ser empregada para virtualmente qualquer combinação de biopolímeros com potencial para indicar condições potencialmente viáveis para o desenvolvimento de biotintas inovadoras.

Com as concentrações dos dois biopolímeros definidas, apesar do valor se encontrar dentro dos intervalos já testados na literatura, por ser uma proporção nova, foi necessário testar inicialmente se essa concentração é adequada para o processo de extrusão. Para isso, essa combinação foi submetida a uma avaliação qualitativa visual e testes de extrusão manual para estabelecer se a biotinta seria passível de extrusão nas agulhas dos calibres escolhidos para o PCC.

Tabela 7. Artigos que apresentam os termos “gelatin”, “alginate” e “bioink” ou “gelatin”, “alginate” e “hydrogel” no título e que foram utilizados para a escolha das concentrações de alginato e gelatina para compor a biotinta.

	DOI	Gelatina	Alginato
1	10.1038/s41598-018-26407-3	20%	8%
2	10.1088/1758-5090/ab38ef	3%	1%
3	10.1088/1758-5090/aacdc7	4 - 8% (6%)	3 - 9% (6%)
4	10.1016/j.ijbiomac.2019.06.017	3%	1%
5	10.18063/ijb.v5i2.2.204	3%	3%
6	10.1088/1758-5090/ab98e4	7,5%	3,75%
7	10.3390/ijms19103129	3%	2%
8	10.1016/j.ijbiomac.2019.12.174	4%	2 - 5% (3,5%)
9	10.1016/j.msec.2021.112193	3 - 5% (4%)	1 - 2% (1,5%)
10	10.1007/s10856-018-6205-7	3,25%	3,25%
11	10.1088/1758-5090/ab0692	5%	4%
12	10.1016/j.bprint.2020.e00094	8%	2%
13	10.1007/s00289-020-03421-y	50%	10%
14	10.1038/s41598-019-55034-9	4%	3,25 - 3,5% (3,375%)
15	10.1088/1758-5090/ab3a5c	5, 7, 9% (7%)	1, 3, 5% (3%)
16	10.1007/s10856-020-06440-3	10%	1%
17	10.2217/3dp-2020-0026	15%	1%
18	10.3390/ma12172669	3 - 4% (3,5%)	5%
19	10.11591/eei.v9i4.2392	50%	10%
20	10.1088/1758-5090/abdb87	7%	1%
21	10.3791/57826	7%	3%
22	10.1155/2020/3863428	10, 20% (15%)	1,25%
23	10.1016/j.jmbbm.2017.12.018	8%	7%

Uma inspeção visual de cada biotinta é necessária inicialmente, já que composições com baixa viscosidade ou alta viscosidade e/ou presença de grumos não são características adequadas para o processo de bioimpressão 3D por extrusão (Paxton *et al*, 2017; Habib *et al*, 2018, O’Connel *et al*, 2020). Para a execução desse procedimento de caracterização, a biotinta foi colocada em seringas e foi realizada a verificação de como ocorreu a extrusão vertical, nesse caso realizado na Bioimpressora 1. A formação de uma gota indicaria que essa formulação estaria com a viscosidade abaixo do que seria necessário para manutenção da forma, ou seja, abaixo da gelatinização adequada. Por outro lado, caso a extrusão resultasse na formação de um filamento, mas esse não estivesse uniforme e/ou apresenta aparência de grumos, essa biotinta estaria com a gelatinização acima da que seria adequada para o processo. E, caso ocorresse a presença de grumos, poderia ser resultante de uma dificuldade de homogeneização decorrente possivelmente da composição em si da biotinta, resultando em heterogeneidade e/ou presença de bolhas indesejáveis. Por fim, é possível classificar uma biotinta como adequada,

considerando apenas a extrusão manual, quando há a formação de um filamento visualmente uniforme e longo quando submetido a uma pressão de extrusão baixa.

Para fins de teste, a seringa com a biotinta foi posicionada na bioimpressora e uma extrusão de 5 mm no eixo Z foi acionada para essa avaliação. Essa extrusão mostrou a formação de um filamento e por isso foi utilizado nos testes seguintes para determinação da condição ideal (Figura 15).

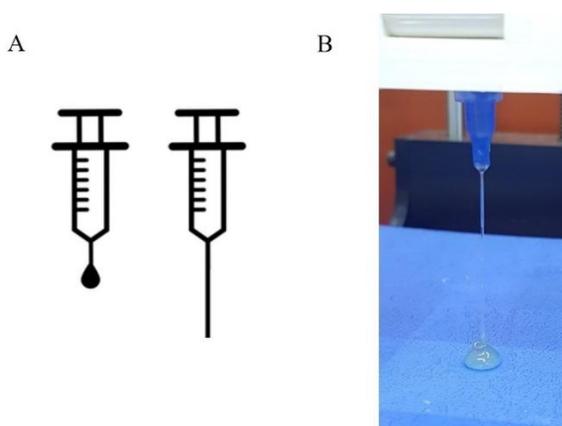


Figura 15. Primeira avaliação de caracterização qualitativa da printabilidade de uma biotinta. **A)** Esquema de dois comportamentos possíveis da biotinta: seringa do lado esquerdo representa uma biotinta com viscosidade muito baixa formando uma gota, sendo inadequada para a bioimpressão 3D; e do lado direito, uma seringa com biotinta formando um filamento quando extrusada, sendo esta adequada para extrusão. **B)** Extrusão de uma biotinta composta por gelatina 11% e alginato 4% através de uma agulha de 22G utilizando a Bioimpressora 1.

3.2. Bioimpressão de biotinta composta por gelatina e alginato

3.2.1. Bioimpressora 1

A impressão conduzida na Bioimpressora 1 em cada ensaio pode ser observada na Figura 16. Os ensaios representam as condições geradas pelo PCC a partir da combinação das três variáveis escolhidas para o estudo. Observa-se visualmente diferenças entre cada ensaio conduzido, alguns filamentos extrusados se apresentam mais largos (mais “grossos”) do que outros. Por exemplo, comparando condições em que a única diferença é o *extrusion multiplier*, como as condições dos ensaios 1 (0,0586) e 3 (0,2014) (Tabela 4), observa-se que um menor valor dessa variável resultou em um filamento mais “fino”. Ou seja, para mesmos diâmetro de agulha e velocidade, mas com diferentes valores de *extrusion multiplier*, foram obtidos filamentos de larguras distintas. Valores menores dessa variável resultaram em filamentos mais “finos” ou em não extrusão, como os ensaios 6 e 11 (*extrusion multiplier* igual a 0,0586 e 0,00992), e valores maiores resultaram em filamentos mais “grossos”. Qualitativamente, infere-se que as condições testadas resultaram em filamentos diferentes entre si.

Bioimpressora 1

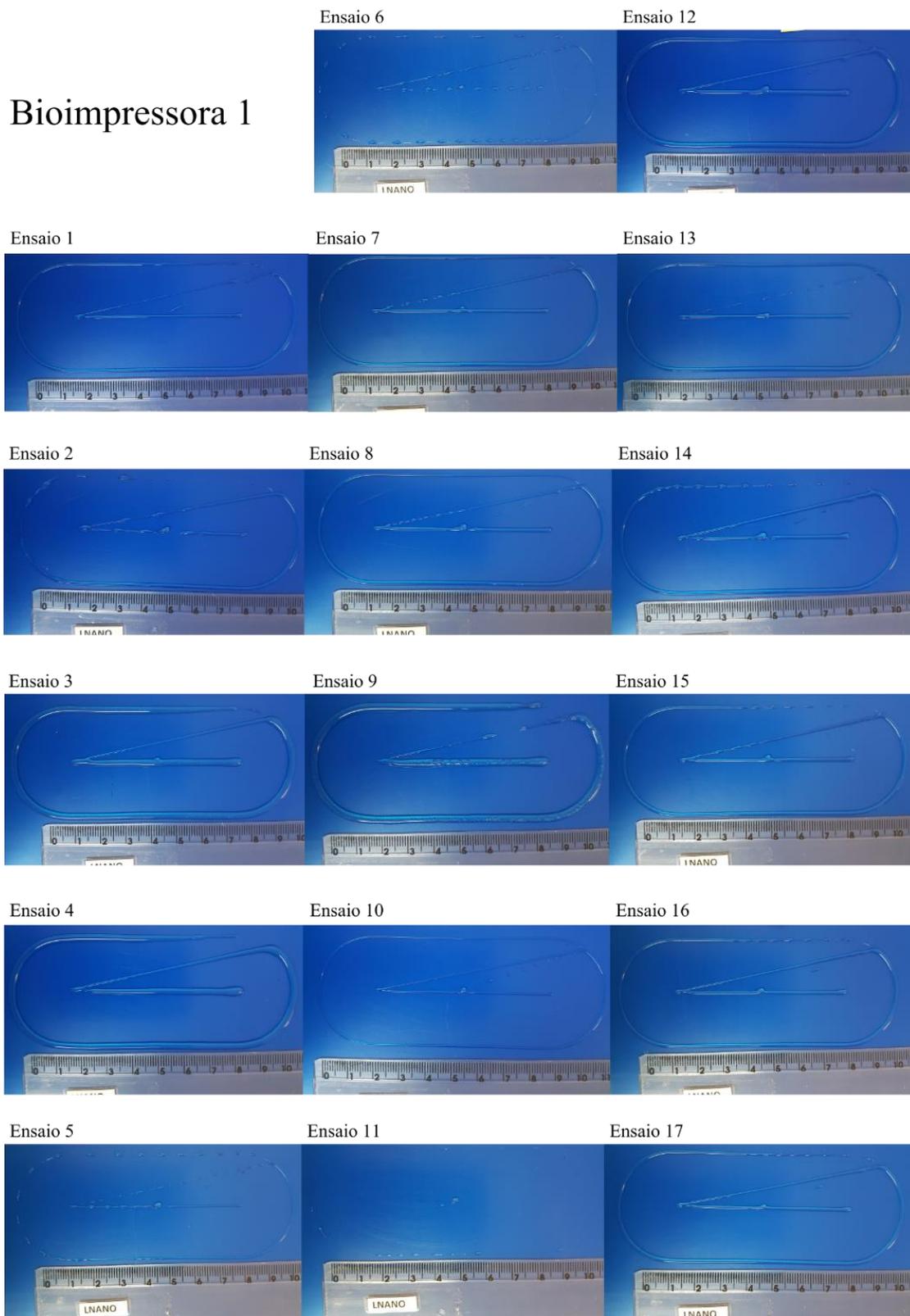


Figura 16. Bateria de 17 ensaios executados na Bioimpressora 1, de acordo com as condições estabelecidas pelo PCC. Os ensaios estão dispostos no sentido de cima para baixo e da esquerda para a direita.

O percentual da diferença entre a média aritmética de 30 pontos medidos (Anexo II) e o diâmetro da agulha foram calculados para cada ensaio (Tabela 8). Para a Bioimpressora 1, é possível perceber que o menor percentual foi obtido no ensaio 5 (7,22%) e o maior no ensaio 12 (176,51%). Em dois ensaios (6 e 11), a combinação de fatores resultou na não extrusão do material, e por isso não foi possível fazer medições. O percentual do desvio padrão em relação ao valor da média foi utilizado como forma de verificar se o desvio das medições representava um valor abaixo de 10%, observado em todas as condições testadas.

Tabela 8. Medições da primeira bateria em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 1. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.

Ensaio	Média (mm)	Desvio Padrão (mm)	% Desvio Padrão	Diferença entre real e esperado (mm)	% Diferença
1	1,52	0,04	2,61	0,33	27,19
2	1,47	0,06	3,76	0,27	22,69
3	3,08	0,10	3,15	1,88	156,88
4	3,16	0,09	2,81	1,96	162,97
5	0,75	0,07	9,68	0,05	7,22
6	-	-	-	-	-
7	1,65	0,07	4,41	0,95	135,44
8	1,71	0,05	2,78	1,01	143,64
9	3,33	0,11	3,33	1,73	108,30
10	0,90	0,07	7,72	0,35	64,44
11	-	-	-	-	-
12	2,49	0,05	1,88	1,59	176,52
13	1,78	0,15	8,46	0,89	98,31
14	1,73	0,06	3,43	0,83	92,21
15	1,72	0,06	3,29	0,86	90,63
16	1,72	0,06	3,29	0,82	90,63
17	1,74	0,05	2,94	0,85	93,60

Considerando cada valor do percentual da diferença, esses dados foram importados no *software* Chemoface para geração de um modelo matemático. Diante desses dados, é possível perceber que considerando as variáveis estudadas e o resultado medido, o diâmetro da agulha e o *extrusion multiplier*, que corresponde à pressão de extrusão no *software* utilizado, são os fatores que apresentam impacto (efeito) na largura do filamento extrusado.

A Tabela 9 mostra os coeficientes do modelo e a significância entre as variáveis estudadas. Já a Tabela 10 sumariza os dados em relação à validação estatística, realizada por meio da análise de variância e o ajuste do modelo em relação à diferença percentual do tamanho do filamento extrusado e o diâmetro da agulha.

Tabela 9. Dados obtidos no *software* Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 1 com os dados referentes apenas a uma bateria de testes, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à *extrusion multiplier* e X3 refere-se à velocidade de impressão.

	b	erro	t	p	significância
b0(X=1)	72,58011001	4,128689193	17,579456	0,003220234	Sim
X1	-4,836256545	0,195228243	-24,77232021	0,001625574	Sim
X2	860,0980099	6,507608093	132,1680712	5,72E-05	Sim
X3	-0,21044756	0,173568628	-1,212474638	0,349118397	Não

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados referentes a apenas a uma bateria de testes com a Bioimpressora 1.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	P
Regressão	53317,9273	3	17772,64243	177,4333622	8,53E-11
Resíduos	1302,147176	13	100,1651674		
Falta de ajuste	1296,250329	11	117,840939	39,9674385	0,024655
Erro puro	5,896847207	2	2,948423603		
Total	54620,07448	16			
R ²	0,976159916				
R ² ajustado	0,970658358				

A partir da análise estatística foi possível perceber que apesar do modelo apresentar uma regressão significativa, o teste de falta de ajuste também foi significativo, demonstrando que o

modelo não está bem ajustado. Diante disso uma bateria adicional com os mesmos 17 ensaios foi conduzida a fim de verificar se com a expansão dos dados seria possível alcançar um ajuste adequado para o modelo (Tabela 11).

Tabela 11. Medições da segunda bateria de testes em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 1. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.

Ensaio	Média (mm)	Desvio Padrão (mm)	% Desvio Padrão	Diferença entre real e esperado (mm)	% Diferença
1	1,58	0,07	4,72	0,38	31,74
2	1,59	0,06	3,73	0,39	32,39
3	3,02	0,07	2,38	1,81	151,46
4	3,20	0,09	2,81	2,01	167,26
5	0,86	0,06	7,32	0,16	23,54
6	-	-	-	-	-
7	1,70	0,08	5,10	1,00	143,23
8	1,74	0,07	4,20	1,04	148,95
9	3,50	0,11	3,23	1,90	118,68
10	1,06	0,04	3,73	0,51	93,09
11				-	-
12	2,40	0,09	3,78	1,50	166,22
13	1,77	0,10	5,78	0,87	96,53
14	1,76	0,10	5,57	0,86	95,21
15	1,68	0,09	5,12	0,78	87,11
16	1,74	0,06	3,54	0,84	92,96
17	1,85	0,07	3,55	0,95	105,03

A partir dos dados das Tabela 12 e Tabela 13, foi possível perceber que com mais dados, o modelo linear mostrou-se estatisticamente uma falta de ajuste não relevante ($p > 0,05$), consequentemente mostrando que o modelo se encontra ajustado em relação aos dados. Apesar de ajustado, é possível perceber que em relação ao modelo gerado com os dados de apenas uma

bateria de ensaios, o valor de R^2 reduziu consideravelmente. Esses dados demonstram uma dificuldade de repetibilidade entre os dados em relação ao processo de printabilidade para o biomaterial testado.

Tabela 12. Dados obtidos no *software* Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 1 com os dados referentes a duas baterias de testes, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à *extrusion multiplier* e X3 refere-se à velocidade de impressão 3D.

	b	erro	t	p	significância
b0(X=1)	79,97914	36,68558	2,180125	0,035867	Sim
X1	-5,85962	1,734706	-3,37788	0,001766	Sim
X2	928,5277	57,82353	16,05796	0	Sim
X3	-0,26956	1,542249	-0,17478	0,862231	Não

Tabela 13. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados referentes às duas baterias de testes com a Bioimpressora 1.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	P
Regressão	188066,6	3	62688,85	121,0269	0
Resíduos	24344,79	47	517,9743		
Falta de ajuste	7584,224	11	689,4749	1,480922	0,18154
Erro puro	16760,57	36	465,5714		
Total	212411,4	50			
R^2	0,885388				
R^2 ajustado	0,878073				

Em relação ao gráfico de medição \times predição (Figura 17), uma reta representa bem os dados obtidos experimentalmente. Na Figura 18 há a representação da superfície 3D, com duas das três variáveis estudadas (Diâmetro da Agulha e *Extrusion Multiplier*), consideradas significantes no processo, bem como a localização dos dados obtidos experimentalmente na superfície.

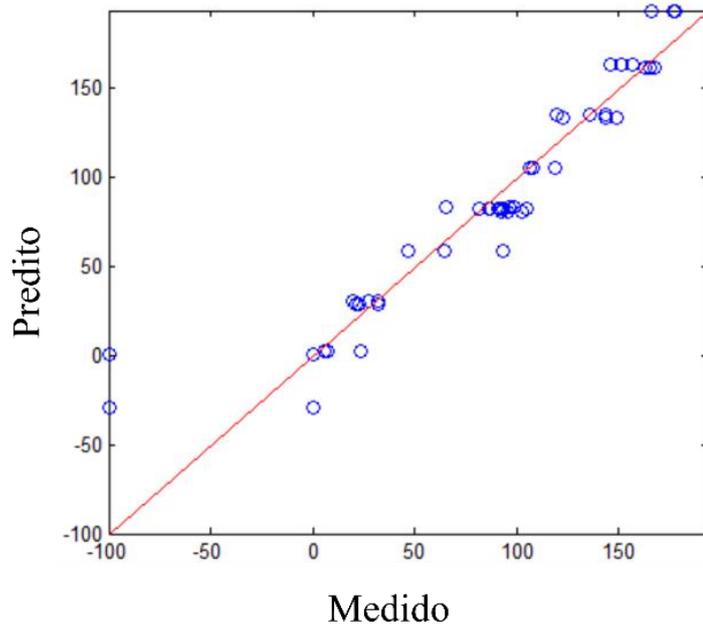


Figura 17. Gráfico de medição × predição gerados pelo *software* Chemoface em relação ao modelo linear estabelecido pela Bioimpressora 1 com os dados de duas baterias de testes.

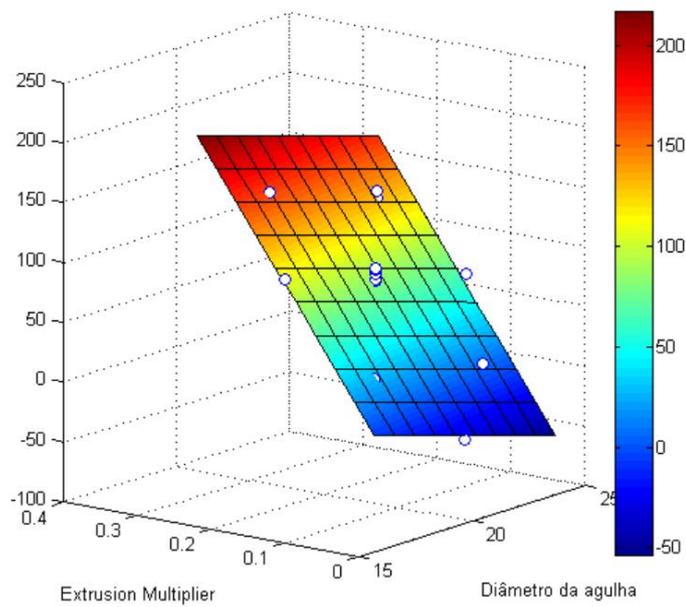


Figura 18. Gráfico do modelo linear obtido no *software* Chemoface com os dados relativos à Bioimpressora 1. Os eixos representam o diâmetro da agulha, *extrusion multiplier* e o percentual de diferença entre o filamento extrusado e a agulha empregada (medição considerada como resultado no modelo). Os círculos representam os dados obtidos experimentalmente nos ensaios conduzidos.

3.2.2. Bioimpressora 2

A impressão conduzida na Bioimpressora 2 em cada ensaio pode ser observada na Figura 19. Visualmente, percebe-se diferenças expressivas entre cada condição de ensaio. Assim, como para a Bioimpressora 1, cada condição foi analisada quanto à largura do biomaterial depositado na superfície plástica a partir de uma fotografia.



Figura 19. Ensaios executados na Bioimpressora 2, de acordo com as condições estabelecidas pelo PCC. Os ensaios estão dispostos no sentido de cima para baixo e da esquerda para a direita.

O percentual da diferença entre a média aritmética de 30 pontos (Anexo II) e o diâmetro da agulha foram calculados para cada ensaio (Tabela 14). Para a Bioimpressora 2, é possível perceber que o menor percentual foi obtido no ensaio 2 (56,51%) e o maior no ensaio 12 (238,00%). Em três ensaios (5, 6 e 11), a combinação de fatores resultou na não extrusão do material, e por isso não foi possível realizar medições. O percentual do desvio padrão em relação ao valor da média foi utilizado como forma de verificar se o desvio das medições representava um valor baixo, sendo o mais alto, de apenas 6,09%, obtido na condição 14.

Tabela 14. Medições em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 2. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.

Ensaio	Média (mm)	Desvio Padrão (mm)	% Desvio Padrão	Diferença entre real e esperado (mm)	% Diferença
1	1,91	0,05	2,83	0,71	59,19
2	1,88	0,05	2,77	0,68	56,51
3	3,72	0,15	3,89	2,52	209,79
4	3,58	0,11	3,14	2,38	198,35
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	1,92	0,07	3,46	1,22	174,35
8	1,86	0,03	1,41	1,16	166,33
9	4,06	0,19	4,77	2,46	153,73
10	1,02	0,04	4,18	0,47	85,52
11	-	-	-	-	-
12	3,04	0,11	3,49	2,14	238,01
13	1,97	0,05	2,64	1,07	119,42
14	1,88	0,11	6,09	0,98	108,71
15	2,15	0,10	4,58	1,25	139,38
16	2,02	0,10	4,77	1,12	124,43
17	2,14	0,08	3,74	1,24	137,60

A partir da análise estatística foi possível perceber que apesar do modelo apresentar uma regressão significativa, o teste de falta de ajuste não é significativo ($p > 0,05$), demonstrando que o modelo está bem ajustado (Tabelas 15 e 16).

Tabela 15. Dados obtidos no *software* Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 2, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à *extrusion multiplier* e X3 refere-se à velocidade de impressão.

	b	erro	t	p	significância
b0(X=1)	167,5101	19,64215	8,528097	0,013473	Sim
X1	-9,16422	0,928794	-9,86679	0,010116	Sim
X2	10597,88	309,598	34,23111	0,000852	Sim
X3	-1,09792	0,825749	-1,3296	0,315024	Não

Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados da Bioimpressora 2.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	P
Regressão	84810,86	3	28270,29	1,65E+02	1,35E-10
Resíduos	2226,595	13	171,2765		
Falta de ajuste	2093,128	11	190,2843	2,851409	0,288213
Erro puro	133,4669	2	66,73344		
Total	87037,46	16			
R ²	0,974418				
R ² ajustado	0,968514				

3.2.3. Bioimpressora 3

A impressão conduzida na Bioimpressora 3 em cada ensaio pode ser observada na Figura 20. Há diferenças entre cada condição de ensaio. Novamente, cada condição foi analisada quanto à largura do biomaterial depositado na superfície plástica.



Figura 20. Ensaios executados na Bioimpressora 3, de acordo com as condições estabelecidas pelo PCC. Os ensaios estão dispostos no sentido de cima para baixo e da esquerda para a direita.

O percentual da diferença entre a média aritmética de 30 pontos (Anexo II) e o diâmetro da agulha foram calculados para cada ensaio (Tabela 17). Para a Bioimpressora 3, é possível perceber que o menor percentual da diferença foi obtido no ensaio 1 (47,32%) e o maior no ensaio 12 (231,79%). Em dois ensaios (6 e 11), a combinação de fatores resultou na não extrusão do material, e por isso não foi possível realizar medições. O percentual do desvio padrão foi utilizado como forma de verificar se o desvio das medições era um valor baixo, sendo o mais alto próximo de 6%, observado na condição 10.

Tabela 17. Medições em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 3. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.

Ensaio	Média (mm)	Desvio Padrão (mm)	% Desvio Padrão	Diferença entre real e esperado (mm)	% Diferença
1	1,77	0,07	3,85	0,57	47,32
2	1,84	0,05	2,49	0,64	53,04
3	3,59	0,10	2,85	2,39	199,29
4	3,66	0,14	3,77	2,46	204,99
5	1,07	0,04	4,01	0,37	52,64
6	-	-	-	-	-
7	1,98	0,04	2,24	1,28	183,38
8	2,08	0,07	3,21	1,38	196,50
9	3,89	0,12	3,02	2,29	143,18
10	1,13	0,07	5,86	0,59	106,40
11	-	-	-	-	-
12	2,99	0,08	2,70	2,09	231,79
13	1,90	0,08	4,26	0,99	110,25
14	2,09	0,05	2,55	1,19	131,68
15	2,12	0,10	4,76	1,22	135,44
16	2,11	0,07	3,29	1,21	134,30
17	2,07	0,07	3,48	1,17	130,29

A Tabela 18 mostra os coeficientes do modelo e a significância entre as variáveis estudadas. Já a Tabela 19 sumariza os dados em relação à validação estatística, realizada por meio da análise de variância e o ajuste do modelo em relação à diferença percentual do tamanho do filamento extrusado e o diâmetro da agulha.

Tabela 18. Dados obtidos no *software* Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 3, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à *extrusion multiplier* e X3 refere-se à velocidade de impressão.

	b	erro	t	p	significância
b0(X=1)	121,2052	0,656624	184,5885	2,93E-05	Sim
X1	-9,80975	0,732598	-13,3904	0,005531	Sim
X2	74,76053	0,732598	102,0485	9,60E-05	Sim
X3	0,581427	0,732598	0,793652	0,510602	Não

Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados da Bioimpressora 3.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	P
Regressão	77648,85	3	25882,95	119,7216	1,02E-09
Resíduos	2810,506	13	216,1928		
Falta de ajuste	2795,847	11	254,1679	34,67679	0,028353
Erro puro	14,65925	2	7,329626		
Total	80459,36	16			
R ²	0,965069				
R ² ajustado	0,957008				

A partir da análise estatística foi possível perceber que apesar do modelo apresentar uma regressão significativa, o teste de falta de ajuste é significativo ($p < 0,05$), demonstrando que o modelo não está bem ajustado.

Outros modelos, quadrático, puro quadrático e de interação também foram testados, entretanto, os resultados foram semelhantes e em todos os casos a falta de ajuste foi significativa, demonstrando uma falta de ajuste do modelo em relação aos dados obtidos.

3.2.4. Bioimpressora 4

A impressão conduzida na Bioimpressora 4 em cada ensaio pode ser observada na Figura 21. É possível perceber visualmente diferenças entre cada condição de ensaio. Assim como para as Bioimpressoras 1, 2 e 3, cada condição foi analisada quanto à largura do biomaterial depositado na superfície plástica.

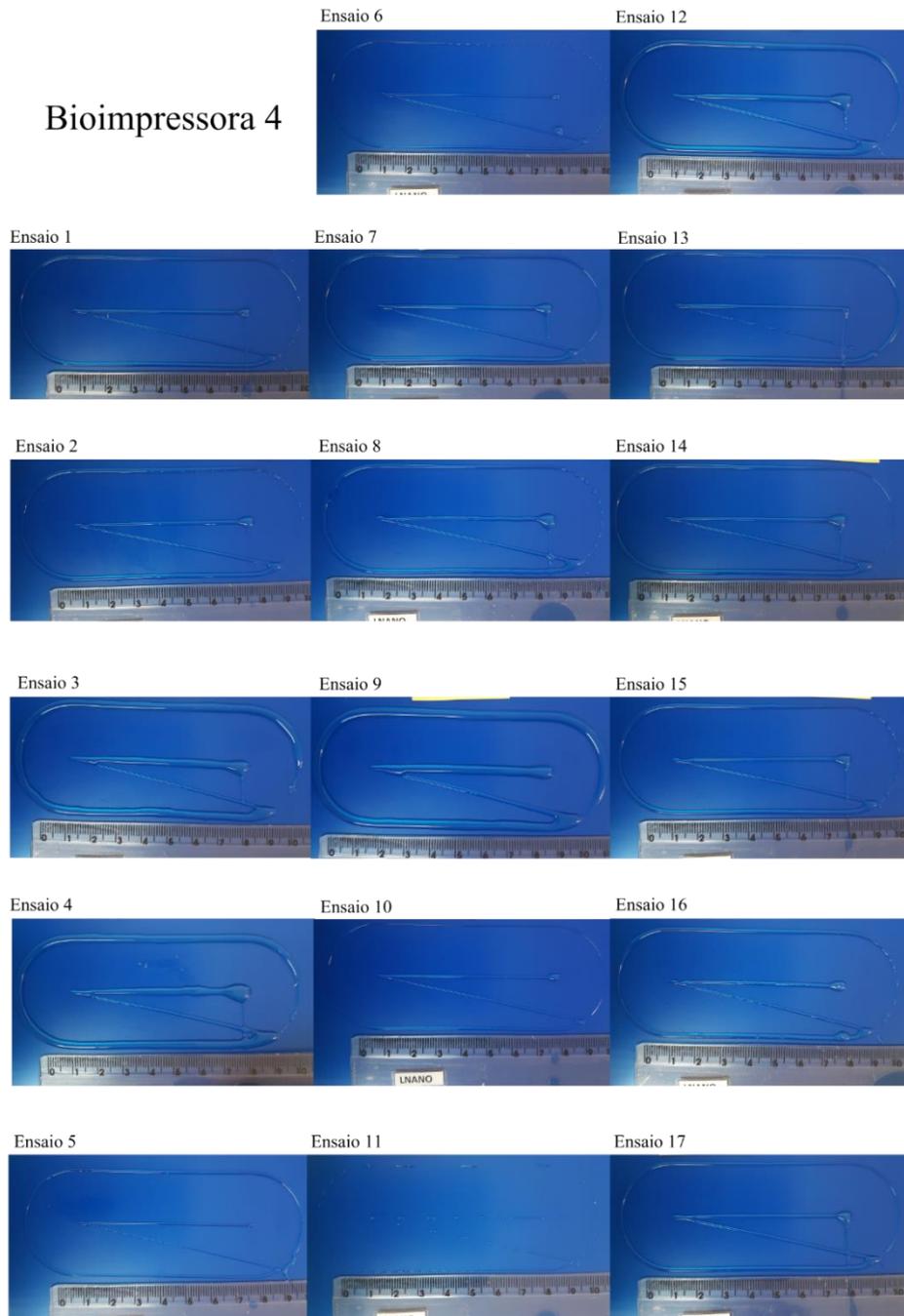


Figura 21. Ensaios executados na Bioimpressora 4, de acordo com as condições estabelecidas pelo PCC. Os ensaios estão dispostos no sentido de cima para baixo e da esquerda para a direita.

O percentual da diferença entre a média de 30 pontos (Anexo II) e o diâmetro da agulha para cada ensaio foram calculados para cada ensaio (Tabela 20). Para a Bioimpressora 4, é possível perceber que o menor percentual foi obtido no ensaio 6 (29,78%) e o maior no ensaio 8 (190,71%). Em um ensaio (11), a combinação de fatores resultou na não extrusão do material, e por isso não foi possível realizar medições. O percentual do desvio padrão foi utilizado como forma de verificar se o desvio das medições era um valor baixo, sendo o mais alto, cerca de 6%, observado na condição 6.

Tabela 20. Medições em relação ao filamento bioimpresso em cada ensaio gerado pelo PCC e testado na Bioimpressora 4. Os valores foram arredondados para manter duas casas decimais.

Ensaio	Média (mm)	Desvio Padrão (mm)	% Desvio Padrão	Diferença entre real e esperado (mm)	% Diferença
1	1,72	0,05	3,10	0,52	43,14
2	1,95	0,08	3,89	0,75	62,89
3	3,49	0,20	5,77	2,29	191,16
4	3,49	0,11	3,27	2,29	190,88
5	0,98	0,06	5,67	0,28	39,72
6	0,91	0,05	5,99	0,21	29,78
7	1,95	0,06	2,90	1,25	178,74
8	2,04	0,09	4,30	1,33	190,71
9	4,09	0,18	4,29	2,49	155,65
10	1,19	0,06	5,13	0,64	116,19
11	-	-	-	-	-
12	2,48	0,07	2,96	1,58	175,48
13	1,82	0,05	2,64	0,92	101,86
14	2,07	0,05	2,24	1,17	129,55
15	2,07	0,06	2,93	1,17	130,43
16	2,11	0,07	3,10	1,21	134,40
17	2,13	0,09	4,39	1,23	136,13

A Tabela 21 mostra os coeficientes do modelo e a significância entre as variáveis estudadas. Já a Tabela 22 sumariza os dados em relação à validação estatística, realizada por meio da análise de variância e o ajuste do modelo em relação à diferença percentual do tamanho do filamento extrusado e o diâmetro da agulha.

Tabela 21. dados obtidos no *software* Chemoface com os coeficientes do modelo linear para Bioimpressora 4, sendo que X1 refere-se ao diâmetro da agulha, X2 refere-se à *extrusion multiplier* e X3 refere-se à velocidade de impressão.

	b	erro	t	p	significância
b0(X=1)	62,73039	7,020959	8,934733	0,012296	Sim
X1	-3,55293	0,331991	-10,7019	0,008619	Sim
X2	893,3279	11,06638	80,72449	0,000153	Sim
X3	1,861595	0,295159	6,3071	0,024229	Sim

Tabela 22. Análise de variância (ANOVA) em relação ao modelo gerado com os dados da Bioimpressora 4.

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	P
Regressão	56876,54	3	18958,85	48,23005	2,64E-07
Resíduos	5110,196	13	393,092		
Falta de ajuste	5093,144	11	463,013	54,30438	0,018216
Erro puro	17,05251	2	8,526255		
Total	61986,73	16			
R ²	0,91756				
R ² ajustado	0,898535				

A partir da análise estatística foi possível perceber que apesar do modelo apresentar uma regressão significativa, o teste de falta de ajuste também é significativo ($p < 0,05$), demonstrando que o modelo não está bem ajustado.

Outros modelos, quadrático, puro quadrático e de interação também foram testados, entretanto, os resultados foram semelhantes e em todos os casos a falta de ajuste foi significativa, demonstrando uma falta de ajuste do modelo em relação aos dados

4. Discussão

A ideia da printabilidade serve para avaliar a diferença que se tem de um modelo ideal hipotético de uma bioestrutura modelada (idealização do conceito) em relação à estrutura final que realmente é obtida após a impressão (limitado pelas tecnologias) (Naghieh & Chen, 2021). As diferenças existentes entre essas estruturas deve ser reduzido de forma que seja possível produzir estruturas o mais próximo do que realmente se deseja a partir de um modelo gerado. Para isso, todo o processo de bioimpressão deve ser otimizado de forma a se obter o controle das variáveis deste processo e, conseqüentemente, do resultado final: o constructo.

Assim, três fatores principais da printabilidade precisam ser considerados, dois dos quais aqui foram direcionados para proposição de uma nova abordagem: a escolha do biomaterial auxiliada pela ferramenta de busca do Google Acadêmico e a otimização dos parâmetros de impressão por meio de modelos matemáticos e estatísticos. O último fator, relacionado a abordagem de design, não foi considerado nesse momento e foi mantido constante para não interferir nos resultados.

A combinação de multimateriais para compor uma biotinta é importante para alcançar características desejáveis que só um polímero não possibilita prover (Hospodiuk *et al*, 2017). A escolha de uma concentração de uma biotinta fazendo uso de uma ferramenta de busca como o Google Acadêmico permite estabelecer um panorama de composições já utilizadas anteriormente na bioimpressão e a partir disso, fazer uma escolha fundamentada tecnicamente, mas que ainda precisa de testes de validação para outras combinações. Gelatina e alginato são biopolímeros muito úteis na biofabricação por apresentarem características interessantes tanto quando se trata de compatibilidade com células, no quesito viabilidade celular (Mondal *et al*, 2019), quanto no que tange à bioimpressão 3D de arcabouços estruturais (*scaffolds*), no quesito manutenção de forma, conforme nos estudos que optaram por utilizar hidrogeis à base desses dois polímeros (Hospodiuk *et al*, 2017).

A printabilidade em relação à configuração dos parâmetros utilizando o DOE é embasada na literatura pela aplicação do planejamento em áreas afins, até então voltado para impressão 3D com filamentos e não associado com a bioimpressão 3D. Por exemplo, o DOE já foi utilizado como ferramenta para análise de parâmetros de impressão 3D de filamentos compostos por PCL/PCA, em que o tipo de design de dois níveis fatorial completo foi empregado para estudar a interação dos parâmetros: temperatura, altura da deposição, velocidade de impressão e velocidade do deslocamento (Haq *et al*, 2019). Também há trabalhos

utilizando a MSR e, especificamente, o design do tipo Composto Central foi utilizado também como método de otimização na impressão 3D, predizendo a rugosidade da superfície pelo controle das variáveis de espessura da camada, velocidade de impressão e densidade de preenchimento (Radhwan *et al*, 2019; Srinivasan *et al*, 2020).

Descobrir a janela de biofabricação (condições em que a extrusão em bioimpressoras 3D se mostra adequada) em relação aos parâmetros de impressão é importante para determinar se um material pode ser utilizado extensivamente para uma aplicação ou não, afinal há materiais que não se mostraram inadequados após uma investigação mais profunda em relação à printabilidade (He *et al*, 2016).

Na bioimpressão 3D, a fim de avaliar a printabilidade, parâmetros como a altura da camada e velocidade de impressão influenciam a estrutura final e por esse motivo devem ser considerados (Habib *et al*, 2018; Naghieh *et al*, 2020). Entretanto, no presente estudo como essa abordagem foi empregada para um estudo preliminar de printabilidade e resolução, o modelo escolhido foi de apenas uma camada, sendo a altura escolhida para ela foi fixa e de mesmo valor que o calibre (diâmetro interno) da agulha empregada em cada ensaio de forma a ajustar as possíveis interferências de *offsets*, conforme observadas em outros estudos (Naghieh *et al*, 2020). As outras variáveis escolhidas foram a pressão de extrusão, no *software* Slic3r representada pela variável *extrusion multiplier*, diâmetro da agulha e a velocidade.

As primeiras variáveis foram escolhidas levando em consideração o que já foi relatado em relação à influência da pressão de extrusão e da importância do diâmetro na printabilidade. Por outro lado, a velocidade foi escolhida dado a importância do tempo de impressão quando se trata de viabilidade celular, uma vez que uma das limitações de bioimpressoras é o tempo que se levaria para a bioimpressão de constructos de dimensões clinicamente relevantes de forma que as células ainda se mantenham viáveis.

O parâmetro de *extrusion multiplier* está presente nas interfaces de programas computacionais que foram desenvolvidos originalmente para impressoras 3D, enquanto o parâmetro de pressão são configuráveis em interfaces que foram desenvolvidas especialmente e dedicadas para a bioimpressão 3D. Como nesse trabalho os testes foram conduzidos utilizando bioimpressoras que adotam um mesmo *software* de impressão 3D, esse foi o parâmetro considerado e os intervalos de valores foram estabelecidos com base nos manuais dos equipamentos e testes preliminares.

O diâmetro da agulha deve ser considerado tanto para assegurar o posicionamento preciso do biomaterial em ensaios com bioimpressoras como para a viabilidade celular, levando em conta a taxa de cisalhamento. Empiricamente, quanto menor o calibre da agulha, maior seria a precisão. Nesse trabalho, o menor diâmetro de agulha considerado foi aquele em que a extrusão manual era possível sem esforço.

As bioimpressoras utilizadas para os ensaios gerados pelo PCC apresentam características bastante distintas e por isso qualquer comparação direta seria inviável, não sendo esse o foco desse estudo. Por exemplo, a posição do *home* (comando padrão de zerar eixos antes do início de cada impressão), o percurso padrão percorrido por cada uma delas utilizando um mesmo modelo a posição de finalização de impressão, entre outras especificações técnicas são distintas entre elas (Figura 22). Contudo, a variação entre as bioimpressoras é importante por possibilitar a comparação da MSR entre diferentes máquinas para produção de constructos variados. Entretanto, devido também a essa variedade e especificidades de cada equipamento, o valor de uma das variáveis (*extrusion multiplier*) teve que ser ajustado para valores coerentes com o desempenho do equipamento, não sendo possível a utilização do mesmo para todas.

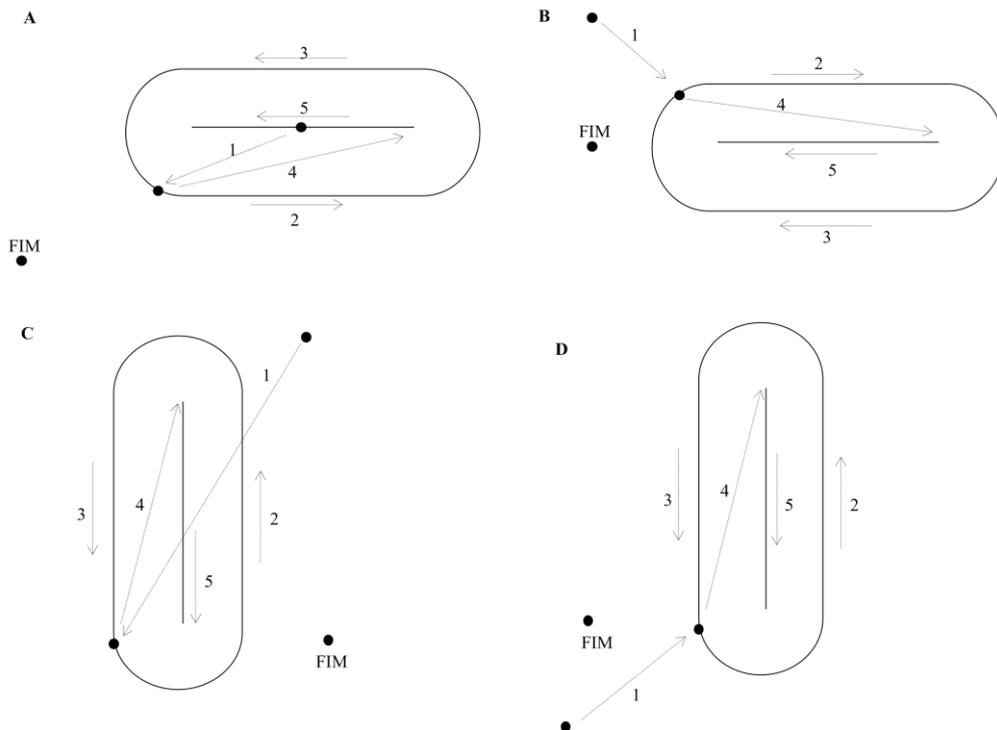


Figura 22. Representação esquemática do caminho percorrido pela seringa para testes de printabilidade. As setas representam a direção do movimento, as linhas cheias representam o comando de extrusão, ou seja, a localização do modelo em que há deposição de biomaterial pela bioimpressora. **A)** Bioimpressora 1, **B)** Bioimpressora 2, **C)** Bioimpressora 3 e **D)** Bioimpressora 4.

Os valores medidos para todos os ensaios conduzidos (para todas as bioimpressoras) representam filamentos que expandiram, isso é, possuíram valores positivos na porcentagem (valor de %Di) ou ensaios que resultaram em extrusão descontínua. Em um estudo com silicone como material extrusado, os resultados obtidos a partir do ajuste de parâmetros (diâmetro e a velocidade), Yuk e colaboradores obtiveram filamentos que além de expansão e de descontinuidade também apresentaram o mesmo diâmetro da agulha ou até mesmo menor (retração do filamento) (Yuk & Zhao, 2018). Essa diferença entre resultados pode ser explicada tanto pela diferença de material quanto pela falta de ensaios em condições que poderiam resultar em retração. Os resultados obtidos pelo presente estudo, apenas de expansão de filamento, ocorreram dadas as condições geradas pelo PCC. Nos ensaios conduzidos não houve combinação de ajuste dos parâmetros (variáveis) de modo que fosse obtida experimentalmente uma condição de retração ou equidade no filamento em relação ao calibre da agulha.

Além disso, na adequação de um modelo matemático, o valor de uma diferença percentual (%Di) igual a zero foi utilizado para representar condições de não extrusão. Interpretando os dados, valores iguais a zero significariam também que o filamento extrusado apresenta mesmo calibre da agulha. Como essas duas condições não foram consideradas distintas, avaliação que não foram de expansão de filamento não pôde ser realizada com a abordagem proposta.

Dentre as medidas de largura dos filamentos realizadas, o desvio padrão variou até 10% do valor da média. Com uma inspeção visual cuidadosa, nota-se que os ensaios que apresentaram maior valor para essa medida foram aqueles em que o filamento não apresenta um tamanho completamente homogêneo ao longo do filamento. Nesses casos, a combinação de parâmetros (para todas as bioimpressoras) não resultou em uma extrusão completamente uniforme. Entretanto, essas informações não foram utilizadas para o desenvolvimento do modelo matemático por corresponderem a uma informação qualitativa obtida pela inspeção visual.

Para a Bioimpressora 1, o modelo linear só foi devidamente ajustado após a compilação de dados de duas baterias de ensaios independentes importados no programa computacional Chemoface. Isso sugere que apesar dos modelos matemáticos não se adequarem similarmente às Bioimpressoras 3 e 4 com os dados obtidos de uma única bateria de ensaios, com o aumento dos dados coletados pela realização de mais ensaios independentes, é possível tornar insignificante a falta de ajuste, o que seria necessário para validar o modelo, ideia corroborada

por artigos que utilizam esse tipo de metodologia (Novaes *et al*, 2017). Já na Bioimpressora 2 foi onde se obteve os melhores valores em relação a validação estatística (significância do modelo e análise da falta de ajuste). Considerando que nos equipamentos 2, 3 e 4, os parâmetros utilizados foram exatamente os mesmos, tem-se que o emprego de equipamentos diferentes conforme a aplicação final desejada e análise das características distintas são interessantes do ponto de vista de exploração da variabilidade entre equipamentos e mesmo de processos específicos de bioimpressão.

Nos modelos ajustados, as variáveis que apresentaram significância foram apenas diâmetro da agulha e *extrusion multiplier*. Esse resultado corrobora com o que é observado na literatura em relação à parâmetros importantes na bioimpressão (He *et al*, 2016; Webb & Doyle, 2017; Habib *et al*, 2018; Naghieh *et al*, 2020), e aos equivalentes na impressão 3D (Takahashi & Miyashita, 2017).

Algumas propostas de abordagens para estudos do comportamento de biomateriais na biompressão 3D como simulações computacionais (Hölzl *et al*, 2016; Göhl *et al*, 2018) e estabelecimento de índices como o POI (*Parameter Optimization Index*) já foram utilizados (Webb & Doyle, 2017; Giuseppe *et al*, 2018). Entretanto, mesmo nessas situações em que índices são estabelecidos, em cada trabalho os fatores considerados geralmente são distintos em cada estudo, como acurácia; módulo de compressão; pressão e tamanho do filamento extrusado; tempo; e diâmetro da agulha. As múltiplas formas de lidar com a printabilidade mostram como é uma área em expansão nos quais os métodos ainda não estão totalmente delineados. Nesse sentido, a utilização de uma abordagem de modelagem matemática e estatística pode ser mais uma dessas ferramentas que contribuem para o desenvolvimento da tecnologia de bioimpressão 3D.

4.1. Limitações

Nesse trabalho, apenas uma concentração de bitointa foi testada para otimização de parâmetros por meio do planejamento do composto central.

Considerando a biotinta utilizada nesse trabalho, a composição de gelatina e alginato é responsiva à temperatura, portanto esse é um fator que influencia a performance do biomaterial em processos relacionados à extrusão de filamento e manutenção de forma. Assim, nos testes para validação da biotinta em relação à impressão de modelos tridimensionais, esse fator deve

ser também otimizado. Além disso, nesse trabalho foi avaliado apenas um modelo CAD bidimensional e apenas uma medida de largura foi considerada para gerar o modelo matemático.

Três variáveis foram escolhidas para serem moduladas nesse trabalho, entretanto para a otimização de todo o processo (até utilização de células), outros parâmetros também devem ser levados em consideração. Por exemplo, em estudo da viabilidade celular de fibroblastos, a alta pressão de extrusão empregada e a alta velocidade utilizada foram correlacionadas à uma viabilidade reduzida (Fakhruddin, Hamzah & Razak, 2018). Esse resultado demonstra a necessidade de otimizar esses parâmetros não só em relação à forma da estrutura produzida por bioimpressão 3D, mas também em relação ao comportamento celular durante o processo de bioimpressão. Um modelo que utiliza como variável dependente a viabilidade celular poderia ser validado estatisticamente. Além disso, os resultados estudados, nesse caso apenas o percentual da diferença entre filamento médio e o diâmetro da agulha, também devem ser ampliados para otimizar outros aspectos do processo, como produção de estruturas com mais de uma camada.

Apenas uma variável, largura do filamento visto de cima, foi analisada em diferentes condições, o que pode não ser suficiente para realmente caracterizar o filamento. Com a produção de estruturas com mais camadas, informações limitadas podem ser extraídas com esse tipo de análise.

5. Conclusão

Uma composição inédita, entre os artigos considerados, de biotinta para a bioimpressão 3D foi obtida a partir de uma abordagem racional com auxílio da ferramenta de busca do Google Acadêmico e dos dados extraídos dos artigos levantados.

Utilizando o Planejamento Composto Central (PCC) um delineamento experimental (DOE) foi proposto com a combinação de fatores de modo que um modelo matemático pudesse ser ajustado para duas das Bioimpressoras testadas. Sendo que para garantir a significância do modelo, para uma das Bioimpressora, foi necessário a coleta de mais dados.

As variáveis diâmetro da agulha e *extrusion multiplier* foram significantes no processo, corroborando o que já é relatado na literatura. Entretanto, para a variável dependente estudada e para a composição de biotinta estudada, a variável velocidade da impressão não foi significativa.

Perspectivas

A bioimpressão 3D é uma tecnologia promissora com aplicação em vários campos. O desenvolvimento de novos biomateriais para essas aplicações é uma realidade e a caracterização para o entendimento da tecnologia é fundamental, necessário e ainda em desenvolvimento.

A modelagem de estruturas específicas para bioimpressão 3D com hidrogeis ainda não é vastamente explorado e abre uma janela de possibilidade partindo do pressuposto da influência macroscópica na função de bioestruturas.

Modelos matemáticos, juntamente com simulações, podem servir como ferramenta para diminuir o número de ensaios e para a compreensão das características de biotintas. Essa abordagem direciona para uma facilidade até mesmo de modulação de parâmetros para materiais que nunca foram testados a partir do entendimento do comportamento de uma variedade de composições. A redução do número de ensaios conduzidos e a maximização de informações extraídas indicam o futuro do desenvolvimento da bioimpressão 3D.

Referências bibliográficas

- ABTO (2018) – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos <http://www.abto.org.br>
- AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.
- ALL3DP <https://all3dp.com/2/best-3d-printer-test-print-3d-models/> disponível em 26/08/2021.
- ANIL-INEVI, Muge et al. Biofabrication of in situ self assembled 3D cell cultures in a weightlessness environment generated using magnetic levitation. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- BAJAJ, Piyush et al. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. **Annual review of biomedical engineering**, v. 16, p. 247-276, 2014.
- BEZERRA, Marcos Almeida et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.
- BIDAN, Cécile M. et al. Geometry as a factor for tissue growth: towards shape optimization of tissue engineering scaffolds. **Advanced healthcare materials**, v. 2, n. 1, p. 186-194, 2013.
- BISWAL, Trinath. Biopolymers for tissue engineering applications: A review. **Materials Today: Proceedings**, v. 41, p. 397-402, 2021.
- BONGO, Manuelle et al. PEDOT: gelatin composites mediate brain endothelial cell adhesion. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 31, p. 3860-3867, 2013.
- BOX, George EP; DRAPER, Norman R. **Empirical model-building and response surfaces**. John Wiley & Sons, 1987.
- COMMUNITY, B. O. Blender - a 3D modelling and rendering package. Stichting Blender Foundation, Amsterdam, <http://www.blender.org>, 2018.
- DERBY, Brian. Bioprinting: inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, n. 47, p. 5717-5721, 2008.
- DEMIRTAŞ, Tuğrul Tolga; IRMAK, Gülseren; GÜMÜŞDERELIOĞLU, Menemşe. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. **Biofabrication**, v. 9, n. 3, p. 035003, 2017.
- DUAN, Bin et al. 3D bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. **Journal of biomedical materials research Part A**, v. 101, n. 5, p. 1255-1264, 2013.
- CAMPBELL, Thomas et al. Could 3D printing change the world. Technologies, Potential, and Implications of Additive Manufacturing, Atlantic Council, Washington, DC, v. 3, 2011.
- CHIMENE, David et al. Advanced bioinks for 3D printing: a materials science perspective. **Annals of biomedical engineering**, v. 44, n. 6, p. 2090-2102, 2016.

- FAKHRUDDIN, Khalida; HAMZAH, Mohd Syahir Anwar; ABD RAZAK, Saiful Izwan. Effects of extrusion pressure and printing speed of 3D bioprinted construct on the fibroblast cells viability. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2018. p. 012042
- FEDOROV, Andriy et al. 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. **Magnetic resonance imaging**, v. 30, n. 9, p. 1323-1341, 2012.
- FREEMAN, Fiona E. et al. 3D bioprinting spatiotemporally defined patterns of growth factors to tightly control tissue regeneration. **Science advances**, v. 6, n. 33, p. eabb5093, 2020.
- GALDÁMEZ, Edwin Vladimir Cardoza. Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos. **São Carlos**, 2002.
- GIANNITELLI, Sara Maria et al. Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 580-594, 2014.
- GILLISPIE, Gregory et al. Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. **Biofabrication**, v. 12, n. 2, p. 022003, 2020.
- GLEADALL, Andrew et al. Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. **Burns & trauma**, v. 6, 2018.
- GÖHL, Johan et al. Simulations of 3D bioprinting: predicting bioprintability of nanofibrillar inks. **Biofabrication**, v. 10, n. 3, p. 034105, 2018.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813-1827, 2011.
- GOPINATHAN, Janarthanan; NOH, Insup. Recent trends in bioinks for 3D printing. **Biomaterials research**, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2018.
- GUNGOR-OZKERIM, P. Selcan et al. Bioinks for 3D bioprinting: an overview. **Biomaterials science**, v. 6, n. 5, p. 915-946, 2018.
- GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta materialia**, v. 48, n. 1, p. 263-277, 2000.
- GROLL, Jürgen et al. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. **Biofabrication**, v. 8, n. 1, p. 013001, 2016.
- HABIB, Ahasan et al. 3D printability of alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel. **Materials**, v. 11, n. 3, p. 454, 2018.
- HAQ, Reazul Haq Abdul et al. 3D Printer parameters analysis for PCL/PLA filament wire using Design of Experiment (DOE). In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2019. p. 012001.
- HE, Yong et al. Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

- HÖLZL, Katja et al. Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, p. 032002, 2016.
- HOLLISTER, Scott J.; LIN, Cheng Yu. Computational design of tissue engineering scaffolds. **Computer methods in applied mechanics and engineering**, v. 196, n. 31-32, p. 2991-2998, 2007.
- HOSPODIUK, Monika et al. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 2, p. 217-239, 2017.
- HUERTA, Santiago. Oval domes: History, geometry and mechanics. **Nexus Network Journal**, v. 9, n. 2, p. 211-248, 2007
- JUNGST, Tomasz et al. Strategies and molecular design criteria for 3D printable hydrogels. **Chemical reviews**, v. 116, n. 3, p. 1496-1539, 2016.
- KHANG, Gilson et al. Biomaterials: tissue engineering and scaffolds. Encyclopedia of **Medical devices and instrumentation**, v. 2, p. 366-83, 2006.
- KHODA, A. K. M.; OZBOLAT, Ibrahim T.; KOC, Bahattin. Modeling of variational gradient porous architecture with multi-directional filament deposition in 3D scaffolds. **Computer-Aided Design and Applications**, v. 10, n. 3, p. 445-459, 2013.
- KOLIND, Kristian et al. Guidance of stem cell fate on 2D patterned surfaces. **Biomaterials**, v. 33, n. 28, p. 6626-6633, 2012.
- KYLE, Stuart et al. 'Printability' of candidate biomaterials for extrusion based 3D printing: state-of-the-art. **Advanced healthcare materials**, v. 6, n. 16, p. 1700264, 2017.
- LEE, Jia Min et al. 3D bioprinting processes: A perspective on classification and terminology. **International Journal of Bioprinting**, v. 4, n. 2, 2018.
- LEE, Jin Woo et al. Evaluating cell proliferation based on internal pore size and 3D scaffold architecture fabricated using solid freeform fabrication technology. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 12, p. 3195-3205, 2010.
- MALDA, Jos et al. 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. **Advanced materials**, v. 25, n. 36, p. 5011-5028, 2013.
- MICHALSKI, Mark H.; ROSS, Joseph S. The shape of things to come: 3D printing in medicine. **Jama**, v. 312, n. 21, p. 2213-2214, 2014.
- MICROSOFT Corporation. *Microsoft Excel*. <https://office.microsoft.com/excel>, 2018.
- MIRONOV, Vasilii et al. Biofabrication: a 21st century manufacturing paradigm. **Biofabrication**, v. 1, n. 2, p. 022001, 2009.
- MONDAL, Arindam et al. Characterization and printability of sodium alginate-gelatin hydrogel for bioprinting NSCLC co-culture. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

MOUSAVI, Mitra et al. Photocatalytic degradation of different pollutants by the novel gCN-NS/Black-TiO₂ heterojunction photocatalyst under visible light: introducing a photodegradation model and optimization by response surface methodology (RSM). **Materials Chemistry and Physics**, v. 258, p. 123912, 2021.

MURPHY, Sean V.; ATALA, Anthony. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 773-785, 2014.

MURPHY, Sean V.; DE COPPI, Paolo; ATALA, Anthony. Opportunities and challenges of translational 3D bioprinting. **Nature biomedical engineering**, v. 4, n. 4, p. 370-380, 2020.

MYERS, Raymond H. et al. Response surface methodology: a retrospective and literature survey. **Journal of quality technology**, v. 36, n. 1, p. 53-77, 2004.

NAGHIEH, Saman; CHEN, Daniel. Printability—a key issue in extrusion-based bioprinting. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2021.

NAGHIEH, Saman et al. Printability of 3D printed hydrogel scaffolds: Influence of hydrogel composition and printing parameters. **Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 292, 2020.

NG, Wei Long; YEONG, Wai Yee; NAING, May Win. Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. **International Journal of Bioprinting**, v. 2, n. 1, 2016.

NIE, Jing et al. Grafting of 3D bioprinting to in vitro drug screening: a review. **Advanced healthcare materials**, v. 9, n. 7, p. 1901773, 2020.

NOVAES, C. G. et al. Otimização de métodos analíticos usando metodologia de superfícies de resposta-Parte I: variáveis de processo. **Revista Virtual Química**, v. 9, n. 3, p. 1284-1215, 2017.

NUNES, Cleiton A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 2003-2010, 2012.

O'CONNELL, Cathal et al. Characterizing bioinks for extrusion bioprinting: printability and rheology. **Methods Mol. Biol**, v. 2140, p. 111-133, 2020.

OZBOLAT, Ibrahim; GUDAPATI, Hemanth. A review on design for bioprinting. **Bioprinting**, v. 3, p. 1-14, 2016.

OZBOLAT, Ibrahim T.; YU, Yin. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 60, n. 3, p. 691-699, 2013.

PARFENOV, Vladislav A. et al. Scaffold-free, label-free and nozzle-free biofabrication technology using magnetic levitational assembly. **Biofabrication**, v. 10, n. 3, p. 034104, 2018.

PAXTON, Naomi et al. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. **Biofabrication**, v. 9, n. 4, p. 044107, 2017.

QU, Diyang et al. Congruence and discrepancy in migrant children's and mothers' perceived discrimination: Using response surface analysis to examine the effects on psychological distress. **Applied Psychology: Health and Well-Being**, 2021.

RADHWAN, H. et al. Optimization parameter effects on the quality surface finish of the three-dimensional printing (3D-printing) fused deposition modeling (FDM) using RSM. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing LLC, 2019. p. 020155.

RANDAZZO, Michael et al. 3D printing in neurosurgery: a systematic review. **Surgical neurology international**, v. 7, n. Suppl 33, p. S801, 2016.

RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

SACHLOS, E. et al. Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication. **Biomaterials**, v. 24, n. 8, p. 1487-1497, 2003.

SÁNCHEZ-SALAZAR, Mónica Gabriela; ÁLVAREZ, Mario Moisés; TRUJILLO-DE SANTIAGO, G. **Advances in 3D bioprinting for the biofabrication of tumor models. Bioprinting**, p. e00120, 2020.

SATPATHY, Aishwarya et al. Developments with 3D bioprinting for novel drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 13, n. 12, p. 1115-1129, 2018.

SCHUBERT, Carl; VAN LANGEVELD, Mark C.; DONOSO, Larry A. Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. **British Journal of Ophthalmology**, v. 98, n. 2, p. 159-161, 2014.

SILVA, Luciano P. Current trends and challenges in biofabrication using biomaterials and nanomaterials: future perspectives for 3D/4D bioprinting. **3D and 4D Printing in Biomedical Applications: Process Engineering and Additive Manufacturing**, p. 373-421, 2019.

SOBRAL, Jorge M. et al. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 3, p. 1009-1018, 2011.

SRINIVASAN, R. et al. Prediction of tensile strength in FDM printed ABS parts using response surface methodology (RSM). **Materials Today: Proceedings**, v. 27, p. 1827-1832, 2020.

SUN, Wei et al. Bio-CAD modeling and its applications in computer-aided tissue engineering. **Computer-aided design**, v. 37, n. 11, p. 1097-1114, 2005.

SUN, Wei et al. The bioprinting roadmap. **Biofabrication**, v. 12, n. 2, p. 022002, 2020.

TAKAHASHI, Haruki; MIYASHITA, Homei. Expressive fused deposition modeling by controlling extruder height and extrusion amount. In: **Proceedings of the 2017 CHI Conference on Human Factors in Computing Systems**. 2017. p. 5065-5074.

TAN, J. Y.; CHUA, C. K.; LEONG, K. F. Indirect fabrication of tissue engineering scaffolds using rapid prototyping and a foaming process. In: **Innovative Developments in Design and Manufacturing**. CRC Press, 2009. p. 69-76.

TEÓFILO, Reinaldo F.; FERREIRA, Márcia. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

TSIAPALIS, Dimitrios; O'DRISCOLL, Lorraine. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 991, 2020.

WEBB, Braeden; DOYLE, Barry J. Parameter optimization for 3D bioprinting of hydrogels. **Bioprinting**, v. 8, p. 8-12, 2017.

WHO (2018) – World Health Organization

WU, Shih-Ching et al. Cell adhesion and proliferation enhancement by gelatin nanofiber scaffolds. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 26, n. 6, p. 565-577, 2011.

XING, Fei et al. Regulation and directing stem cell fate by tissue engineering functional microenvironments: scaffold physical and chemical cues. **Stem cells international**, v. 2019, 2019.

YUK, Hyunwoo; ZHAO, Xuanhe. A new 3D printing strategy by harnessing deformation, instability, and fracture of viscoelastic inks. **Advanced Materials**, v. 30, n. 6, p. 1704028, 2018.

Link dos modelos STL citados

Majda107. (<https://www.thingiverse.com/thing:2656594>) disponível em 08/10/2021.

Antonin_Nosek. (<https://www.thingiverse.com/thing:2829553>) disponível em 08/10/2021.

Clokspring (<https://www.myminifactory.com/object/3d-print-pinstriped-table-vase-71432>) disponível em 08/10/2021.

ANEXO I – Lista de Produção

1. Apresentações em formato pôster

- “Desenvolvimento e validação de protocolo para caracterização de biomateriais para utilização em bioimpressoras 3D” em IX Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) (Brasília, 2019).
- “Elaboração de protocolo para testes de biotintas a serem utilizadas em processo de bioimpressão 3D” em XXIV Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, 2019).
- “Descelularização de coração de frangos para uso na composição de uma biotinta para bioimpressão 3D” em XXV Encontro do Talento Estudantil da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, 2020).
- “Proposta de estratégia para caracterização de biomateriais a serem utilizados em bioimpressão tridimensional” em I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (Brasília, 2020).

2. Prêmio obtido

- Terceiro lugar no XXV Encontro do Talento Estudantil, categoria Animal Pós-Graduação com o trabalho “Descelularização de coração de frangos para uso na composição de uma biotinta para bioimpressão 3D”

3. Publicação

- Capítulo de livro: Silva, L. P., **da Rocha Vaz, G. M.**, Pupe, J. M., Chafran, L. S., Neto, L. A. A., Santiago, T. R., ... & Polez, V. L. P. (2020). Green nanoparticles for biomedical and bioengineering applications. *Nanoparticles and their Biomedical Applications*, 225-262. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0391-7_9

4. Organização de eventos

- Atuação como membro da Comissão Organizadora dos I e II Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia, realizados em 07/2020 e 07/2021.

ANEXO II - Artigos utilizados para a escolha de biomaterial

1. LI, Zhao et al. Tuning alginate-gelatin bioink properties by varying solvent and their impact on stem cell behavior. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.
2. YAO, Bin et al. Enzymatically degradable alginate/gelatin bioink promotes cellular behavior and degradation in vitro and in vivo. **Biofabrication**, v. 11, n. 4, p. 045020, 2019.
3. GAO, Teng et al. Optimization of gelatin–alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. **Biofabrication**, v. 10, n. 3, p. 034106, 2018.
4. CHENG, Liuhanhang et al. Properties of an alginate-gelatin-based bioink and its potential impact on cell migration, proliferation, and differentiation. **International journal of biological macromolecules**, v. 135, p. 1107-1113, 2019.
5. KOLAN, Krishna CR et al. Bioprinting with human stem cell-laden alginate-gelatin bioink and bioactive glass for tissue engineering. **International Journal of Bioprinting**, v. 5, n. 2.2, 2019.
6. DISTLER, Thomas et al. 3D printed oxidized alginate-gelatin bioink provides guidance for C2C12 muscle precursor cell orientation and differentiation via shear stress during bioprinting. **Biofabrication**, v. 12, n. 4, p. 045005, 2020.
7. HILLER, Thomas et al. Generation of a 3D liver model comprising human extracellular matrix in an alginate/gelatin-based bioink by extrusion bioprinting for infection and transduction studies. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3129, 2018.
8. LI, Liying et al. Engineering gelatin-based alginate/carbon nanotubes blend bioink for direct 3D printing of vessel constructs. **International journal of biological macromolecules**, v. 145, p. 262-271, 2020.
9. LI, Jianjun et al. Bioactive nanoparticle reinforced alginate/gelatin bioink for the maintenance of stem cell stemness. **Materials Science and Engineering: C**, v. 126, p. 112193, 2021.
10. RUTHER, F. et al. Biofabrication of vessel-like structures with alginate di-aldehyde—gelatin (ADA-GEL) bioink. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2019.

11. OJANSIVU, Miina et al. Wood-based nanocellulose and bioactive glass modified gelatin–alginate bioinks for 3D bioprinting of bone cells. **Biofabrication**, v. 11, n. 3, p. 035010, 2019.
12. KOCH, Fritz et al. Generic method of printing window adjustment for extrusion-based 3D-bioprinting to maintain high viability of mesenchymal stem cells in an alginate-gelatin hydrogel. **Bioprinting**, v. 20, p. e00094, 2020.
13. OTHMAN, Sheril Amira et al. Alginate-gelatin bioink for bioprinting of hela spheroids in alginate-gelatin hexagon shaped scaffolds. **Polymer Bulletin**, p. 1-21, 2020.
14. MONDAL, Arindam et al. Characterization and printability of sodium alginate-gelatin hydrogel for bioprinting NSCLC co-culture. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.
15. JIANG, Tao et al. Engineering bioprintable alginate/gelatin composite hydrogels with tunable mechanical and cell adhesive properties to modulate tumor spheroid growth kinetics. **Biofabrication**, v. 12, n. 1, p. 015024, 2019.
16. WEI, Lichun et al. An approach for mechanical property optimization of cell-laden alginate–gelatin composite bioink with bioactive glass nanoparticles. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1-12, 2020.
17. ESWARAMOORTHY, Sindhuja D. et al. 3D bioprinting of mesenchymal stem cells and endothelial cells in an alginate-gelatin-based bioink. **Journal of 3D printing in medicine**, v. 5, n. 1, p. 23-36, 2021.
18. ABDULMAGED, Alyaa Idrees et al. Investigation on the printability of bioink based on alginate-gelatin hydrogel and liquid crystals. **Bulletin of Electrical Engineering and Informatics**, v. 9, n. 4, p. 1718-1725, 2020.
19. BOCIAGA, Dorota et al. Sodium alginate/gelatine hydrogels for direct bioprinting—the effect of composition selection and applied solvents on the bioink properties. **Materials**, v. 12, n. 17, p. 2669, 2019.
20. FLORES-TORRES, Salvador et al. Alginate–gelatin–Matrigel hydrogels enable the development and multigenerational passaging of patient-derived 3D bioprinted cancer spheroid models. **Biofabrication**, v. 13, n. 2, p. 025001, 2021.
21. JIANG, Tao et al. Bioprintable alginate/gelatin hydrogel 3D in vitro model systems induce cell spheroid formation. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 137, 2018.

22. LUO, Wenbin et al. Printability optimization of gelatin-alginate bioinks by cellulose nanofiber modification for potential meniscus bioprinting. **Journal of Nanomaterials**, v. 2020, 2020.
23. DI GIUSEPPE, Michael et al. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, v. 79, p. 150-157, 2018.

**ANEXO III – Valores obtidos nas medições dos ensaios Bioimpressora 2 (Primeira
bateria de ensaios)**

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,431	1,404	2,984	2,994	1,006	-	1,502	1,667	3,403	0,822
2	1,446	1,374	2,865	3,010	0,592	-	1,592	1,667	3,583	0,836
3	1,462	1,374	2,969	2,935	0,740	-	1,561	1,667	3,508	0,866
4	1,507	1,404	3,029	3,099	0,680	-	1,652	1,696	3,528	0,881
5	1,537	1,374	3,028	3,114	0,711	-	1,667	1,726	3,404	0,776
6	1,567	1,404	3,028	3,099	0,651	-	1,682	1,696	3,434	0,791
7	1,507	1,473	3,013	3,114	0,799	-	1,593	1,637	3,348	0,890
8	1,492	1,523	3,028	3,145	0,681	-	1,697	1,726	3,433	0,895
9	1,553	1,468	3,000	3,085	0,740	-	1,622	1,697	3,344	0,926
10	1,552	1,474	3,029	3,101	0,828	-	1,577	1,667	3,256	0,920
11	1,537	1,404	3,058	3,174	0,711	-	1,652	1,667	3,329	0,910
12	1,507	1,493	3,088	3,129	0,769	-	1,622	1,667	3,224	0,926
13	1,507	1,434	2,999	3,099	0,740	-	1,608	1,607	3,254	0,895
14	1,507	1,464	3,028	3,144	0,769	-	1,592	1,786	3,284	0,990
15	1,537	1,523	3,029	3,145	0,799	-	1,712	1,696	3,165	0,925
16	1,562	1,493	3,029	3,264	0,705	-	1,592	1,786	3,194	0,955
17	1,537	1,494	3,117	3,189	0,711	-	1,622	1,638	3,194	0,985
18	1,522	1,493	3,142	3,174	0,769	-	1,562	1,697	3,256	0,955
19	1,512	1,523	3,206	3,174	0,681	-	1,713	1,756	3,345	0,955
20	1,602	1,523	3,206	3,263	0,740	-	1,682	1,786	3,284	0,955
21	1,567	1,553	3,163	3,279	0,711	-	1,532	1,696	3,194	0,990
22	1,537	1,523	3,206	3,293	0,769	-	1,652	1,667	3,299	0,955
23	1,567	1,493	3,237	3,323	0,769	-	1,652	1,756	3,269	1,015
24	1,477	1,479	3,201	3,174	0,770	-	1,712	1,697	3,286	1,015
25	1,602	1,593	3,281	3,234	0,858	-	1,817	1,786	3,164	0,955
26	1,537	1,498	3,147	3,204	0,799	-	1,667	1,726	3,316	0,895
27	1,537	1,493	3,073	3,159	0,799	-	1,772	1,756	3,449	0,806
28	1,537	1,493	3,206	3,174	0,740	-	1,667	1,726	3,448	0,836
29	1,507	1,434	2,999	3,263	0,740	-	1,682	1,711	3,433	0,776
30	1,537	1,494	3,088	3,114	0,740	-	1,787	1,711	3,358	0,836

Ensaio	11	12	13	14	15	16	17
1	-	2,457	1,378	1,557	1,622	1,632	1,748
2	-	2,440	1,542	1,587	1,697	1,573	1,748
3	-	2,500	1,587	1,663	1,682	1,692	1,778
4	-	2,455	1,587	1,709	1,772	1,632	1,748
5	-	2,485	1,647	1,737	1,712	1,692	1,778
6	-	2,455	1,647	1,707	1,742	1,692	1,778
7	-	2,486	1,737	1,677	1,682	1,663	1,793
8	-	2,425	1,692	1,677	1,697	1,632	1,808
9	-	2,515	1,617	1,737	1,638	1,692	1,807
10	-	2,485	1,707	1,707	1,667	1,603	1,778
11	-	2,516	1,797	1,707	1,652	1,663	1,748
12	-	2,455	1,737	1,737	1,682	1,632	1,748
13	-	2,485	1,766	1,782	1,802	1,662	1,817
14	-	2,516	1,857	1,742	1,772	1,663	1,748
15	-	2,485	1,707	1,797	1,742	1,633	1,773
16	-	2,545	1,767	1,767	1,712	1,662	1,807
17	-	2,485	1,887	1,797	1,712	1,663	1,778
18	-	2,455	1,797	1,826	1,743	1,574	1,748
19	-	2,485	1,977	1,797	1,742	1,662	1,719
20	-	2,485	1,916	1,767	1,652	1,603	1,748
21	-	2,515	1,917	1,693	1,773	1,721	1,659
22	-	2,545	1,916	1,767	1,772	1,721	1,659
23	-	2,455	1,917	1,708	1,742	1,692	1,630
24	-	2,515	1,946	1,797	1,593	1,751	1,689
25	-	2,575	1,827	1,707	1,742	1,662	1,659
26	-	2,485	1,887	1,737	1,832	1,929	1,689
27	-	2,545	1,917	1,737	1,652	1,692	1,659
28	-	2,515	1,947	1,752	1,787	1,692	1,719
29	-	2,335	1,976	1,751	1,712	1,783	1,748
30	-	2,560	1,946	1,772	1,742	1,766	1,763

Valores obtidos nas medições dos ensaios Bioimpressora 2 (Segunda bateria de ensaios)

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,561	1,619	3,119	3,153	0,849	-	1,667	1,746	3,396	1,016
2	1,688	1,604	3,095	3,089	0,92	-	1,667	1,587	3,522	1,032
3	1,497	1,604	3,071	3,280	0,920	-	1,794	1,714	3,554	1,024
4	1,561	1,627	3,072	3,153	0,849	-	1,730	1,683	3,553	1,071
5	1,656	1,651	3,119	3,121	0,849	-	1,636	1,809	3,711	1,079
6	1,624	1,604	3,000	3,185	0,707	-	1,761	1,714	3,648	1,127
7	1,560	1,510	3,071	3,185	0,802	-	1,762	1,747	3,616	1,079
8	1,592	1,533	3,095	3,217	0,873	-	1,792	1,746	3,711	1,079
9	1,529	1,698	3,167	3,185	0,943	-	1,792	1,65	3,616	1,112
10	1,624	1,651	3,024	3,185	0,779	-	1,730	1,714	3,561	1,111
11	1,561	1,651	3,024	3,121	0,873	-	1,636	1,587	3,632	1,127
12	1,529	1,628	3,095	3,026	0,896	-	1,667	1,682	3,561	1,079
13	1,561	1,557	3,024	3,057	0,943	-	1,761	1,715	3,538	1,000
14	1,720	1,510	3,000	3,185	0,92	-	1,635	1,777	3,585	1,032
15	1,465	1,580	2,929	3,153	0,967	-	1,698	1,619	3,467	1,016
16	1,465	1,533	3,048	3,280	0,896	-	1,73	1,809	3,491	1,095
17	1,529	1,557	3,048	3,248	0,849	-	1,761	1,809	3,538	1,127
18	1,497	1,627	3,048	3,249	0,849	-	1,824	1,714	3,514	1,095
19	1,529	1,698	3,000	3,057	0,707	-	1,667	1,746	3,443	1,063
20	1,529	1,628	2,929	3,280	0,896	-	1,761	1,904	3,420	1,032
21	1,560	1,604	2,976	3,185	0,873	-	1,792	1,778	3,396	1,048
22	1,592	1,604	2,905	3,312	0,826	-	1,667	1,841	3,467	1,048
23	1,497	1,604	3,000	3,376	0,896	-	1,856	1,778	3,396	1,032
24	1,720	1,627	2,929	3,312	0,873	-	1,793	1,809	3,420	1,112
25	1,688	1,580	2,952	3,280	0,896	-	1,667	1,778	3,467	1,032
26	1,721	1,533	2,905	3,249	0,825	-	1,604	1,809	3,443	1,048
27	1,656	1,533	3,024	3,217	0,920	-	1,510	1,746	3,396	1,032
28	1,562	1,439	3,000	3,185	0,920	-	1,541	1,778	3,231	1,048
29	1,592	1,510	2,976	3,312	0,778	-	1,604	1,809	3,349	1,080
30	1,561	1,557	2,881	3,376	0,849	-	1,574	1,682	3,326	0,984

Ensaio	11	12	13	14	15	16	17
1	-	2,188	1,722	1,571	1,589	1,746	1,827
2	-	2,203	1,723	1,810	1,619	1,690	1,731
3	-	2,246	1,850	1,619	1,588	1,714	1,923
4	-	2,289	1,755	1,714	1,620	1,643	1,763
5	-	2,319	1,787	1,714	1,713	1,690	1,923
6	-	2,260	1,722	1,666	1,650	1,738	1,699
7	-	2,377	1,787	1,714	1,619	1,715	1,763
8	-	2,465	1,723	1,666	1,495	1,690	1,891
9	-	2,466	1,579	1,809	1,682	1,666	1,827
10	-	2,378	1,531	1,904	1,684	1,714	1,892
11	-	2,348	1,675	1,809	1,651	1,762	1,827
12	-	2,377	1,603	1,809	1,557	1,762	1,859
13	-	2,334	1,627	1,714	1,651	1,714	1,859
14	-	2,525	1,722	1,905	1,715	1,714	1,955
15	-	2,408	1,770	1,761	1,588	1,690	1,923
16	-	2,437	1,723	1,619	1,620	1,786	1,827
17	-	2,436	1,699	1,761	1,713	1,738	1,923
18	-	2,407	1,842	1,714	1,619	1,762	1,764
19	-	2,436	1,890	1,714	1,744	1,762	1,860
20	-	2,407	1,818	1,666	1,775	1,714	1,827
21	-	2,426	1,842	1,857	1,806	1,762	1,827
22	-	2,441	1,818	1,714	1,713	1,833	1,795
23	-	2,373	1,890	1,669	1,714	1,857	1,827
24	-	2,480	1,890	1,762	1,682	1,738	1,763
25	-	2,436	1,986	1,666	1,682	1,929	1,827
26	-	2,407	1,866	1,809	1,775	1,738	1,859
27	-	2,525	1,818	1,952	1,775	1,619	1,859
28	-	2,495	1,866	1,810	1,806	1,690	1,891
29	-	2,524	1,794	1,905	1,806	1,762	1,891
30	-	2,466	1,746	1,904	1,869	1,762	1,956

ANEXO IV – Valores obtidos nas medições dos ensaios Bioimpressora 2

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,822	1,822	3,728	3,594	-	-	2,002	1,850	4,023	1,031
2	1,857	1,850	3,728	3,649	-	-	1,988	1,864	4,113	1,031
3	1,852	1,821	3,658	3,684	-	-	2,096	1,819	4,233	1,071
4	1,897	1,850	3,629	3,594	-	-	2,003	1,878	4,203	1,021
5	1,911	1,880	3,653	3,505	-	-	1,914	1,878	4,143	1,046
6	1,882	1,909	3,569	3,505	-	-	1,973	1,863	3,933	1,076
7	1,911	1,880	3,564	3,445	-	-	1,963	1,863	3,693	1,016
8	1,912	1,880	3,624	3,510	-	-	1,924	1,848	3,688	1,011
9	1,822	1,909	3,653	3,639	-	-	1,885	1,834	3,813	1,076
10	1,912	1,968	3,683	3,629	-	-	1,816	1,863	3,948	1,046
11	1,911	1,939	3,802	3,654	-	-	1,855	1,863	4,203	1,016
12	1,822	1,997	3,802	3,654	-	-	1,826	1,848	4,354	1,061
13	1,792	1,939	3,564	3,624	-	-	1,870	1,863	4,233	1,077
14	1,877	1,845	3,653	3,654	-	-	1,929	1,893	4,178	1,046
15	1,966	1,884	3,713	3,594	-	-	1,885	1,834	4,143	1,031
16	1,911	1,880	3,683	3,654	-	-	1,885	1,878	4,053	1,061
17	1,911	1,880	3,742	3,654	-	-	1,855	1,893	4,053	1,031
18	1,897	1,821	3,891	3,625	-	-	1,856	1,893	3,993	1,016
19	1,912	1,909	4,099	3,744	-	-	1,900	1,908	4,054	1,016
20	1,911	1,850	3,981	3,714	-	-	1,870	1,863	4,158	1,046
21	2,001	1,880	3,995	3,589	-	-	1,870	1,849	4,204	1,001
22	1,966	1,850	3,861	3,679	-	-	1,929	1,878	4,264	1,001
23	1,991	1,909	3,876	3,684	-	-	1,973	1,878	4,023	0,926
24	1,928	1,938	3,728	3,654	-	-	1,998	1,834	3,843	1,031
25	1,911	1,944	3,683	3,490	-	-	2,002	1,864	3,783	0,956
26	1,942	1,762	3,683	3,430	-	-	1,973	1,878	3,753	0,986
27	1,971	1,821	3,644	3,355	-	-	1,86	1,834	3,903	0,911
28	2,001	1,826	3,431	3,355	-	-	1,973	1,893	4,084	0,971
29	1,936	1,880	3,564	3,310	-	-	1,855	1,922	4,323	0,956
30	1,972	1,821	3,639	3,535	-	-	1,885	1,804	4,399	1,046

Ensaio	11	12	13	14	15	16	17
1	-	3,053	1,893	2,005	2,077	2,083	2,202
2	-	3,038	1,982	1,975	2,122	2,053	2,143
3	-	2,949	2,046	2,005	2,082	2,083	2,246
4	-	2,994	2,012	2,020	2,077	2,083	2,217
5	-	3,068	1,923	2,006	2,137	2,053	2,201
6	-	2,949	1,952	1,961	1,988	2,113	2,201
7	-	3,068	1,967	2,020	2,077	2,113	2,142
8	-	3,038	1,967	1,990	2,033	2,143	2,053
9	-	3,009	1,967	2,020	2,082	2,142	2,052
10	-	2,989	1,967	1,991	2,032	2,118	1,993
11	-	2,915	1,952	1,961	2,003	2,142	2,052
12	-	2,861	1,997	1,961	2,151	2,083	2,023
13	-	3,009	1,893	1,936	2,166	2,113	2,082
14	-	2,979	1,938	1,842	2,077	2,142	2,112
15	-	3,008	2,041	1,906	2,023	2,083	2,023
16	-	2,949	2,071	1,901	2,107	2,053	2,142
17	-	2,89	2,041	1,901	2,196	1,994	2,053
18	-	2,95	1,952	1,823	2,216	1,994	2,052
19	-	2,925	1,952	1,887	2,166	1,875	2,023
20	-	3,244	2,100	1,812	2,156	1,934	2,171
21	-	3,215	2,056	1,782	2,300	1,964	2,201
22	-	3,215	1,982	1,782	2,270	1,934	2,142
23	-	3,244	1,987	1,782	2,290	1,964	2,172
24	-	3,097	1,952	1,783	2,235	1,845	2,186
25	-	3,063	1,982	1,753	2,181	1,870	2,186
26	-	3,156	1,923	1,664	2,235	1,875	2,172
27	-	3,185	1,952	1,738	2,300	1,994	2,261
28	-	3,126	1,952	1,723	2,285	1,934	2,261
29	-	3,097	1,893	1,753	2,255	1,905	2,142
30	-	2,979	1,952	1,669	2,314	1,913	2,246

ANEXO V – Valores obtidos nas medições dos ensaios Bioimpressora 3

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,796	1,740	3,550	3,629	1,107	-	1,882	1,935	3,961	0,995
2	1,676	1,770	3,475	3,556	1,047	-	1,912	1,995	3,931	1,050
3	1,677	1,804	3,446	3,570	1,012	-	1,940	2,084	4,095	1,050
4	1,731	1,829	3,489	3,600	1,072	-	2,001	1,995	4,094	1,015
5	1,741	1,799	3,639	3,674	1,012	-	1,940	2,054	3,886	1,080
6	1,781	1,858	3,537	3,659	1,087	-	1,985	1,996	3,901	1,145
7	1,737	1,770	3,610	3,629	1,126	-	1,999	2,084	3,842	1,140
8	1,737	1,829	3,580	3,659	0,983	-	1,910	2,055	3,797	1,100
9	1,857	1,829	3,699	3,540	1,032	-	1,984	2,084	3,871	1,100
10	1,827	1,789	3,610	3,450	1,057	-	1,950	2,114	3,931	1,110
11	1,737	1,829	3,526	3,599	1,042	-	1,939	2,04	4,050	1,125
12	1,752	1,799	3,52	3,509	0,997	-	2,029	2,099	4,064	1,095
13	1,796	1,863	3,460	3,479	1,057	-	2,004	2,129	4,020	1,170
14	1,841	1,829	3,519	3,719	1,087	-	1,970	2,159	3,901	1,125
15	1,766	1,814	3,490	3,929	1,072	-	1,969	2,144	4,020	1,080
16	1,796	1,809	3,579	3,660	1,087	-	1,984	2,069	3,975	1,200
17	1,736	1,799	3,400	3,540	1,101	-	2,000	2,174	3,906	1,140
18	1,781	1,814	3,539	3,599	1,042	-	1,940	2,084	3,812	1,125
19	1,781	1,917	3,609	3,779	1,106	-	1,939	2,084	3,777	1,200
20	1,662	1,888	3,609	3,870	1,102	-	2,029	2,114	3,787	1,170
21	1,736	1,903	3,698	3,899	1,161	-	1,999	2,129	3,727	1,235
22	1,706	1,844	3,669	4,019	1,131	-	2,000	2,174	3,811	1,200
23	1,916	1,888	3,579	3,750	1,131	-	1,999	2,174	3,871	1,140
24	1,826	1,868	3,564	3,689	1,012	-	2,029	2,084	3,856	1,180
25	1,901	1,829	3,579	3,809	1,042	-	2,030	2,174	3,737	1,260
26	1,721	1,883	3,683	3,569	1,072	-	2,065	2,054	3,635	1,265
27	1,677	1,888	3,783	3,569	1,091	-	2,030	2,030	3,718	1,200
28	1,662	1,888	3,758	3,509	1,072	-	2,054	1,965	3,842	1,080
29	1,841	1,916	3,788	3,644	1,072	-	1,984	1,995	4,010	1,110
30	1,841	1,808	3,759	3,689	1,042	-	2,014	1,995	3,896	1,170

Ensaio	11	12	13	14	15	16	17
1	-	3,010	1,931	2,065	2,066	2,047	2,060
2	-	3,083	2,047	2,065	2,066	1,868	2,030
3	-	3,024	1,988	2,05	2,168	2,076	2,118
4	-	2,891	2,047	2,025	2,139	2,076	2,147
5	-	2,950	1,959	2,109	2,183	2,135	2,030
6	-	3,068	1,929	2,080	2,094	2,160	2,001
7	-	3,068	1,973	2,115	2,094	2,195	2,089
8	-	2,921	1,899	2,021	2,094	2,136	2,089
9	-	3,009	1,840	2,051	2,094	2,165	2,001
10	-	3,127	1,958	2,094	2,507	2,165	2,089
11	-	3,009	1,840	2,080	2,006	2,106	2,148
12	-	2,950	1,973	2,109	2,109	2,136	1,971
13	-	2,921	1,959	2,109	2,006	2,136	1,912
14	-	3,068	1,869	2,109	2,124	2,195	2,030
15	-	2,996	1,870	2,080	2,153	2,136	2,206
16	-	2,951	1,780	2,050	2,257	2,136	2,147
17	-	3,038	1,811	2,095	1,976	2,076	2,118
18	-	3,039	1,839	2,080	2,035	2,076	2,03
19	-	2,950	1,899	2,154	2,124	2,195	1,942
20	-	2,950	1,766	2,140	2,007	2,165	2,118
21	-	2,950	1,884	2,154	2,212	2,165	2,059
22	-	3,128	1,944	2,170	2,153	2,136	2,089
23	-	3,068	1,856	2,141	2,183	2,136	2,206
24	-	2,980	1,780	2,170	2,020	2,017	2,177
25	-	2,950	1,958	2,109	2,124	2,106	2,089
26	-	2,921	1,899	2,139	2,007	2,046	2,030
27	-	3,009	1,884	2,020	2,124	2,136	2,118
28	-	2,920	1,825	1,961	2,183	2,076	2,089
29	-	2,891	1,840	2,020	2,094	2,076	2,030
30	-	2,743	1,721	1,990	2,168	1,987	2,015

ANEXO VI – Valores obtidos nas medições dos ensaios Bioimpressora 4

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1,744	1,885	3,395	3,422	0,944	0,830	1,840	2,054	3,826	1,174
2	1,683	1,944	3,483	3,333	0,885	0,771	1,958	1,905	3,944	1,114
3	1,683	1,946	3,454	3,482	0,944	0,860	1,899	1,993	4,152	1,144
4	1,743	1,974	3,425	3,453	0,929	0,889	1,899	1,993	4,123	1,231
5	1,744	2,093	3,395	3,393	0,944	0,860	1,929	2,038	3,885	1,29
6	1,623	1,889	3,365	3,542	0,944	0,875	1,963	2,082	3,945	1,231
7	1,714	1,974	3,395	3,542	0,988	0,86	1,959	2,112	3,944	1,232
8	1,744	2,003	3,572	3,453	0,929	0,875	1,989	2,023	4,004	1,231
9	1,744	1,944	3,301	3,482	0,914	0,904	1,929	1,963	4,004	1,231
10	1,774	1,93	3,542	3,303	0,944	0,83	2,048	2,023	3,974	1,232
11	1,683	1,973	3,793	3,348	0,915	0,875	1,929	2,113	4,034	1,232
12	1,759	2,062	3,961	3,303	0,959	0,904	1,929	2,112	4,241	1,291
13	1,743	2,077	3,951	3,333	0,914	0,904	1,929	2,112	4,212	1,173
14	1,804	2,062	3,784	3,482	0,959	0,889	1,929	2,023	4,241	1,173
15	1,774	2,018	3,72	3,541	0,988	0,949	1,840	1,963	4,271	1,202
16	1,744	1,944	3,872	3,452	0,959	0,914	1,899	2,112	4,404	1,173
17	1,759	2,062	3,513	3,363	1,003	0,889	1,958	2,117	4,330	1,202
18	1,713	1,988	3,277	3,422	0,988	0,949	1,899	2,142	4,360	1,290
19	1,683	2,003	3,336	3,392	0,929	0,944	2,018	2,023	4,449	1,202
20	1,729	1,914	3,306	3,512	0,944	0,949	2,019	2,023	4,212	1,188
21	1,834	1,974	3,218	3,542	1,062	0,949	1,958	1,963	3,974	1,129
22	1,713	1,973	3,454	3,601	1,003	0,949	1,984	1,874	4,004	1,246
23	1,744	1,900	3,542	3,661	1,077	0,949	1,958	2,053	3,915	1,187
24	1,724	1,944	3,395	3,601	1,091	1,008	2,048	2,008	3,944	1,217
25	1,598	1,915	3,306	3,631	1,047	0,978	1,959	1,963	4,034	1,159
26	1,653	1,886	3,306	3,601	1,077	1,008	1,958	1,963	4,212	1,158
27	1,684	1,885	3,396	3,631	1,018	0,920	1,929	2,291	4,212	1,100
28	1,623	1,885	3,425	3,72	1,047	0,949	2,048	2,142	4,123	1,099
29	1,713	1,856	3,513	3,601	1,003	0,964	2,048	1,934	3,944	1,100
30	1,659	1,738	3,424	3,573	0,993	0,860	1,884	1,933	3,797	1,041

Ensaio	11	12	13	14	15	16	17
1	-	2,410	1,743	1,928	1,967	2,000	2,021
2	-	2,325	1,802	2,047	2,086	2,089	2,111
3	-	2,531	1,832	2,047	2,028	2,178	2,080
4	-	2,375	1,802	2,121	2,086	2,268	2,051
5	-	2,501	1,797	2,092	2,116	2,059	2,050
6	-	2,415	1,832	2,092	2,087	2,059	2,081
7	-	2,440	1,832	2,077	2,087	2,149	2,110
8	-	2,471	1,832	2,101	2,087	2,059	2,080
9	-	2,531	1,891	2,136	2,057	2,090	2,080
10	-	2,411	1,802	2,106	2,086	2,179	2,096
11	-	2,501	1,891	2,077	2,176	2,208	1,977
12	-	2,320	1,876	1,988	2,087	2,119	2,199
13	-	2,440	1,861	2,092	2,117	2,089	2,171
14	-	2,440	1,772	2,077	2,176	2,091	2,214
15	-	2,470	1,832	1,988	2,118	2,000	2,050
16	-	2,471	1,832	2,082	2,057	2,059	2,110
17	-	2,531	1,714	2,078	2,146	2,059	2,080
18	-	2,501	1,891	2,077	2,116	2,179	1,962
19	-	2,531	1,802	2,077	2,087	2,089	2,021
20	-	2,471	1,832	2,047	2,146	2,090	2,022
21	-	2,531	1,832	2,136	2,146	2,149	2,169
22	-	2,561	1,802	2,077	2,057	2,029	2,244
23	-	2,621	1,861	2,047	2,030	2,178	2,200
24	-	2,380	1,802	2,047	1,997	2,208	2,199
25	-	2,531	1,861	2,107	2,057	2,149	2,230
26	-	2,501	1,832	1,988	2,057	2,119	2,199
27	-	2,501	1,802	2,047	2,057	2,119	2,319
28	-	2,591	1,713	2,106	2,027	2,119	2,288
29	-	2,576	1,802	2,047	1,938	2,090	2,081
30	-	2,501	1,728	2,047	1,938	2,014	2,260