

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DE IMPRESSOS DE ALGINATO E GELATINA UTILIZANDO A
BIOIMPRESSORA ALLEVI 2

Laura Duarte Guimarães

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Fevereiro - 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DE IMPRESSOS DE ALGINATO E GELATINA UTILIZANDO A
BIOIMPRESSORA ALLEVI 2

Laura Duarte Guimarães

Letícia de Souza Castro Filice

Márcia Mayumi Omi Simbara

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Fevereiro - 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DE IMPRESSOS DE ALGINATO E GELATINA UTILIZANDO A
BIOIMPRESSORA ALLEVI 2

Laura Duarte Guimarães

Leticia de Souza Castro Filice
Faculdade de Medicina - FAMED

Márcia Mayumi Omi Simbara
Faculdade de Engenharia Elétrica - FEELT

Homologado pela Coordenação do Curso
de Biotecnologia em ____/____/____

Nilson Nicolau Junior

Uberlândia - MG

Fevereiro - 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO DE IMPRESSOS DE ALGINATO E GELATINA UTILIZANDO A
BIOIMPRESSORA ALLEVI 2

Laura Duarte Guimarães

Aprovado pela Banca Examinadora em: ____/____/____ Nota: ____

Letícia de Souza Castro Filice

Uberlândia, ____ de ____ de ____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à professora Dra. Letícia de Souza Castro Filice pela oportunidade de ter me orientado neste trabalho de conclusão de curso, por ter confiado tamanha responsabilidade e acreditado na minha capacidade, mesmo se tratando de um assunto desafiador. Agradeço também à minha coorientadora, a professora Dra. Márcia Mayumi Omi Simbara, por todo o apoio durante os experimentos, pelo conhecimento compartilhado, pela disponibilidade em sanar dúvidas e por todo o carinho que teve comigo.

Agradeço aos meus pais Amós e Roma por todo o incentivo à educação desde a infância até os dias atuais, por terem acreditado no meu potencial desde muito antes do ingresso na vida acadêmica. Ao meu irmão Amós Filho pela parceria nos esportes, séries e momentos de lazer. Ao meu cachorro Willy que demonstrou amor incondicional e disposição para brincar e me divertir em todos os momentos. Às minhas tias Marli e Cintia, e à minha avó Maria por terem sentido tanto orgulho e confiado que eu estava sempre dando o melhor de mim.

Agradeço às minhas amigas Rayane, Larissa e Natália pela amizade de tantos anos, às minhas amigas Kênia, Lúrian, Maria Paula e Leh pelo companheirismo nas disciplinas do curso e pela consideração fora dele. Aos meus amigos do laboratório e integrantes do GEP-CT, Loyna, Lucas e Gabriela pela ajuda nos momentos difíceis e por terem sempre se mostrado disponíveis para me ajudar. À graduanda da Engenharia Biomédica Melyssa, e ao graduando em Medicina Felipe dos Anjos, agradeço pela disposição e colaboração durante todo o processo de aprendizado e escrita deste trabalho. Agradeço à professora Dra. Vivian Alonso Goulart por todas as oportunidades oferecidas e pelo acolhimento no grupo de estudos e no Laboratório de Nanobiotecnologia. Às minhas amigas Jéssica e Mirella pela diversão, companheirismo e aprendizado durante nosso tempo em Porto Alegre. Agradeço ainda ao

peçoal do Instituto de Pesquisa com Células-Tronco da UFRGS pela recepção e hospitalidade durante o estágio.

Agradeço por fim ao meu namorado Rafael, que me aturou reclamando e chorando em tantos momentos difíceis, me ajudou de diversas formas, acredita e me incentiva em todos meus projetos pessoais e profissionais e me faz sentir querida e amada todos os dias.

RESUMO

A bioimpressão 3D baseia-se nos princípios da impressão 3D convencional, porém pode ser empregada na construção de componentes que mimetizam tecidos graças à inserção de células e fatores de crescimento. Isso permite reproduzir sua fisiologia *in vitro* e, eventualmente, implantar impressos *in vivo*, possibilitando diversas aplicações na medicina regenerativa. Existem variadas técnicas de bioimpressão 3D e tipos de materiais, destacando-se os hidrogéis. O objetivo deste trabalho foi avaliar a printabilidade de um hidrogel de alginato e gelatina, então foram realizados testes iniciais de impressão com gel à base de acrilato, seguidos da impressão e análise da blenda de alginato e gelatina, em formas de cilindros, paralelepípedos e prismas em triplicata, utilizando a bioimpressora 3D Allevi 2. Observou-se grande variação nos eixos X, Y, Z, áreas da base, perímetros, circularidades e arredondamentos entre as amostras, justificada pelas características reológicas dos materiais utilizados. Além disso, verificou-se que parâmetros como pressão e temperatura podem representar futuros desafios no emprego de células. A bioimpressão 3D deve ser melhor estudada, considerando a importância da sua contribuição para a medicina regenerativa.

Palavras-chave: Bioimpressão 3D, Hidrogéis, Medicina regenerativa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	7
3. OBJETIVOS	7
3.1. OBJETIVO GERAL	7
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	8
4.1. PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS	8
4.2. IMPRESSÃO DOS CONSTRUTOS	8
4.3. ANÁLISE DOS CONSTRUTOS	9
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
5.1. TESTES INICIAIS	10
5.2. ANÁLISE DO TEMPO DE RETICULAÇÃO	13
5.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS IMPRESSOS	15
6. CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa é um ramo interdisciplinar de grande importância para a medicina, e que visa reconstituir lesões difíceis de serem restabelecidas, como queimaduras graves e feridas crônicas (escaras), por meio da regeneração de tecidos e órgãos. Para tanto, são utilizadas diversas ferramentas biotecnológicas, como terapia celular, biomateriais, células tronco, entre outras (COELHO, 2013). Uma tecnologia que tem ganhado destaque nesse campo é a bioimpressão 3D, que é definida como a deposição precisa e acurada de materiais biocompatíveis, juntamente com células, dentro de um espaço pré-desenhado usando uma impressora auxiliada por computador. É uma técnica baseada nos princípios da impressão 3D convencional, mas que, ao implementar componentes biológicos como células e fatores de crescimento, permite a aplicação em diversos campos da medicina regenerativa (TARASSOLI, 2021).

A produção de tecidos *in vitro* permite mimetizá-los fora do corpo para avaliar o crescimento do tecido antes da implantação, bem como suas características físicas. Então, com a posterior implantação no corpo, são capazes de suportar suas habilidades nativas de autocura e promover a renovação celular e tecidual das regiões danificadas (MATAI, 2020). Estratégias como essas compõem parte da engenharia de tecidos, uma área da medicina regenerativa que se concentra em restaurar a funcionalidade do tecido para o corpo e integrar campos importantes da medicina e da biologia celular (HAN, 2020).

A primeira referência a um processo semelhante à bioimpressão data de 1988, quando Klebe demonstrou uma tecnologia que chamou de *cytoscribing*. Nessa técnica, uma impressora de jato de tinta Hewlett-Packard (HP) comum foi adaptada e utilizada para depositar células em uma superfície plana. Já em 1999, Odde e Renn foram os primeiros a realizar a bioimpressão a laser em estruturas com superfícies complexas. Desde então, foram

relatados diversos avanços, incluindo a "3D-Biplotter" desenvolvida por Landers *et al.* (2002), a bioimpressora de estereolitografia (SLA) desenvolvida por Wilson e Boland (2004) e a primeira impressão de tecido formado exclusivamente por células, também em 2004 (GU *et al.*, 2020). Já na última década, Noor *et al.* (2019) desenvolveram um coração perfusível em escala reduzida, e Lee *et al.* (2019) imprimiram corações perfusíveis de colágeno em diversas escalas a partir da técnica conhecida como *freeform reversible embedding of suspended hydrogels* (FRESH).

Uma grande vantagem da bioimpressão 3D é que ela permite a deposição precisa e uniforme das células quando comparada à semeadura manual, uma vez que a distribuição mais heterogênea das células, tipicamente obtida manualmente, pode levar a um crescimento tecidual irregular e/ou maiores taxas de morte celular (GUNGOR-OZKERIM, 2018). Além disso, possibilita que biomateriais e sinais bioativos sejam depositados em um espaço tridimensional definido para imitar o tecido nativo que se pretende substituir (ONG, 2018) e não exclui a possibilidade de utilizar células-tronco indiferenciadas do próprio paciente, o que reduz o risco de rejeição na implantação *in vivo* (IRVINE, 2016).

Embora estudos relacionados às técnicas de bioimpressão sejam realizados há décadas, suas práticas ainda são relativamente novas e estão em fase de desenvolvimento, e diversos conceitos são de extrema importância para a compreensão do tema. Entre eles, merece destaque a definição de *scaffold*, ou arcabouço, que consiste em uma estrutura feita de um biomaterial com objetivo de mimetizar a matriz extracelular (MEC), e que atua como suporte estrutural para preencher um vazio tecidual na área de interesse. Ao inserir células em sua estrutura, espera-se que o *scaffold* demonstre capacidade de promover a diferenciação e o crescimento celular, permitindo a regeneração do tecido nativo (CADDEO, 2017; MHANNA, 2017; SAINI, 2021). Para a elaboração desse arcabouço, diversas opções de materiais podem ser utilizadas, entre as quais se destacam os hidrogéis.

Tais componentes representam um grupo de materiais caracterizados por redes tridimensionais de polímeros altamente hidratados, e que podem ser de origem biológica ou sintética (HUANG, 2017). Os hidrogéis ideais devem possuir boa biocompatibilidade, bom comportamento reológico e capacidade de reticulação rápida (GAO, 2018), uma característica essencial na bioimpressão 3D, pois permite a transformação do líquido viscoso em um colóide capaz de reter a forma desejada (CARPIO, 2021; MONCAL, 2019).

Um exemplo de destaque é o alginato, que é um polissacarídeo natural obtido a partir de algas marrons, carregado negativamente e que normalmente não induz resposta inflamatória significativa *in vivo*. Ele tem capacidade de reter água por capilaridade, o que permite sua difusão e torna o material ideal para uma biotinta, uma formulação de células aplicada à bioimpressão 3D que pode conter componentes biologicamente ativos e biomateriais. Vale citar também a gelatina, que pode ser obtida pela decomposição enzimática do colágeno ou por tratamento com ácido. Sua gelificação é termorreversível, e passa pela transição sólido-gel a 35,8 °C. Isso permite modular a impressão 3D, bem como a produção de *scaffolds* carregados com células (DERNOWSEK, 2019).

Misturas físicas (blendas) de hidrogéis de alginato e gelatina mostram-se eficientes para bioimpressão 3D, devido ao efeito somatório das características de cada um: ao passo que os hidrogéis de alginato apresentam mais viscosidade, os hidrogéis de gelatina são altamente elásticos (GAO, 2018), e a combinação dessas qualidades é particularmente atraente para a mimetização de um tecido celular. Mas, de fato, para se adequar a uma ampla gama de materiais com características particulares, diversos métodos de bioimpressão podem ser empregados. As técnicas atualmente existentes são divididas em três categorias: baseadas em gotículas (ou jato de tinta), baseadas em extrusão, e técnicas baseadas em laser (BRAND, 2019). Existem ainda autores como Foyt *et al.* (2018) que classificam a estereolitografia como uma categoria à parte, como ilustrado na Figura 01.

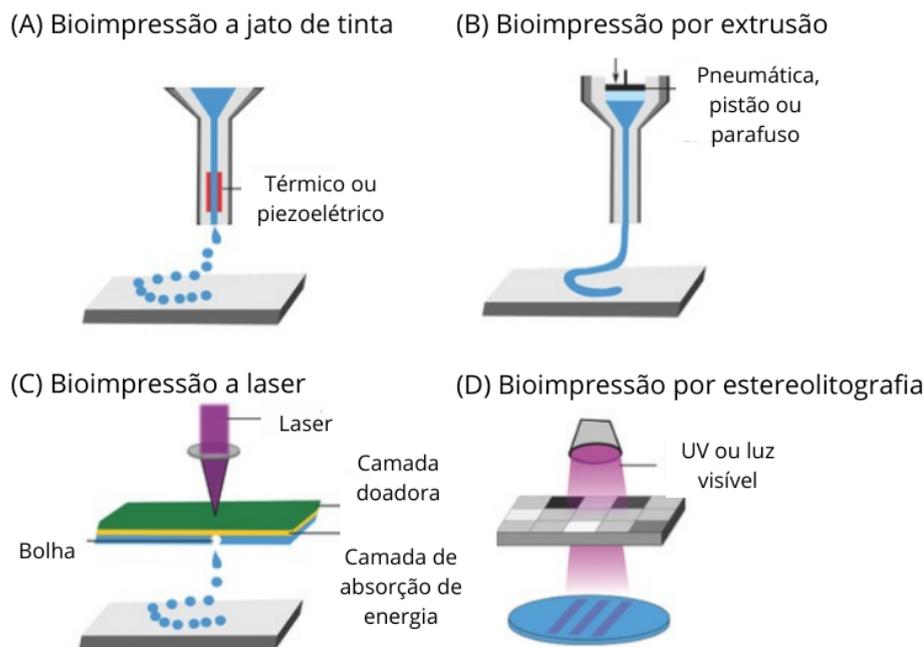


Figura 01: Exemplos de diferentes métodos de bioimpressão. (A) Bioimpressão a jato de tinta. (B) Bioimpressão de extrusão. (C) Bioimpressão a laser. (D) Bioimpressão por estereolitografia. Imagem adaptada de Foyt *et al.* 2018.

A bioimpressão a jato de tinta (Fig. 1A) funciona sem que haja contato da bioimpressora com a mesa. Nessa técnica, a biotinta líquida é carregada no bico e as gotículas são cuidadosamente depositadas na superfície da mesa impressora (LI, 2016). É um processo de alta resolução e permite produção em maior escala, porém é necessário que o material utilizado possua baixa viscosidade para não entupir a agulha de impressão. Isso pode acarretar em uma fragilidade estrutural do impresso que pode necessitar de posterior reticulação (XING, 2020).

Já a bioimpressão baseada em extrusão (Fig. 1B) é a forma mais comum de bioimpressão e utiliza compressões mecânicas ou pressão pneumática para ejetar continuamente a biotinta do bico e depositá-la camada por camada (XING, 2020). É possível utilizar biotintas com viscosidades mais altas, com maiores densidades celulares, criar construções 3D mais estáveis, além de ser uma técnica de baixo custo (TAN, 2021). Todavia,

existem desvantagens como o ainda existente risco de entupir o bico extrusor, resolução mais baixa em relação aos outros métodos e pode ocorrer estresse ou morte celular devido à força da pressão (VIJAYAVENKATARAMAN, 2018; GRIFFITH, 2002; KANG, 2017).

Por outro lado, a bioimpressão baseada em laser (Fig. 1C) usa um laser monocromático, pulsado ou contínuo, para iluminar uma fita contendo a biotinta e uma camada fotoabsorvente, resultando na criação do construto 3D. Esse processo permite alta resolução, viabilidade e densidade celular, além de rápida impressão (VIJAYAVENKATARAMAN, 2018), apesar dos altos custos de manutenção e dos riscos de danos celulares causados pela energia do laser (KHODA, 2013). A estereolitografia (Fig. 1D), por sua vez, é uma técnica que utiliza luz ultravioleta (UV) ou luz visível para curar polímeros fotossensíveis. Ela não possui bicos, o que elimina a pressão de cisalhamento nas células, que está presente nas técnicas que possuem os bicos, além de oferecer boa resolução (KAČAREVIĆ, 2018).

Independente da técnica empregada, as bioimpressoras realizam a impressão 3D a partir da digitalização de estruturas já existentes ou de modelos projetados em CAD (*Computer Aided Design*), que correspondem ao formato tridimensional do arquivo. A partir deles, chega-se à fase final, na qual o equipamento une os materiais empregados camada por camada (HAN, 2018). Para que se chegue a essa construção, no entanto, são necessárias diversas etapas, que têm por finalidade adequar o modelo digital ao que se espera do construto final.

A primeira etapa é a digitalização ou a elaboração do modelo tridimensional a ser impresso, o que pode ser feito por meio de *softwares* CAD, como AutoCAD, Inventor CAM, SketchUp, SolidWorks e Tinkercad (PORTELA, 2021). Em seguida, é necessário realizar o fatiamento do arquivo, o que permite a modulação de fatores como a espessura (em mm) de

cada camada a ser impressa, dimensões desejadas e o tempo gasto na impressão. Nesse momento, também é feita a conversão do arquivo para o formato *G-code*, que é a linguagem de programação utilizada em impressões 3D. O *G-code* dita as coordenadas nas quais a impressora deve se posicionar para a execução dos movimentos, a temperatura do extrusor e velocidade de impressão. Alguns dos principais *softwares* utilizados para realizar esse fatiamento são o Cura 3D, Simplify3D, IdeaMaker, Slic3r e Repetier (LOCKER, 2021). Após a obtenção do *G-code*, é feito o *upload* do arquivo na bioimpressora 3D e inicia-se de fato a fabricação do objeto.

Apesar de a bioimpressão 3D ser uma área em expansão, ainda existem diversos desafios tecnológicos, biológicos, químicos e físicos. Dentre esses, podemos citar a falta de *softwares* CAD específicos para modelagens biológicas, a complexidade envolvida em mimetizar a matriz extracelular, vascularização e angiogênese, além da necessidade de que os biomateriais sejam biocompatíveis, biodegradáveis, tenham estruturação e comportamentos reológicos adequados quando extrudados pela bioimpressora (DERNOWSEK, 2019). Sendo a reologia responsável por avaliar as deformações, escoamentos da matéria, e características como viscosidade, plasticidade e elasticidade (MARTIN, 1993).

Apesar disso, o investimento privado na tecnologia parece não acompanhar a velocidade da pesquisa. Em termos de publicações científicas, observa-se uma tendência de aumento exponencial no número de textos, sendo cerca de 6900 em 2022 e mais de 250 a serem publicados até fevereiro de 2023, sendo que a maioria delas é de artigos originais (54,8%), seguido de artigos de revisão (31,6%), trabalhos publicados em anais de evento (6,2%) e capítulos de livro (5,8%) (FAVARETO, 2023). Já em termos de mercado, o Brasil atualmente conta com apenas 11 empresas e startups relacionadas à bioimpressão 3D (FAVARETO, 2023). Esse valor representa um aumento considerável em relação aos anos anteriores, mas cujo número absoluto ainda é pequeno.

Relativamente aos modelos de bioimpressora disponíveis, a Allevi 2 mostra-se interessante para utilização em pesquisa de bioimpressão 3D. Trata-se de uma bioimpressora 3D com dois bicos de extrusão pneumática com pressão de até 120 PSI, controle térmico partindo da temperatura ambiente até 160 °C e LEDs para fotopolimerização em luz visível ou ultravioleta, possibilitando a reticulação e utilização de uma gama de materiais (ALLEVI, 2022). Ela abrange, portanto, uma série de elementos úteis ao emprego de biomateriais com características diversas, sendo possível realizar a fabricação de construtos de alginato e gelatina.

2. JUSTIFICATIVA

A bioimpressão 3D é uma área de estudo inovadora e promissora, que busca utilizar seus conhecimentos interdisciplinares para aprimorar biotecnologicamente a medicina. No entanto, a produção de *scaffolds* e estruturas que mimetizam a fisiologia humana ainda é desafiadora, lenta, de elevado custo e com protocolos de difícil execução e reprodutibilidade limitada, apesar de ser uma área que se encontra em expansão. Uma vez que, para a utilização de células, o domínio prévio das técnicas de impressão com os biomateriais é essencial, a análise dos impressos de alginato e gelatina produzidos com a bioimpressora 3D “Allevi 2” poderá contribuir para o posterior desenvolvimento de estruturas biomiméticas de pele, por exemplo, e para a medicina regenerativa como um todo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a printabilidade do alginato e da gelatina a partir da bioimpressora Allevi 2, visando seu futuro uso como parte de uma biotinta para regeneração dérmica aplicada à engenharia tecidual.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ganhar familiaridade com a operação da bioimpressora por meio de testes iniciais utilizando gel à base de acrilato;
- Imprimir construtos utilizando uma blenda de alginato e gelatina.
- Avaliar a qualidade da impressão em diferentes formas e tamanhos.
- Verificar as aplicações e limitações da impressão utilizando a Allevi 2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS

O gel à base de acrilato (Kanechom) utilizado nos primeiros testes é de uso comercial e foi obtido pronto. Para o preparo do hidrogel, a gelatina de pele bovina tipo B (Sigma-Aldrich) e o alginato de sódio de baixa viscosidade (Sigma-Aldrich) foram pesados separadamente em béqueres, dissolvidos em PBS 1x (*Phosphate-buffered saline*) a 60°C na concentração de 5% (m/v) e 3% (m/v), respectivamente, cobertos com plástico filme e homogeneizados sob agitação magnética por 24h, conforme recomendado pela Allevi. A seguir, ambas as soluções foram misturadas em uma proporção de 1:1, agitadas por mais 30 minutos, fracionadas em seringas de plástico de 10 mL e armazenadas a 4°C. Para o preparo da solução de reticulação na concentração de 1% (m/v), o CaCl₂ (99%, Sigma) foi pesado em uma balança analítica, e transferido para um frasco reagente de vidro contendo água destilada, agitou-se até a diluição completa.

4.2. IMPRESSÃO DOS CONSTRUTOS

Para a realização dos primeiros testes com a bioimpressora 3D, foi utilizado gel comercial à base de acrilato. Por meio da interface *online* da bioimpressora, foram

programados parâmetros técnicos para a realização das primeiras impressões, a saber: pressão do ar comprimido de 40 PSI, velocidade de impressão 6 mm/s e temperatura ambiente (21°C). A pressão utilizada foi determinada após diversas tentativas com pressões diferentes, tendo em vista que o gel de acrilato não é tipicamente empregado em bioimpressoras, e foi aqui utilizado meramente como material de teste. Não foi possível, portanto, encontrar referências na literatura ou no manual do fabricante. Os modelos de impressão consistiram em cilindros e cubos, ambos com 10 mm de altura e de largura, já disponibilizados na interface da Allevi, e um arquivo tridimensional externo, feito na plataforma Tinkercad, com as letras “GEP” impressos no centro de uma placa de Petri de plástico posicionada na área demarcada sobre a mesa de impressão.

Após o domínio da técnica de operação, fez-se a modelagem tridimensional dos construtos pela plataforma Tinkercad, seguido do upload dos arquivos em formato .stl para a interface da bioimpressora. Por sua vez, os arquivos foram impressos com parâmetros ajustados conforme as observações feitas durante as impressões de teste, a fim de que fosse avaliada a viabilidade da impressão dos construtos. As formas impressas foram cilindros, paralelepípedos e prismas de base triangular, todos em dois tamanhos, com as dimensões de 10x10x3 mm e 20x20x3 mm nos eixos X, Y e Z, respectivamente, em triplicata (para cada forma e tamanho). A coordenada X é medida ao longo do eixo Leste-Oeste, a coordenada Y é medida ao longo do eixo Norte-Sul, formando um plano, e a coordenada Z mede a altura ou elevação de um objeto tridimensional. Para a realização das impressões, utilizou-se uma agulha de calibre 26,5G e pressão de 35 PSI.

4.3. ANÁLISE DOS CONSTRUTOS

A reticulação da blenda foi cronometrada e avaliada nos tempos 0, 10, 30, 60, 120 e 180 minutos em um cilindro de cada um dos dois tamanhos utilizados. A seguir, foram

avaliados os aspectos morfológicos dos demais impressos, como manutenção das dimensões e da forma. Para isso, cada um deles foi fotografado com vista superior e lateral com um telefone celular Samsung Galaxy A21s e utilizou-se o *software* gratuito ImageJ para a análise dos eixos X, Y e Z dos construtos, e para se obter valores referentes à área da base (A_b), perímetro (P), circularidade (C) e arredondamento (R) de cada um dos impressos, além de valores ideais, médias e desvios padrão obtidos de cada forma. A circularidade e arredondamento diferenciam-se, uma vez que a circularidade mensura o quão próxima a forma analisada está de um círculo ideal, a partir das distâncias dos pontos do perímetro em relação ao centro. Já o arredondamento é definido pela fórmula matemática a seguir (ImageJ, 2023):

$$R = \frac{4 \cdot \text{área}}{\pi \cdot \text{sqr}(\text{eixo maior})}$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TESTES INICIAIS

A bioimpressora Allevi 2 possui componentes importantes para o seu funcionamento, que são o roteador Wi-Fi e o compressor de ar (Figura 02), considerando que a bioimpressora possui interface online e mecanismo pneumático. Essa interface é composta por um painel geral de configurações, sendo elas: plataforma de impressão, seleção do arquivo, calibração dos eixos extrusores, controle de temperatura, pressão e reticulação (Figura 03). A interface permite ainda que sejam selecionados parâmetros como o tipo de preenchimento do construto e velocidade de impressão (mm/s).

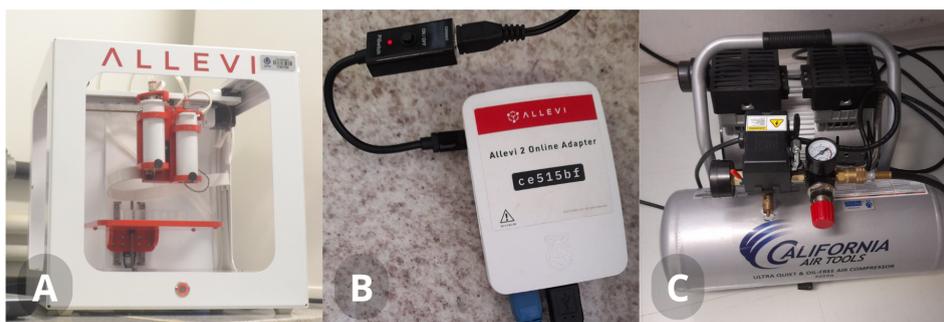


Figura 02: Componentes da bioimpressora. (A) Bioimpressora. (B) Roteador Wi-Fi. (C) Compressor de ar.
Fonte: Autoria própria.

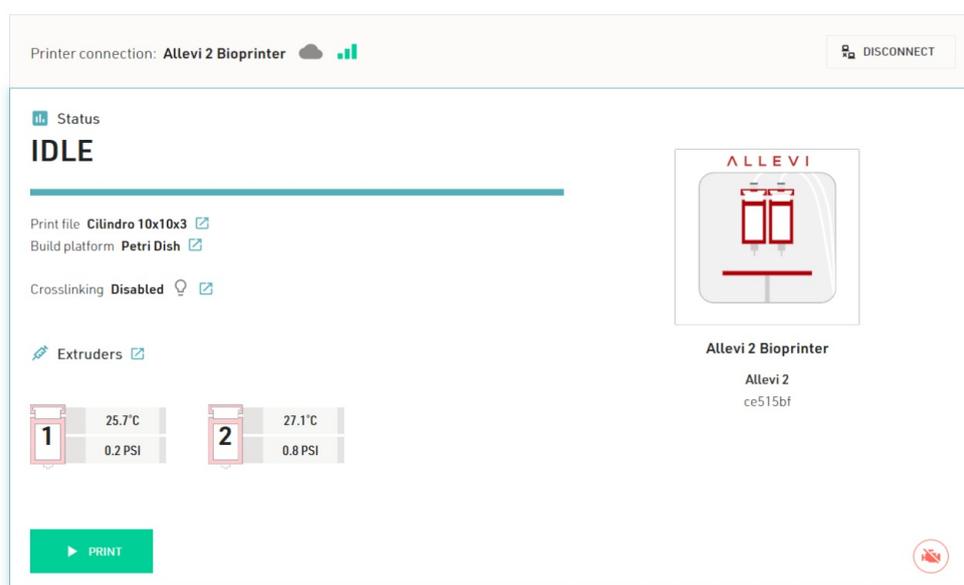


Figura 03: Painel de configurações de impressão da Allevi 2.

Impressoras 3D em sua maioria trabalham com a linguagem *G-code*, que dita as coordenadas a serem seguidas pela máquina. No entanto, a Allevi proporciona uma experiência facilitada ao usuário, permitindo o upload do arquivo tridimensional em formato .stl sem que haja necessidade de fatiamento prévio. Apesar da proposta de praticidade que a fabricante ofereceu, observou-se durante este trabalho que a interface online da bioimpressora apresenta lentidão e falhas no carregamento da impressão quando há instabilidade na rede, além de tornar inviável a produção de construtos caso não haja internet.

Também chama a atenção o fato de a bioimpressora Allevi 2 não possuir ambiente de impressão estéril, como mostrado na Figura 2A, o que é possível e já foi realizado por alguns

fabricantes. A empresa suíça RegenHU, no modelo R-GEN 200, fez a modelagem da bioimpressora já dentro de uma cabine de fluxo, garantindo segurança biológica classe 2, e a empresa brasileira 3D Biotechnology Solutions, no modelo GENESIS, o qual possui cabine fechada com ambiente estéril, necessário para o emprego de células. Embora representem boas opções, existem fatores como grande espaço físico a ser utilizado exclusivamente pelo equipamento ou elevado custo para compra.

Na tentativa de solucionar o problema da falta de esterilidade em algumas bioimpressoras, há pesquisadores que utilizam a máquina no interior de uma cabine de fluxo laminar, como realizado por Cubo *et al.* (2018) e demonstrado por Thayer *et al.* (2018). Além disso, o ambiente fechado seria útil para promover uma manutenção da temperatura em conjunto com um sistema de termostato, tanto para o aquecimento quanto para o resfriamento da mesa de impressão, que mostraria-se importante nos trabalhos com gelatina. Outras melhorias a serem consideradas no equipamento seriam a ligação direta da bioimpressora com um computador e a opção de baixar um aplicativo de operação da máquina, o que permitiriam a realização das impressões sem conexão via internet.

Os testes realizados com o gel à base de acrilato foram essenciais para compreender o funcionamento da máquina, bem como a prática necessária para a realização de impressões com formas variadas e/ou mais complexas. O gel de acrilato mostra-se uma alternativa barata e com boa reologia para testes iniciais, considerando que ele possui uma viscosidade suficientemente alta para retenção da forma sem causar o entupimento da agulha extrusora.

O cilindro e o cubo de 10 mm já disponibilizados pela Allevi foram impressos sem preenchimento e com preenchimento, respectivamente. Fez-se ainda o upload de um arquivo externo contendo a sequência de letras “GEP” (Figura 04). O cubo preenchido teve uma maior deformação em relação às outras formas, possivelmente pelo maior peso que o construto

exerce sobre si mesmo, considerando que o gel de acrilato não foi reticulado. Entretanto, todas as formas impressas demonstraram que esse gel é estável o suficiente para realização de consecutivas impressões para o aprendizado do usuário.

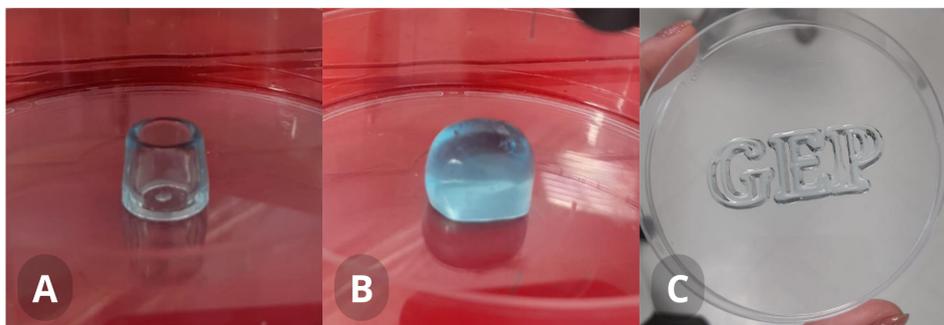


Figura 04: Formas variadas impressas com gel à base de acrilato. (A) Cilindro de 10 mm sem preenchimento. (B) Cubo de 10 mm com preenchimento. (C) Texto “GEP”.

5.2. ANÁLISE DO TEMPO DE RETICULAÇÃO

O tempo de reticulação foi cronometrado em um dos cilindros de 10x10x3 mm e em um de 20x20x3 mm, que foram imersos em solução de CaCl_2 imediatamente após o término da impressão. No cilindro menor, como as linhas da grade do preenchimento interno ficaram bem próximas, elas se misturaram, formando uma estrutura sólida (Figura 05). Já no cilindro maior, foi possível visualizar a grade de preenchimento à medida que o alginato foi reticulado pela solução de CaCl_2 , como observado na Figura 06. A partir das figuras, nota-se ainda que a integridade das grades no cilindro maior pode ter contribuído para uma reticulação mais rápida e uniforme no interior em relação ao cilindro menor.

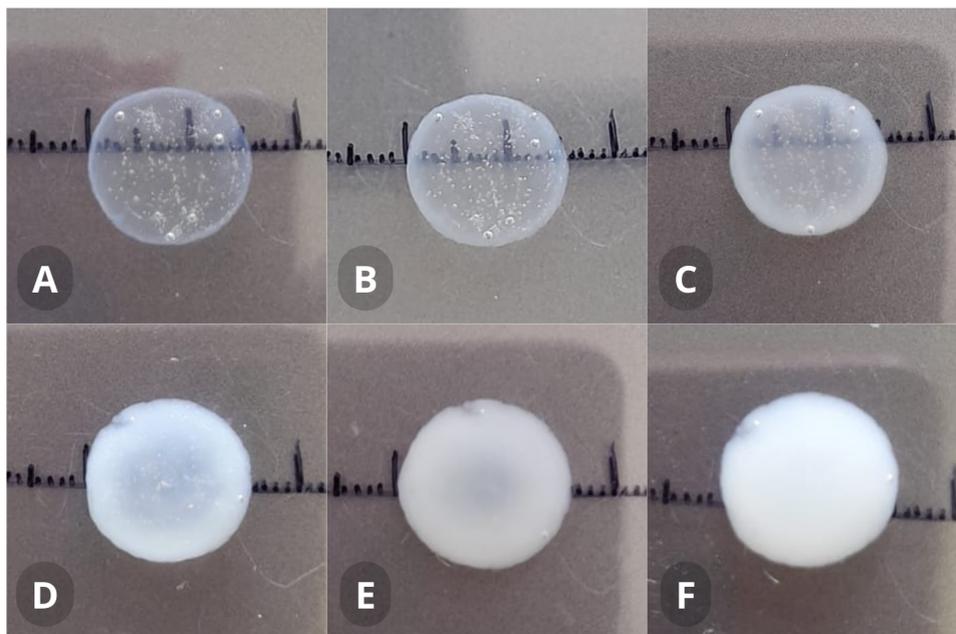


Figura 05: Tempo de reticulação no cilindro 10x10x3 mm. (A) tempo zero. (B) 10 min. (C) 30 min. (D) 60 min. (E) 120 min. (F) 180 min.

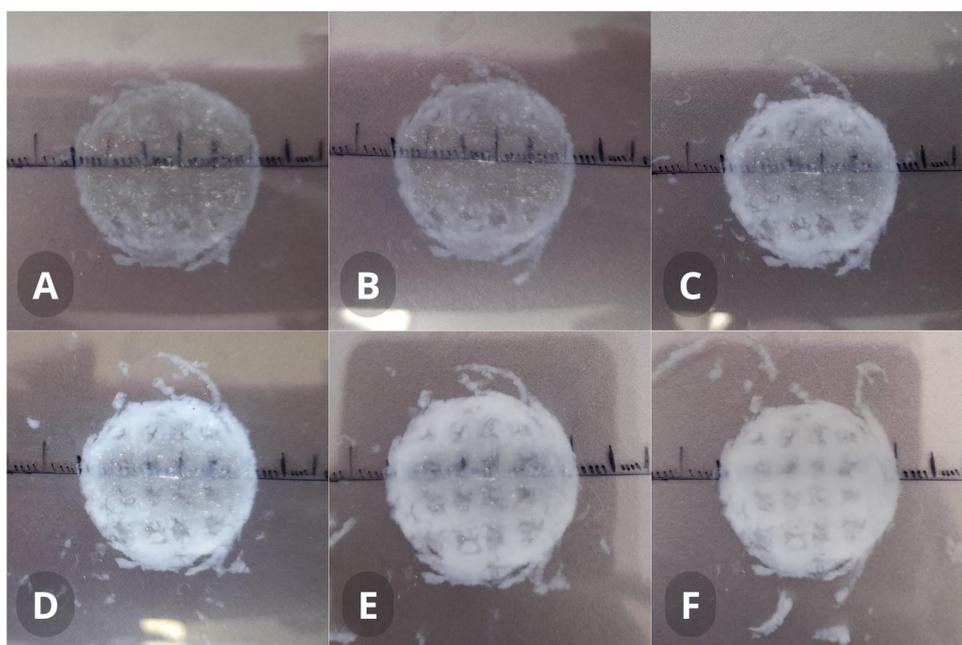


Figura 06: Tempo de reticulação no cilindro 20x20x3 mm. (A) tempo zero. (B) 10 min. (C) 30 min. (D) 60 min. (E) 120 min. (F) 180 min.

Vale ressaltar que o alginato, quando reticulado com o cátion Ca^{2+} , forma ligações iônicas, ao contrário da gelatina, cujas ligações são fracas e podem ser facilmente desfeitas com o aumento da temperatura. Considerando que o tempo de imersão tende a aumentar a

ocorrência de ligações cruzadas no alginato e que o grau de reticulação interfere em propriedades como viscosidade e elasticidade do substrato, ele pode também modular comportamentos celulares fundamentais, como trocas de nutrientes e a comunicação celular (FOYT, 2018; MIREK, 2022). Tendo isso em vista, o tempo de imersão pode variar de acordo com a aplicação final e a necessidade de estabilidade estrutural do construto em cada caso. Como exemplo, autores como Peng *et al.* (2022) e Niu *et al.* (2022) deixaram seus construtos em processo de reticulação por apenas 5 min e 30 min, respectivamente, visando aplicações na engenharia de tecidos.

5.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS IMPRESSOS

Os construtos de alginato e gelatina foram impressos utilizando uma agulha de 26,5G, pressão de 35 PSI e temperatura ambiente (21°C) e o formato ideal dos construtos está representado na Figura 07. Foi possível observar que todas as formas estavam fiéis em seus tamanhos e dimensões durante as primeiras camadas de impressão (Figura 08), mas com o aumento das camadas no eixo Z e conforme os construtos foram preenchidos houve uma deformação considerável em todos. Assim como relatado por Ribeiro *et al.* (2017), percebe-se que a fidelidade das formas impressas utilizando hidrogéis é desafiadora e seu estudo contribui fortemente para a bioimpressão 3D.

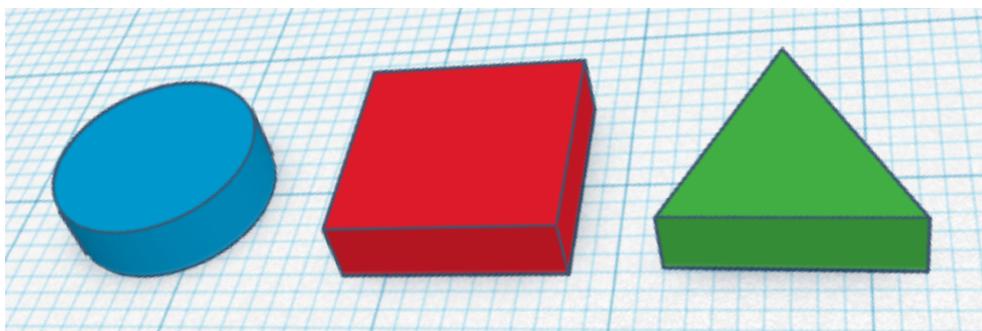


Figura 07: Imagem ilustrativa de cilindro, paralelepípedo e prisma de base triangular ideais

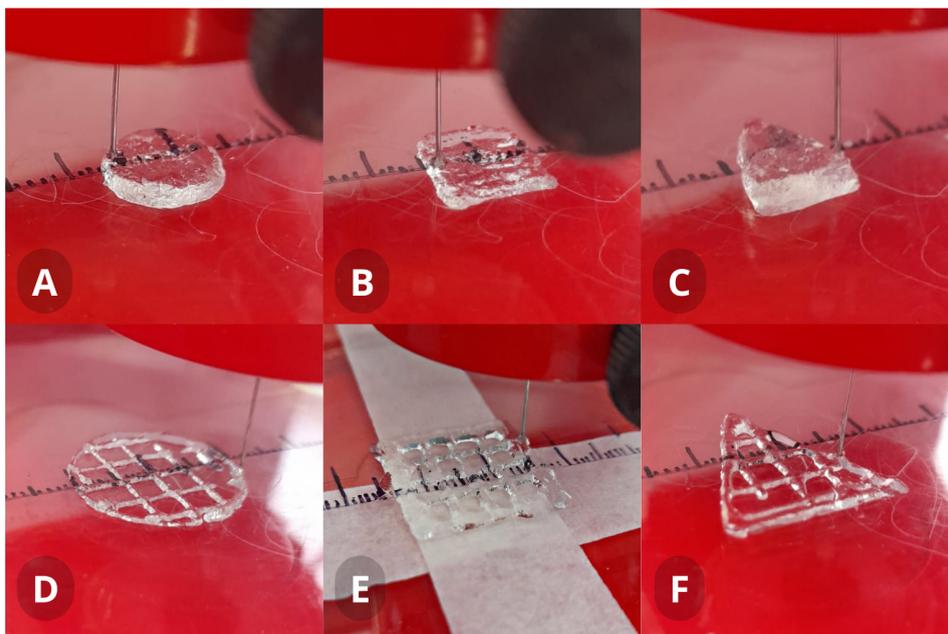


Figura 08: Formas variadas em suas primeiras camadas de impressão. (A) Cilindro 10x10x3 mm. (B) Paralelepípedo 10x10x3 mm. (C) Prisma de base triangular 10x10x3 mm. (D) Cilindro 20x20x3 mm. (E) Paralelepípedo 20x20x3 mm. (F) Prisma de base triangular 20x20x3 mm.

Entre os objetos menores, os cilindros de 10x10x3 mm foram os mais fiéis quanto à forma, mantendo circularidade (C) e arredondamento (R) médio de 0,95 e 0,96, respectivamente, enquanto o valor referência é 1,00 para ambas as medidas (Tabela 01).

A deformação média nos eixos X, Y e Z foi de 4,13 mm, 3,18 mm e 4,21 mm, respectivamente, representando uma alteração de quase 37% nos eixos X e Y e superior a 140% no eixo Z, o que sugere que a deposição de material pela bioimpressora foi superior ao esperado, tornando as camadas mais espessas. A deposição exacerbada do hidrogel pode ser relacionada a fatores como a troca de calor entre o material e o eixo extrusor da bioimpressora, que é metálico, uma vez que esse aquecimento do hidrogel resulta na diminuição da sua viscosidade, de modo que, mesmo com a pressão constante, houvesse um aumento no fluxo de saída do biomaterial. Além disso, a quantidade excedente de hidrogel depositado pode ter correlação com a forma arredondada do topo dos construtos, como pode ser visualizado na Figura 09.

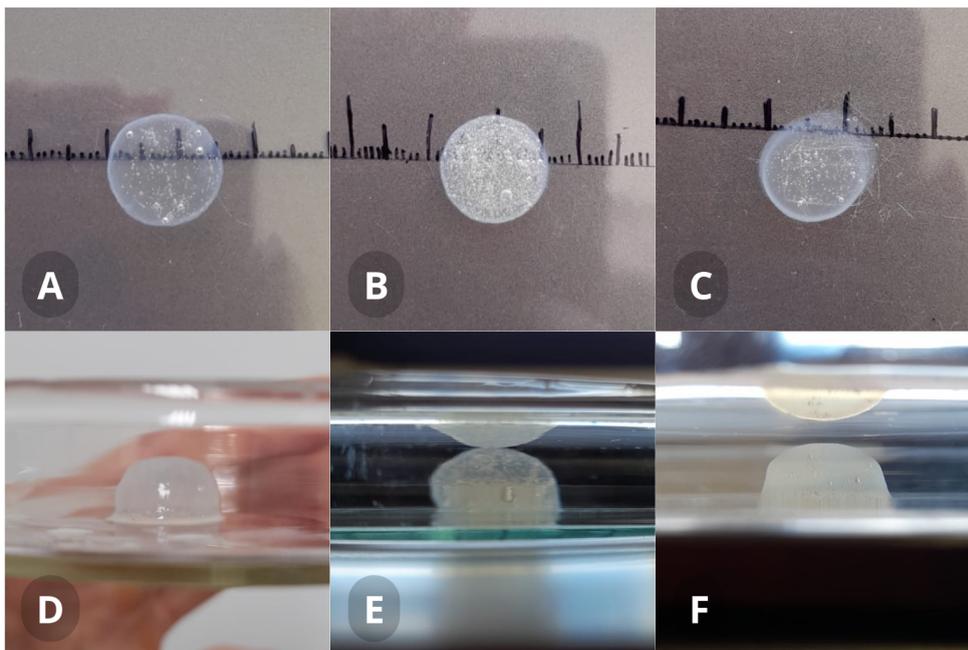


Figura 09: Triplicata dos cilindros 10x10x3 mm. (A,B,C) Visão superior dos construtos. (D,E,F) Visão lateral dos construtos.

Tabela 01: Medidas dos cilindros 10x10x3 mm.

	X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	Ab (mm ²)	P (mm)	C	R
Cilindro ideal	10,00	10,00	3,00	78,74	31,4	1,00	1,00
Cilindro 1.1	15,53	15,03	9,17	181,0	48,04	0,98	0,97
Cilindro 1.2	14,03	14,03	6,45	150,6	43,74	0,98	0,98
Cilindro 1.3	12,82	12,38	6,02	120,5	39,36	0,97	0,91
Médias	14,13	13,18	7,21	150,7	43,71	0,98	0,95
Desv. Pad.	1,36	1,39	1,71	30,25	4,34	0,006	0,038

O cilindro de 20x20x3 mm teve uma deformação média de 2,6 mm nos eixos X e Y, e uma deformação de 1,45 mm no eixo Z, representando 13% e 48%, respectivamente, o que pode ser explicado pela maior distância entre as linhas de preenchimento em grade do construto, que podem ser visualizadas na Figura 10. Observa-se ainda, na Tabela 02, que a área da base (Ab) e o perímetro (P) médio dos construtos também foram superiores ao esperado em um cilindro ideal. Já a circularidade e o arredondamento médio foram, nessa ordem, 0,95 e 0,96, valor menor em relação aos cilindros de 10x10x3 mm.

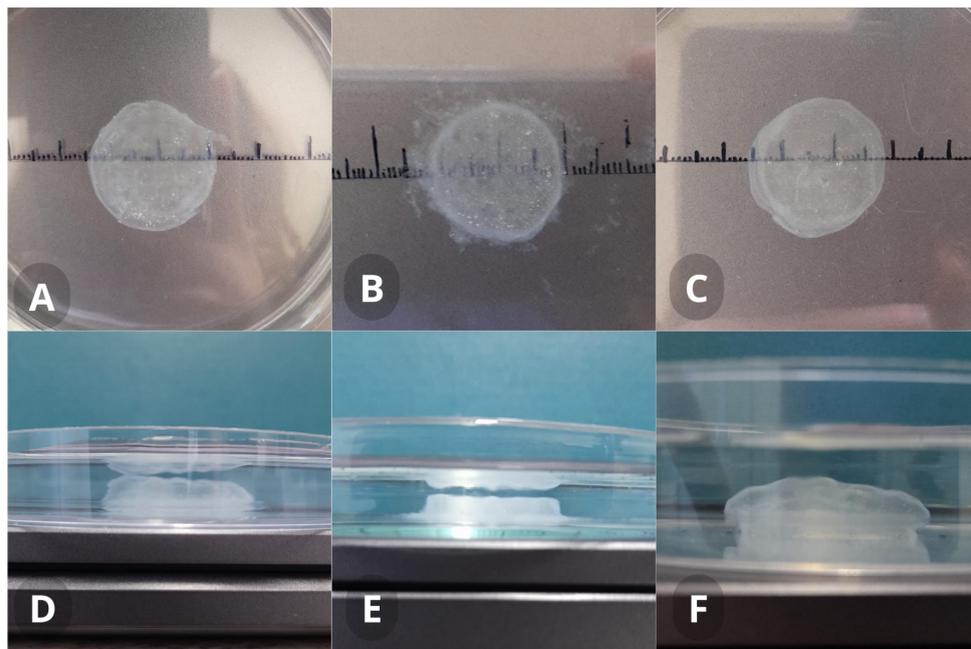


Figura 10: Triplicata dos cilindros 20x20x3 mm. (A,B,C) Visão superior dos construtos. (D,E,F) Visão lateral dos construtos.

Tabela 02: Medidas dos cilindros 20x20x3 mm.

	X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	Ab (mm ²)	P (mm)	C	R
Cilindro ideal	20,00	20,00	3,00	314,15	62,8	1,00	1,00
Cilindro 2.1	23,97	24,93	5,03	462,5	79,20	0,92	0,97
Cilindro 2.2	20,27	20,98	3,47	329,8	65,35	0,97	0,96
Cilindro 2.3	22,67	22,81	4,86	403,8	72,15	0,97	0,94
Médias	22,30	22,91	4,45	398,7	72,23	0,95	0,96
Desv. Pad.	1,88	1,98	0,85	66,49	6,92	0,03	0,01

Os paralelepípedos de 10x10x3 mm apresentaram uma deformação média de 66,3% nos eixos X e Y, e de 114% no eixo Z. Além disso, a área média é 124% maior que a esperada, e o perímetro médio é cerca de 35% maior que o ideal, como observado na Tabela 03. Valores tão expressivos resultaram no arredondamento dos construtos, com valor médio de 0,89, e circularidade média de 0,95, aproximando-se visualmente dos cilindros como mostra a Figura 11.

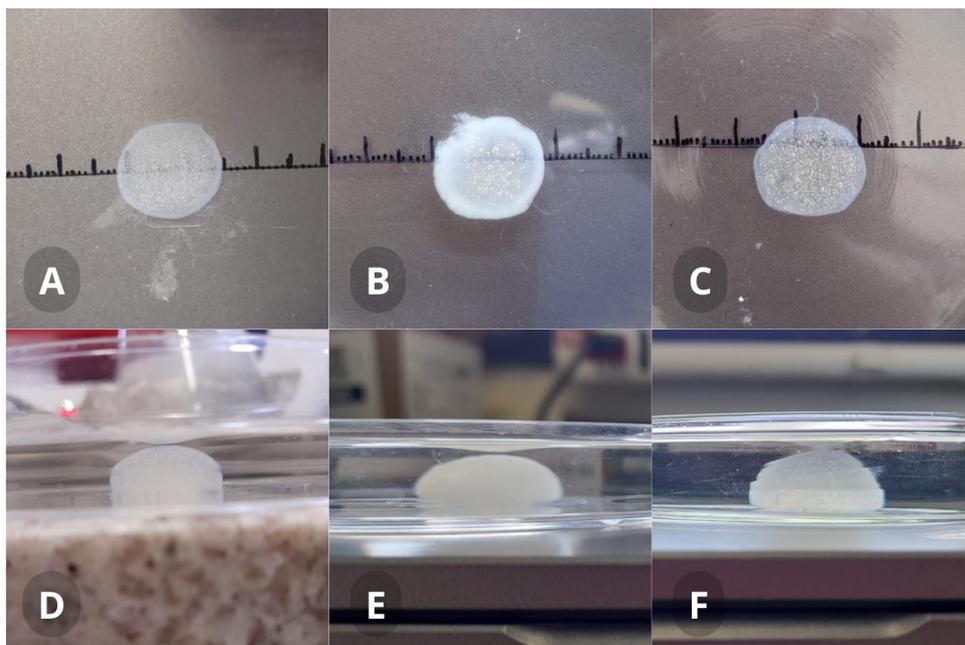


Figura 11: Triplicata dos paralelepípedos 10x10x3 mm. (A,B,C) Visão superior dos construtos. (D,E,F) Visão lateral dos construtos.

Tabela 03: Medidas dos paralelepípedos 10x10x3 mm.

	X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	Ab (mm ²)	P (mm)	C	R
Paralelepípedo ideal	10,00	10,00	3,00	100,0	40,00	0,78	1
Paralelepípedo 1.1	15,67	14,22	6,38	181,4	48,48	0,97	0,88
Paralelepípedo 1.2	17,03	15,84	4,76	221,8	54,70	0,93	0,92
Paralelepípedo 1.3	19,51	17,53	8,13	270,8	59,27	0,96	0,88
Médias	17,40	15,86	6,42	224,7	54,15	0,95	0,89
Desv. Pad.	1,95	1,65	1,68	44,77	5,41	0,02	0,02

Os paralelepípedos maiores (20x20x3 mm) tiveram uma deformação média de 33,5% nos eixos X e Y, 33% no eixo Z, de 53% na área da base e de 11,5% no perímetro, mostrando uma estabilidade relativa muito maior em relação os paralelepípedos de 10x10x3 mm. A circularidade e o arredondamento médio também mostraram-se mais próximos dos valores ideais, como demonstrado na Tabela 04. A fabricante Allevi declara precisão de 5 μ m nos eixos X e Y e 1 μ m no eixo Z, no entanto a resolução dos construtos depende fortemente da reologia do material impresso, sendo influenciada também pelo tamanho do construto. Na

Figura 12 é possível observar que os paralelepípedos foram mais fieis quanto à forma e mantiveram a visão lateral do preenchimento em grade, assim como nos cilindros maiores.

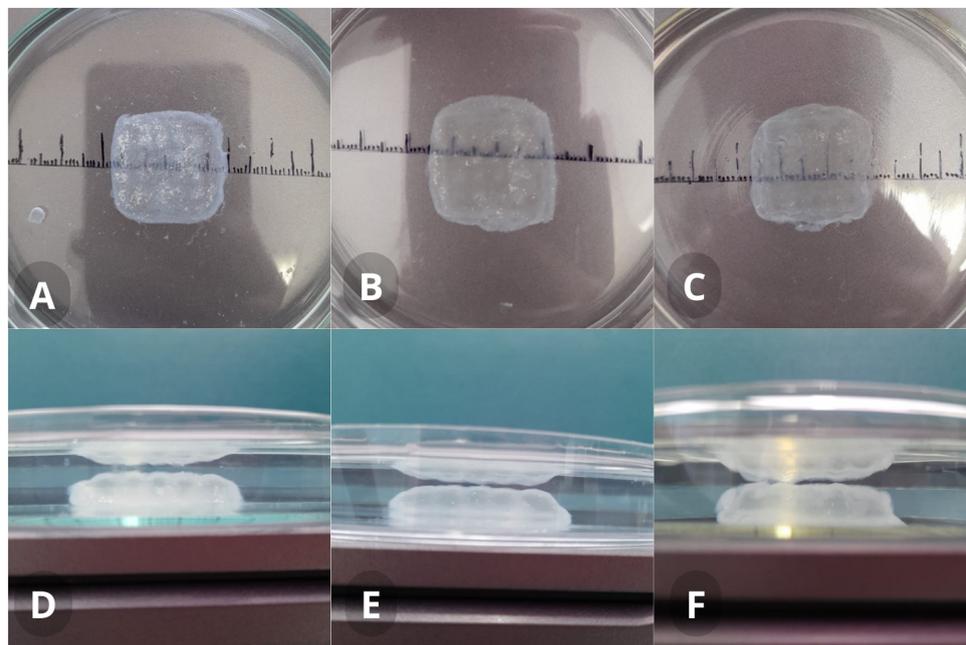


Figura 12: Triplicata dos paralelepípedos 20x20x3 mm. (A,B,C) Visão superior dos construtos. (D,E,F) Visão lateral dos construtos.

Tabela 04: Medidas dos paralelepípedos 20x20x3 mm.

	X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	Ab (mm ²)	P (mm)	C	R
Paralelepípedo ideal	20,00	20,00	3,00	400,0	80,00	0,78	1
Paralelepípedo 2.1	26,28	26,96	4,90	648,2	94,17	0,91	0,97
Paralelepípedo 2.2	27,48	29,41	5,12	703,1	97,45	0,93	0,94
Paralelepípedo 2.3	24,75	25,34	4,41	578,2	89,23	0,91	0,95
Médias	26,17	27,24	4,81	613,2	89,23	0,92	0,95
Desv. Pad.	1,37	2,05	0,36	49,49	4,14	0,01	0,01

Em relação aos prismas de 10x10x3 mm a deformação média dos eixos X e Y foi de 18%, enquanto no eixo Z foi de 43%. Já a deformação média da área da base e do perímetro foram, respectivamente, 127% e 9%. A circularidade média alcançou 0,95, sendo que o esperado seria 0,6, e o arredondamento médio ficou próximo ao valor referência (Tabela 05). Nota-se, por meio da Figura 13, que os prismas tiveram deformações consideráveis em sua

forma, principalmente nos vértices, mas apresentam uma aparência mais fiel quando comparados aos paralelepípedos de igual tamanho.

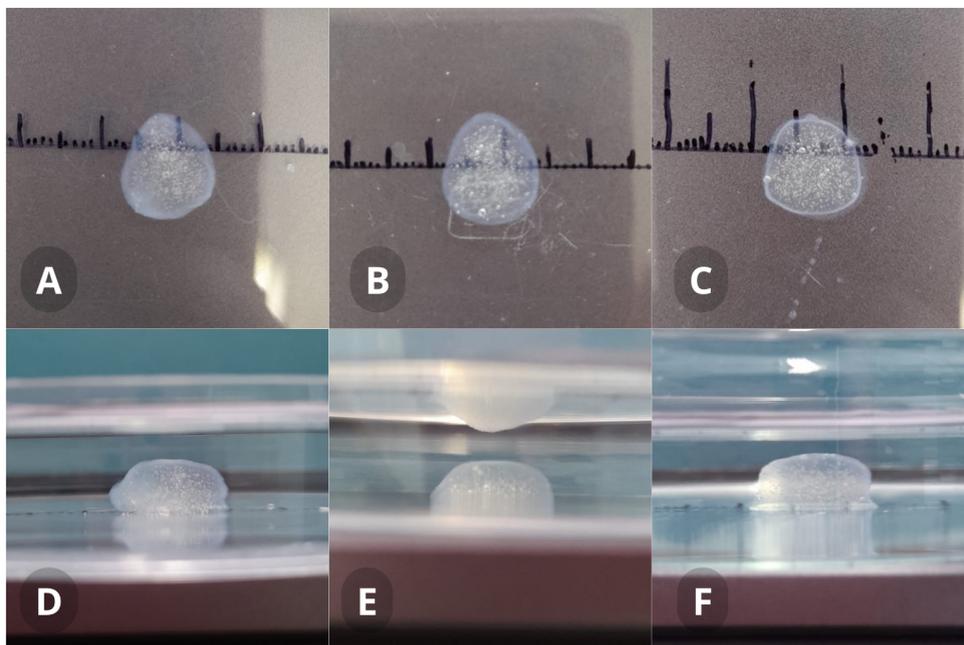


Figura 13: Triplicata dos prismas de base triangular 10x10x3 mm. (A,B,C) Visão superior dos construtos. (D,E,F) Visão lateral dos construtos.

Tabela 05: Medidas do prismas de base triangular 10x10x3 mm.

	X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	Ab (mm ²)	P (mm)	C	R
Prisma ideal	10,00	10,00	3,00	50,0	30,00	0,60	0,86
Prisma 1.1	11,14	12,96	4,65	116,6	39,43	0,94	0,88
Prisma 1.2	11,38	13,24	3,55	121,0	39,80	0,96	0,89
Prisma 1.3	11,01	11,10	4,68	102,6	36,77	0,95	0,97
Médias	11,18	12,43	4,29	113,4	38,66	0,95	0,91
Desv. Pad.	0,19	1,16	0,64	9,61	1,65	0,01	0,05

As últimas formas impressas e avaliadas foram os prismas de base triangular de 20x20x3 mm, que demonstraram ser as réplicas mais estáveis dentre os construtos, como pode-se notar na Figura 14. Com deformação média inferior a 3% nos eixos X e Y, 7,6% no eixo Z, e circularidade e arredondamento médios muito próximos ao ideal (Tabela 06), o que pode ser explicado pela rigidez geométrica do triângulo.

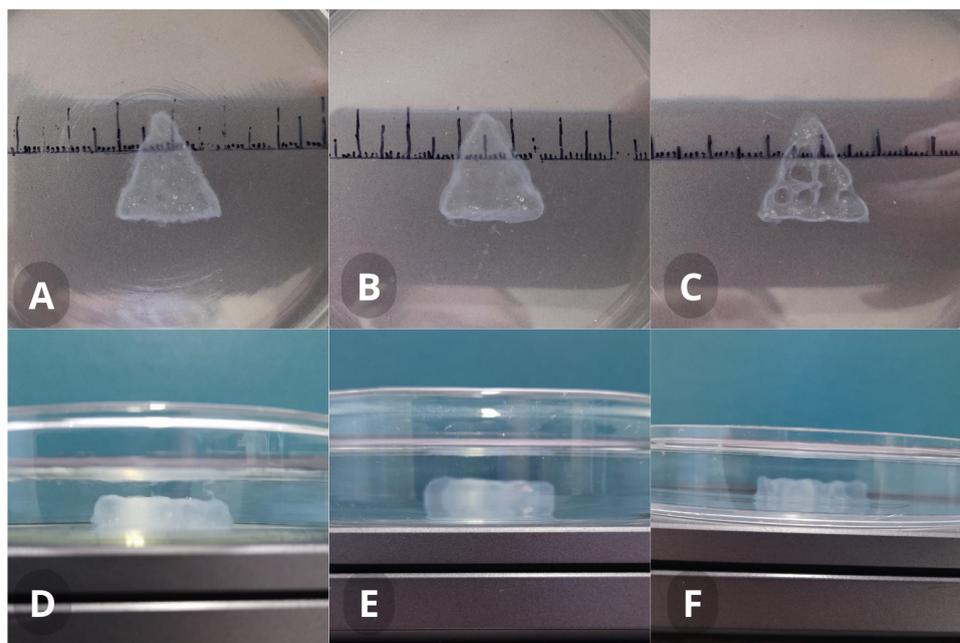


Figura 14: Triplicata dos prismas de base triangular 20x20x3 mm. (A,B,C) Visão superior dos construtos. (D,E,F) Visão lateral dos construtos.

Tabela 06: Medidas dos prismas de base triangular 20x20x3 mm.

	X (mm)	Y (mm)	Z (mm)	Ab (mm ²)	P (mm)	C	R
Prisma ideal	20,0	20,00	3,00	200,0	65,00	0,60	0,86
Prisma 2.1	20,85	21,23	3,97	261,6	68,48	0,70	0,82
Prisma 2.2	20,48	20,79	5,30	262,0	65,95	0,75	0,85
Prisma 2.3	20,01	20,00	3,12	216,0	64,57	0,65	0,86
Médias	20,45	20,67	4,13	246,5	66,33	0,7	0,84
Desv. Pad.	0,42	0,62	1,09	26,44	1,98	0,05	0,02

Um fator de grande influência a ser considerado durante as impressões é a temperatura. A bioimpressora Allevi 2, como dito anteriormente, possui controle térmico partindo da temperatura ambiente até 160°C, mas não tem a capacidade de resfriamento. Considerando que a blenda de alginato e gelatina deve ser manipulada em temperaturas mais baixas a fim de manter uma maior viscosidade e retenção de forma, e o material estava armazenado a 4°C, manteve-se o controle térmico da bioimpressora desligado durante a realização de todas as impressões.

Entretanto, como a máquina trabalha com mecanismo pneumático, foi possível notar um aquecimento do bico extrusor, que registrou partida de 21°C até aproximadamente 27°C à medida que impressões consecutivas foram realizadas, evidenciando a relação direta entre aumento de pressão e temperatura, fato esse que pode ser explicado pela Lei de Charles, um caso específico na Lei dos Gases Ideais (LIMA, 2014).

Foi possível ainda observar a presença de bolhas nos impressos (Figuras 12 e 13), embora isso não fosse visualmente notável durante a produção do hidrogel. Possivelmente por se tratarem de microbolhas ou pela captura de ar pelo hidrogel durante sua extrusão. Alguns estudos, como o realizado por Peng *et al.* (2022), incluem na produção dos hidrogéis a etapa de centrifugação para desaerar o material. Apesar de a fabricante Allevi não sugerir essa etapa em seus protocolos, a desaeração pode ser uma opção interessante.

Para a realização de estudos futuros, com a utilização de células, a análise de viabilidade celular mostra-se de suma importância, considerando o estresse físico que os construtos sofrem (pressão e temperatura). Outra consideração é a substituição da gelatina comum pela gelatina metacrilada (GelMa), que possui maior fidelidade à forma durante as impressões, como relatado por Barros *et al.* (2021). A utilização da GelMa facilitaria o manuseio com o hidrogel e suas propriedades reológicas, visto que o material é reticulado com luz ultravioleta, já presente no modelo Allevi 2.

6. CONCLUSÃO

A impressão dos construtos do gel à base de acrilato mostrou-se uma opção simples e barata para a realização de testes iniciais com a bioimpressora, com o objetivo de familiarização com o equipamento.

Os impressos da blenda alginato + gelatina, por sua vez, apresentaram variações significativas quanto ao tamanho e forma, que podem ser atribuídos à variação de temperatura

e fluxo de extrusão do hidrogel, sendo os cilindros e os prismas de base triangular formas mais estáveis em relação aos paralelepípedos. Os construtos de tamanhos 20x20x3 mm também tiveram uma deformação menor quando comparados aos de 10x10x3 mm, além de manterem seu tipo de preenchimento visível e terem uma reticulação mais uniforme, possivelmente pela maior área de contato.

A bioimpressora Allevi 2 apresentou diversas limitações, como dificuldade de manutenção da temperatura, dependência de internet e falta de ambiente estéril, mas que podem ser contornados com o emprego de técnicas e materiais diversificados. Este estudo contribuiu para a bioimpressão 3D como um todo e pode ter continuidade com o emprego de células, uma vez que essa área mostra-se promissora para diversas aplicações na medicina regenerativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3D BIOTECHNOLOGY S. Genesis. **3D Biotechnology Solutions**. Disponível em:

<http://www.3dbiotechnologiessolutions.com/en/genesis-2/>. Acesso em 13 Fev. 2023.

ALLEVI. Allevi 2 - The Original Desktop 3D bioprinter. **Allevi**, 2022. Disponível em:

<https://www.allevi3d.com/allevi-2/>. Acesso em 25 Jul. 2022.

BARROS, N. R. Biofabrication of endothelial cell, dermal fibroblast, and multilayered keratinocyte layers for skin tissue engineering. **Biofabrication**, v. 13, n. 3, 2021.

BRAND, I. *et al.* Pneumatic conveying printing technique for bioprinting applications. **RSC Advances**, v. 9, n. 70, p. 40910-40916, Dez. 2019.

CADDEO, S. *et al.* Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. 40, Jul. 2017.

CARPIO, M. B. *et al.* 3D Bioprinting Strategies, Challenges, and Opportunities to Model the Lung Tissue Microenvironment and Its Function. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, Nov. 2021.

COELHO, T. Medicina Regenerativa estuda benefícios das células-tronco do tecido adiposo. **Ciência e tecnologia**, v. 46, n. 36, 13, Jun. 2013. Disponível em:
<http://www.usp.br/aunantigo/exibir?id=5230&ed=925&f=6>, Acesso em 25 Jul. 2022.

CUBO, N. *et al.* 3D bioprinting of functional human skin: production and in vivo analysis. **Biofabrication**, v. 9, 2018.

DERNOWSEK, J. A. Desafios da bioimpressão. **Bioimpressão**, 2019
<https://www.biofabricacao.com/single-post/2018/10/22/Desafios-da-Bioimpress%C3%A3o>,
Acesso em 26 Jul. 2022.

FAVARETO, I. C. **Avaliação de Tendências e Avanços na Área de Bioimpressão e Análise da Inserção do Mercado Brasileiro no Contexto Mundial**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Engenharia Elétrica, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. p. 64. 2023.

FOYT, D. A. *et al.* Exploiting Advanced Hydrogel Technologies to Address Key Challenges in Regenerative Medicine. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 8, Jan. 2018.

GAO, T. *et al.* Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: a systematic approach. **Biofabrication**, v. 10, n. 3, Jun. 2018.

GRIFFITH, L. G. & NAUGHTON, G. Tissue engineering - Current challenges and expanding opportunities. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1009–1014, Fev. 2002.

GU, Z. *et al.* Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 5, p. 529-557, Set. 2020.

GUNGOR-OZKERIM, P. S. *et al.* Bioinks for 3D bioprinting: an overview. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 5, p. 915-946, Mai. 2018.

HAN, X. *et al.* Optimized vascular network by stereolithography for tissue engineered skin. **International Journal of Bioprinting**, v. 4, n. 2, p. 134, Abr. 2018.

HAN, F. *et al.* Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 83, Mar. 2020.

HUANG, Q. *et al.* Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 20, p. 6255-6275, Out. 2017.

IMAGEJ. Shape Descriptors. **ImageJ**. Disponível em:
<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/descriptors.html>. 2023.

IRVINE, S. A. & VENKATRAMAN, S. S. Bioprinting and Differentiation of Stem Cells. **Molecules**, v. 21, n. 9, Set. 2016.

KAČAREVIĆ, Z. P. *et al.* An Introduction to 3D Bioprinting: Possibilities, Challenges and Future Aspects. **Materials**, v. 11, n. 11, Nov. 2018.

KANG, L. H. *et al.* Optimizing Photo-Encapsulation Viability of Heart Valve Cell Types in 3D Printable Composite Hydrogels. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 45, n. 2, p. 360-377, Fev. 2017.

KARZYŃSKI, K., *et al.* Use of 3D bioprinting in biomedical engineering for clinical application. **Medical Studies**, v. 34, n. 1, p. 93-97, Mar. 2018.

KHODA, A. K. M. *et al.* Designing heterogeneous porous tissue scaffolds for additive manufacturing processes. **Computer-Aided Design**, v. 45, n. 12, p. 1507–1523, Dez. 2013.

KLEBE, R. J. Cytoscribing: a method for micropositioning cells and the construction of two-and three-dimensional synthetic tissues. **Experimental Cell Research**, v. 179, n. 2, p. 362-373, Dez. 1988.

LANDERS, R. *et al.* Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. **Biomaterials**, v. 23, n. 23, p. 4437-4447, Dez. 2002.

LEE, A. *et al.* 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart. **Science**, v. 365, n. 6452, p. 482-487, Ago. 2019.

LI, J. *et al.* Recent advances in bioprinting techniques: Approaches, applications and future prospects. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 271, Set. 2016.

LIMA, L. S. Lei de Charles. **Revista de Ciência Elementar**. v.2, n. 109, 2014.

LOCKER, A. Slicer 3D: os melhores fatiadores de 2021. **All 3DP**, Jan. 2021. Disponível em: <https://all3dp.com/pt/1/fatiador-3d-programa-fatiamento-3d-slicer/>. Acesso em 8 Ago. 2022.

MARTIN, A. N. *et al.* Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences. **Lea & Febiger**. v.4, 1993.

MATAI, I. *et al.* Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. **Biomaterials**, v. 226, Out. 2020.

MIREK, A. *et al.* Development of a new 3D bioprinted antibiotic delivery system based on a cross-linked gelatin–alginate hydrogel. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 43, Ago. 2022.

MONCAL, K. K. *et al.* Thermally-controlled extrusion-based bioprinting of collagen.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 30, n. 55, Abr. 2019.

NIU, C. *et al.* Fabrication of SA/Gel/C scaffold with 3D bioprinting to generate micro-nano porosity structure for skin wound healing: a detailed animal in vivo study. **Cell Regeneration**, v. 11, n.10. Fev. 2022.

NOOR, N. *et al.* 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts.

Advanced Science, v. 6, n. 11, Abr. 2019.

ODDE, D. J. & RENN, M. J. Laser-guided direct writing for applications in biotechnology.

Trends in Biotechnology, v. 17, n. 10, p. 385-389, Out. 1999.

ONG, C. *et al.* 3D bioprinting using stem cells. **Pediatric Research**, v. 83, p. 223–231, Jan. 2018.

PENG, *et al.* A Three-Dimensional Bioprinted Copolymer Scaffold with Biocompatibility and Structural Integrity for Potential Tissue Regeneration Applications. **Polymers**, v. 14, n. 3415, Ago. 2022.

PORTELA. S. O que é CAD? Entenda como funciona e qual o melhor para o seu projeto. **3D**

Lab: Soluções em impressão 3D, 2021. Disponível em: <https://3dlab.com.br/cad-o-que-e/>.

Acesso em: 10 Ago. 2022.

REGENHU. The R-GEN 200 bioprinter. **RegenHU**. Disponível em:

<https://www.regenhu.com/3dbioprinting-solutions/r-gen-200-3dbioprinter/>. Acesso em 13 Fev. 2023.

RIBEIRO, A. *et al.* Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. **Biofabrication**, v. 10, n. 1, Nov. 2017.

SAINI, G. *et al.* Applications of 3D Bioprinting in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 21, Out. 2021.

TAN, B. *et al.* Applications of 3D bioprinting in tissue engineering: Advantages, deficiencies, improvements, and future perspectives. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, p. 5385–5413, Jul. 2021.

TARASSOLI, S. P. *et al.* Candidate Bioinks for Extrusion 3D Bioprinting-A Systematic Review of the Literature. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, Out. 2021.

THAYER, P. S. *et al.* Bioprinting of Cartilage and Skin Tissue Analogs Utilizing a Novel Passive Mixing Unit Technique for Bioink Precellularization. **Journal of Visualized Experiments**, 2018.

VIJAYAVENKATARAMAN, S. *et al.* 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 132, p. 296-332, Jul. 2018.

WILSON JR., W. C. & BOLAND, T. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. **The Anatomical Record**, v. 272, n. 2, p. 491-496, Jun. 2003.

XING, F. *et at.* Bioprinting for Vascularized Tissue-Engineered Bone Fabrication. **Materials**, v. 13, n. 10, Mai. 2020.