

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica

Patrícia Muniz de Oliveira

**Bioimpressora 3D customizada para impressão de biotinta de nanocelulose e
alginato carregada de células musculares**

Belo Horizonte
2023

Patrícia Muniz de Oliveira

Bioimpressora 3D customizada para impressão de biotinta de nanocelulose e alginato carregada de células musculares

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Orientador: Prof. Estevam Barbosa de Las Casas

Coorientadores: Prof. Eduardo Soudah Prieto, Profa. Luciana de Oliveira Andrade

Belo Horizonte

2023

O48b

Oliveira, Patrícia Muniz de.

Bioimpressora 3D customizada para impressão de biotinta de nanocelulose e alginato carregada de células musculares [recurso eletrônico] / Patrícia Muniz de Oliveira. – 2023.

1 recurso online (143 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Estevam Barbosa de Las Casas.

Coorientadores: Eduardo Soudah Prieto, Luciana de Oliveira Andrade.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndices: f. 120-143.

Bibliografia: f. 113-119.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia mecânica - Teses. 2. Bioengenharia - Teses.
3. Impressão - Máquinas e acessórios - Teses. 4. Tintas - Teses.
5. Fluidodinâmica computacional - Teses. 6. Alginato - Teses.
7. Celulose - Teses. 8. Cisalhamento - Teses. 9. Viabilidade - Teses. 10.
Células musculares - Teses. I. Las Casas, Estevam Barbosa de. II. Pietro,
Eduardo Soudah. III. Andrade, Luciana de Oliveira. IV. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. V. Título.

CDU: 621(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

“BIOIMPRESSORA 3D CUSTOMIZADA PARA IMPRESSÃO DE BIOTINTA DE NANOCELULOSE E ALGINATO CARREGADA DE CÉLULAS MUSCULARES”

PATRICIA MUNIZ DE OLIVEIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Minas Gerais, constituída pelos Professores Dr. Estevam Barbosa de Las Casas (Orientador - Departamento de Engenharia de Estruturas/UFMG), Dr. Eduardo Soudah Prieto (Coorientador – Departamento de Ciência dos Materiais e Engenharia Metalúrgica/UPC), Dr. Rudolf Huebner (Departamento de Engenharia Mecânica/UFMG), Dr^a. Luciana de Oliveira Andrade (Departamento de Morfologia/UFMG) e Dr. Dawidson de Assis Gomes (Departamento de Bioquímica e Imunologia/UFMG), como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de "**Mestre em Engenharia Mecânica**", na área de concentração de "**Bioengenharia**".

Dissertação aprovada no dia 13 de dezembro de 2023.

Por:



Documento assinado eletronicamente por **Estevam Barbosa de Las Casas, Professor do Magistério Superior**, em 03/01/2024, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Soudah Prieto, Usuário Externo**, em 20/01/2024, às 20:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rudolf Huebner, Membro**, em 22/01/2024, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dawidson Assis Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 05/02/2024, às 20:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana de Oliveira Andrade, Professora do Magistério Superior**, em 06/02/2024, às 07:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2899915** e o código CRC **643393B4**.

Referência: Processo nº 23072.277111/2023-69

SEI nº 2899915

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Marieta Muniz da Silva (*in memoriam*), pois se eu cheguei até aqui, apesar de tantas adversidades, foi porque minha avó abriu e abençoou este caminho antes mesmo de eu nascer. Mulher preta e semianalfabeta, foi ela quem primeiro desafiou o machismo e a pobreza para colocar os estudos como prioridade para mudar a vida das mulheres da minha família. Deixo registrado meu agradecimento e eterna saudade.

À minha mãe e meus irmãos, por nunca me deixarem desistir e confiarem que eu seria capaz de chegar até aqui, especialmente ao Matheus, que me acolheu e me deu tanto suporte nos últimos meses. Aos meus grandes amigos, pelo afeto e incentivo que me deram forças para continuar essa jornada, compreendendo a minha mudança e ausência nos momentos mais difíceis, principalmente meu companheiro, Rodrigo, que foi um apoio incansável, tornando essa conquista possível.

Ao meu orientador, Professor Estevam Las Casas, que acreditou no meu potencial quando eu já não conseguia ter esperanças e não encontrava lugar na engenharia. Além de promover parcerias importantes, sem as quais este trabalho não teria se concretizado, o Professor Estevam sempre incentivou a interdisciplinaridade, o pensamento crítico e as lutas políticas, e me proporcionou oportunidades e liberdade para crescer e aprender de forma humanizada.

À Professora Luciana Andrade, coorientadora deste trabalho, e a todos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, especialmente ao Jorge Guadalupe e Fábio dos Santos, sem os quais não seria possível concluir este trabalho com o sucesso de um processo de bioimpressão viável.

Ao Professor Eduardo Soudah, também meu coorientador, pela colaboração internacional e conhecimentos compartilhados nesses anos trabalho.

À equipe da 3DLopes, em especial ao Daniel Lopes, por transformar em realidade a bioimpressora utilizada neste trabalho, bem como aqueles que anteriormente contribuíram para a idealização deste projeto, Isabela Poley e Rodrigo Silveira.

À equipe do CTNano/UFMG, em especial a Professora Dra. Glaura Goulart, Dra. Cláudia Vasconcelos e Dra. Sthefany Zaida, agradeço a receptividade e permissão de uso das estruturas e laboratórios para a realização dos ensaios reológicos.

Ao Professor Rudolf Huebner e à equipe do Labbio, em especial ao Saulo de Freitas, pelas aulas, ensinamentos e suporte prestados principalmente nas etapas experimentais deste trabalho.

Ao Professor Giovane Azevedo e à equipe da Setor de Mecânica do COLTEC/UFMG, especialmente ao Albenir e ao Sérgio Martins, pelo suporte prestado desde meu ensino médio-técnico e, no mestrado, pelo apoio para fabricação do mecanismo de medição da pressão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa por meio do Convênio para PD&I de Concessão de Cota de Bolsas nº 5.18/2022, que permitiu que eu me dedicasse à esta pesquisa. Este trabalho foi realizado também com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que lutaram e seguem na luta por uma universidade pública, gratuita e de qualidade. Que um dia ela seja por e para todos!

RESUMO

A crescente demanda por transplantes de tecidos e órgãos, os desafios e riscos relacionados aos transplantes autólogos, bem como a necessidade de alternativas para obtenção de carne, gordura, couro e tecidos sem animais, têm impulsionado o interesse científico e industrial por técnicas de biofabricação. Nos últimos anos, a bioimpressão 3D baseada em extrusão tem emergido como uma das abordagens mais populares para biofabricação. No entanto, equipamentos e materiais para o processo de bioimpressão 3D ainda apresentam um custo elevado, o que representa uma limitação para aplicações em pesquisas. Para superar esse problema, este trabalho apresenta o projeto, fabricação e teste de uma bioimpressora 3D baseada em extrusão adaptada a partir de uma impressora 3D convencional já existente. Para transformá-la em uma bioimpressora, o sistema extrusor de filamentos plásticos com o bloco aquecedor foi substituído por um extrusor mecânico de hidrogéis e biotintas, composto por um pistão movido por fuso. Para validação do protótipo, utilizou-se a formulação CELLINK® Bioink carregada de células musculares da linhagem C2C12 para procedimento de bioimpressão 3D. Os testes experimentais confirmaram a viabilidade do processo utilizando a bioimpressora desenvolvida e fornecem importantes informações quanto a morfologia e proliferação de células musculares C2C12 em biotintas compostas por nanocelulose e alginato, com evidente aumento na proliferação celular 14 dias após a bioimpressão. Além disso, foram realizadas simulações computacionais para analisar o escoamento das tintas e biotintas através do bico extrusor da bioimpressora e avaliar se a tensão gerada compromete a viabilidade celular das construções impressas.

Palavras-chave: máquinas e acessórios; bioimpressão 3D; biotinta; alginato; celulose; fluidodinâmica computacional; tensão de cisalhamento; viabilidade celular; células musculares.

ABSTRACT

The increasing demand for tissue and organ transplants, the challenges and risks associated with autologous transplants, as well as the need for alternatives to obtain meat, fat, leather, and animal-free tissues, have driven significant scientific and industrial interest in biofabrication techniques. In recent years, extrusion-based 3D bioprinting has emerged as one of the most popular approaches for biofabrication. However, equipment and materials for the process still come at a high cost, which is a limitation for research applications. To overcome this issue, this work introduces an extrusion-based 3D bioprinter adapted from an existing conventional 3D printer. To transform it into a bioprinter, the plastic filament extruder system with the heating block was replaced by a mechanical extruder for hydrogels and bioinks, consisting of a piston driven by a screw. For prototype validation, CELLINK® Bioink loaded with C2C12 muscle cells was tested in a 3D bioprinting procedure. Experimental tests confirmed the viability of the process using the developed bioprinter and provided important insights into the morphology and proliferation of C2C12 muscle cells in bioinks composed of nanocellulose and alginate, with a noticeable increase in cell proliferation 14 days after bioprinting. Additionally, computational simulations were conducted to analyze the flow of inks and bioinks through the bioprinter's extrusion nozzle and assess whether the generated shear stress compromises cell viability of the printed constructs.

Keywords: machines and accessories; 3D bioprinting; bioink; alginate; cellulose; computational fluid dynamics; shear stress; cell viability; muscle cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática dos avanços nas duas últimas décadas que impulsionaram o desenvolvimento da Engenharia de Tecidos.	22
Figura 2 – Representação das etapas do processo de Bioimpressão 3D.	24
Figura 3 – Representação esquemática das principais técnicas adaptadas para bioimpressão 3D: (A) impressão a jato de tinta, (B) impressão a laser, (C) impressão baseada em extrusão, e (D) estereolitografia.	25
Figura 4 – Sistema de impressão a jato de tinta criado por Cooper <i>et al.</i> (2010).	27
Figura 5 – Esquema 3D do sistema de impressão a laser utilizado por Wang <i>et al.</i> (2018).	29
Figura 6 – Representação esquemática do processo de impressão 3D baseado em estereolitografia de luz visível.	30
Figura 7 – A impressora 3D antes da conversão equipada com um extrusor com bloco aquecedor e a bioimpressora 3D modificada por Ioannidis <i>et al.</i> (2020).	31
Figura 8 – Representação esquemática e foto do sistema multicabeçote construído por Lee <i>et al.</i> (2014).	32
Figura 9 – Representação da bioimpressora de extrusão multimaterial contínua sintonizável digitalmente com sete canais conectado a reservatórios acionados individualmente por válvulas pneumáticas programáveis.	33
Figura 10 – Alterações morfológicas de células C2C12 ao longo do tempo em construto impresso com CELLINK™ Bioink.	37
Figura 11 – Comparação da viscosidade de alginato e GelMA e a combinação de ambos.	38
Figura 12 – Combinação de alginato com nanocelulose e uma solução de sulfato de alginato.	38
Figura 13 – Propriedades reológicas das tintas preparadas a partir de dECM de cartilagem (cdECM), dECM de coração (hdECM) e dECM adiposo (adECM).	39
Figura 14 – Comparação da formação de (a) filamentos e (b) camadas para amostras de Nivea Creme e diferentes composição de poloxamer 407.	40
Figura 15 – Curvas de escoamento de fluidos newtoniano e não newtonianos de propriedades independentes do tempo de cisalhamento.	42
Figura 16 – Viscosidade do Nivea Creme e formulações de alginato e gelatina: (a) Rampa de tensão de cisalhamento e (b) Rampa de taxa de deformação.	44
Figura 17 – Viscosidade da CELLINK® Bioink em função da taxa de deformação sob diferentes temperaturas.	45

Figura 18 – Viscosidade do Nivea Creme: (a) Rampa de tensão de cisalhamento e (b) Rampa de taxa de deformação.	46
Figura 19 – Tensões que incidem sobre as células dentro dos bocais de impressão.	47
Figura 20 – Viabilidade da cultura de células de manjerição em biotinta composta por alginato, metilcelulose e agarose após impressão por extrusão e cisalhamento no reômetro sob diferentes valores de tensão e tempo de exposição.	48
Figura 21 – Impacto de curto e longo prazo de diferentes níveis de tensão de cisalhamento na viabilidade e proliferação de células-tronco mesenquimais humanas.	49
Figura 22 – Viabilidade celular em função da vazão volumétrica para biotinta composta de quitosana e gelatina com 1×10^7 células/ml.	49
Figura 23 – Pressões de ar necessárias para obter as mesmas vazões em bocais com pontas cilíndricas e cônicas.	50
Figura 24 – O efeito do processo de bioimpressão na viabilidade celular para diferentes composições de géis físicos de GelMA e diferentes pontas de bocais extrusores.	51
Figura 25 – (A) Comparação da printabilidade usando (i) Alginato, (ii) Agarose (iii) PEGMA (BioINK™) e (iv) GelMA, (B) Taxa de espalhamento pós-impressão (diâmetro do filamento/diâmetro da agulha).	52
Figura 26 – Mapeamento da printabilidade mostrando o efeito da velocidade de movimento do bocal e da vazão no desempenho de impressão de uma biotinta composta por géis físicos de GelMA.	53
Figura 27 – Distribuição de tensão de cisalhamento durante o processo de bioimpressão com vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ usando um bico reto 27G e um bico cônico para soluções de GelMA 3%, 4%, e 5%.	54
Figura 28 – Formação do filamento de CELLINK™ Bioink: (A) 20G a 25°C durante um pico de baixa pressão, (B) 20G a 37°C durante um pico de baixa pressão, (C) 22G a 25°C ao final da simulação, e (D) 22G a 37°C durante um pico de baixa pressão.	55
Figura 29 – Foto frontal da bioimpressora 3D, com cabeçote extrusor, interface de usuário, mesa de impressão e os eixos de movimentação.	57
Figura 30 – Cabeçote extrusor com pistão acionado por um fuso excêntrico à seringa, que fica dentro do aquecedor e fixada.	57
Figura 31 – Reômetro modular compacto modelo MCR 302.	59
Figura 32 – Processo de mistura da biotinta carregada de células utilizando duas seringas conectadas com adaptadores fêmea-fêmea Luer Lock.	61
Figura 33 – Formação livre de filamentos de Nivea Creme sobre a placa de Petri.	62

Figura 34 – Sistema desenvolvido para medição da pressão na seringa de impressão utilizando manômetro.	64
Figura 35 – Padrão retilíneo formado por uma camada para medição da taxa de espalhamento dos filamentos impressos.	66
Figura 36 – Padrão de impressão com duas camadas para formar os construtos bioimpressos com CELLINK® Bioink carregada de células.	67
Figura 37 – Placa de cultura com as amostras dos grupos controle 2D e 3D em meio de cultura, bem como os construtos impressos, imersos em meio (rosa) ou reticulação (translúcido).	70
Figura 38 – Combinação geométrica dos modelos 3D da seringa e com o bocal 25G.	71
Figura 39 – Modelo geométrico 2D axissimétrico do conjunto seringa 3 ml e bocal 25G para simulações CFD, com todas as dimensões em mm.	72
Figura 40 – Representação esquemática das condições de contorno utilizadas nas simulações numéricas.	73
Figura 41 – Malha 4 na região de saída do bocal para o bocal 25G.	77
Figura 42 – Pontos utilizados nos testes de malha para verificar a convergência dos resultados.	79
Figura 43 – Resultados experimentais da viscosidade do Nivea Creme em função da rampa de taxa de deformação.	83
Figura 44 – Resultados experimentais da viscosidade do Nivea Creme em função da rampa de tensão de cisalhamento. A linha vermelha representa a regressão linear na região de platô da viscosidade, enquanto a linha verde representa a queda da viscosidade.	84
Figura 45 – Curva de escoamento experimental do Nivea Creme, juntamente com as curvas de ajuste conforme os modelos Lei de Potência e Herschel-Bulkley.	85
Figura 46 – Pressão diferencial (Δp) medida experimentalmente em processo de extrusão livre de filamentos de Nivea Creme em relação à vazão mássica medida.	87
Figura 47 – Teste de convergência de malha para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 28,7 mg/s utilizando o modelo Lei de Potência.	89
Figura 48 – Teste de convergência de malha para a geometria com bocal 20G e vazão igual a 28,7 mg/s utilizando o modelo Lei de Potência.	89
Figura 49 – Teste de convergência de malha para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 28,7 mg/s utilizando o modelo Herschel Bulkley.	90
Figura 50 – Teste de convergência de malha para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 0,285 mg/s utilizando o modelo Herschel Bulkley.	90

Figura 51 – Resultados numéricos e experimentais para variação da pressão durante o processo de extrusão usando bocal 16G, em função da vazão mássica.	92
Figura 52 – Resultados numéricos e experimentais para variação da pressão durante o processo de extrusão usando bocal 20G, em função da vazão mássica.	93
Figura 53 – Resultados numéricos e experimentais para variação da pressão durante o processo de extrusão usando bocal 25G, em função da vazão mássica.	94
Figura 54 – Erro de validação relativo ao resultado experimental para os modelos viscosos e bocais utilizados.	95
Figura 55 – Resultados numéricos para a distribuição da tensão de cisalhamento ao longo da parede da geometria com bocal 16G, considerando a malha mais refinada e mais grosseira utilizadas.	96
Figura 56 – Resultados numéricos para a distribuição da tensão de cisalhamento ao longo da parede da geometria com bocal 25G, considerando a malha mais refinada e mais grosseira utilizadas.	97
Figura 57 – Conteúdo de Nivea Creme na tomada de pressão retornando para a seringa, após a retirada da tensão pela passagem do êmbolo.	98
Figura 58 – Diferença de pressão em função da vazão mássica do escoamento de Nivea Creme considerando os modelos propostos na literatura.	99
Figura 59 – Distribuição da tensão de cisalhamento ao longo da parede para o modelo formado por uma seringa de 3cc e um bocal de 22G a uma vazão de 50 μ l/min de CELLINK® Bioink.	102
Figura 60 – Perfil de velocidade do escoamento de CELLINK® Bioink através do bocal 22G sob vazão de 50 e 100 μ l/min.	103
Figura 61 – Resultados numéricos da queda de pressão ao longo do eixo para o modelo formado por seringa de 3 ml e bocal 25G a uma vazão de 50 μ l/min.	104
Figura 62 – Comparação da capacidade de impressão em padrões gerados para diferentes medidores de ponta e vazões volumétricas usando a) Bioink CELLINK™ carregado com mioblastos de camundongo e b) Nivea Creme.	105
Figura 63 – Taxa de espalhamento pós-impressão (diâmetro do filamento/espessura de extrusão), (ANOVA, $p < 0,05$, Média \pm DP). Em azul está representada a biotinta CELLINK carregada de células, enquanto Nivea Creme está em laranja.	106
Figura 64 – Filamentos formados por uma camada impressa de CELLINK® Bioink carregada de células não mantêm forma estável em meio de cultura.	107
Figura 65 – Filamentos formados por duas camadas impressas de CELLINK® Bioink carregada de células mantêm forma estável em meio de cultura.	107

Figura 66 – Viabilidade de células C2C12 no grupo controle 2D, onde as células foram cultivadas em placas de vidro e apresentam propriedades aderentes e morfologia fusiforme.	108
Figura 67 – Viabilidade de células C2C12 no grupo controle 3D, onde as células já estavam encapsuladas e diluídas na biotinta.	108
Figura 68 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso 2h após bioimpressão.	109
Figura 69 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso 2h após bioimpressão.	109
Figura 70 – Viabilidade de células C2C12 no grupo encapsulado, 3 dias após bioimpressão.	109
Figura 71 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso, 3 dias após bioimpressão.	109
Figura 72 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso 6 dias após bioimpressão.	110
Figura 73 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso 6 dias após bioimpressão.	110
Figura 74 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso, 14 dias após bioimpressão.	110
Figura 75 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso, 14 dias após bioimpressão.	110
Figura 76 – Aglomeração celular formada no dia 14 após a bioimpressão.	111
Figura 77 – Aglomeração celular formada no dia 14 após a bioimpressão.	111
Figura 78 – Células de morfologia C2C12 14 após bioimpressão exibiram alinhamento e mitose. As setas brancas indicam figuras de mitose.	111
Figura 79 – Células de morfologia C2C12 14 após bioimpressão exibiram alinhamento e mitose. As setas brancas indicam figuras de mitose.	111
Figura 80 – Curva de calibração do manômetro.	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vazão mássica e bocais utilizados por Emmermacher <i>et al.</i> (2020).	77
Tabela 2 – Caracterização das malhas geradas utilizando o bocal 16G.	78
Tabela 3 – Caracterização das malhas geradas utilizando o bocal 25G.	79
Tabela 4 – Relação entre os comandos de extrusão utilizados e a vazão mássica.	87
Tabela 5 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 28,7 mg/s.	88
Tabela 6 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 28,7 mg/s para as malhas 3 (26.304 elementos), 2 (104.832 elementos) e 1 (418.944 elementos), detalhadas na metodologia.	90
Tabela 7 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 25G e vazão igual a 0,285 mg/s.	91
Tabela 8 – Resultados numéricos da pressão segundo os modelos Lei de Potência e Herschel Bulkley seguidos da incerteza numérica expandida com 95% de confiança, considerando os diferentes bocais utilizados (16G, 20G e 25G) e vazões mássicas medidas.	91
Tabela 9 – Comparação dos resultados obtidos com o modelo numérico utilizado neste trabalho, considerando o fluido testado experimentalmente por Emmermacher <i>et al.</i> (2020).	100
Tabela 10 – Resultados numéricos da variação da pressão e da tensão de cisalhamento máxima para cada pressão e vazão testada com CELLINK® Bioink.	101
Tabela 11 – Dados das medições de massa para seringa vazia e com Nivea Creme.	133
Tabela 12 – Cálculo da incerteza de medição associado a medida da densidade.	133
Tabela 13 – Dados das medições de massa da placa de Petri vazia.	134
Tabela 14 – Resultados de vazão dos testes com diferentes configurações de extrusão. A massa medida inclui o Nivea Creme e o prato da placa de Petri.	134
Tabela 15 – Cálculo da incerteza de medição associada à medida da Vazão mássica para a configuração de extrusão G1 E50 F25.	135
Tabela 16 – Resultados das medições de pressão do manômetro diferencial digital e do tubo em U preenchido com mercúrio.	136
Tabela 17 – Incerteza de calibração (Pressão manômetro digital = 327 mmHg).	136
Tabela 18 – Pressão Diferencial para diferentes configurações de vazão e bocal.	138
Tabela 19 – Incerteza de Medição para Pressão 16G (G1 E50 F25).	139

Tabela 20 – Relação entre Vazão Mássica e Pressão (ΔP).	139
Tabela 21 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 2,85 mg/s para as malhas 3 (26.304 elementos), 2 (104.832 elementos) e 1 (418.944 elementos), detalhadas na metodologia.	140
Tabela 22 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 0,285 mg/s.	140
Tabela 23 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 20G e vazão igual a 28,7 mg/s.	141
Tabela 24 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 20G e vazão igual a 2,85 mg/s.	141
Tabela 25 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 20G e vazão igual a 0,285 mg/s.	141
Tabela 26 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 25G e vazão igual a 28,7 mg/s.	142
Tabela 27 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 25G e vazão igual a 2,85 mg/s.	142
Tabela 28 – Erro de comparação dos resultados numéricos em relação aos resultados experimentais para diferentes bocais e vazões.	143

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Objetivo Geral	19
1.2	Objetivos específicos	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Engenharia de Tecidos	21
2.2	Biofabricação	22
2.3	Bioimpressão 3D	24
2.3.1	Bioimpressão a jato de tinta	27
2.3.2	Bioimpressão a laser	28
2.3.3	Estereolitografia	29
2.3.4	Bioimpressão por extrusão	30
2.4	Biotintas	34
2.4.1	Biomateriais para Biotintas	35
2.4.2	Comportamento reológico de biotintas	37
2.4.2.1	Pseudoplasticidade	38
2.4.2.2	Ensaio mecânicos e reológicos	40
2.4.2.3	Modelos constitutivos	42
2.5	Parâmetros de impressão	46
2.5.1	Viabilidade Celular	46
2.5.2	Printabilidade	51
2.6	Fluidodinâmica Computacional	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1	Customização da impressora 3D	56
3.2	Materiais para impressão	58
3.2.1	Crepe Nívea	58
3.2.1.1	Determinação da massa específica	58
3.2.1.2	Ensaio reológico	59
3.2.2	Biotinta	60
3.2.2.1	Cultura celular	60
3.2.2.2	Preparação da biotinta	60
3.3	Testes de extrusão e impressão 3D	62
3.3.1	Testes mecânicos para modelo fluidodinâmico	62

3.3.1.1 Calibração do manômetro	64
3.3.2 Printabilidade	65
3.3.3 Bioimpressão 3D	66
3.4 Cálculo da incerteza de medição	67
3.5 Viabilidade celular	69
3.6 Modelagem matemática e simulação numérica	71
3.6.1 Modelo geométrico	71
3.6.2 Equações governantes	72
3.6.3 Condições de contorno	73
3.6.4 Simulações numéricas	74
3.6.5 Validação dos resultados numéricos e experimentais	76
3.6.5.1 Comparação com a literatura	76
3.6.5.2 Teste de independência de malha	77
3.6.5.3 Estimativa da incerteza numérica	80
3.6.5.4 Diferença entre valores numéricos e experimentais	81
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
4.1 Simulações de Fluidodinâmica Computacional	83
4.1.1 Caracterização do Nivea Creme	83
4.1.2 Teste de malha e validação	86
4.1.3 Comparação com a literatura	99
4.1.4 Resultados para a biotinta CELLINK	101
4.2 Bioimpressão 3D	104
4.2.1 Printabilidade	104
4.2.2 Viabilidade celular	107
5 CONCLUSÕES	112
Referências	113
APÊNDICE A – G-code para Bioimpressão 3D	120
APÊNDICE B – Dados de medição da densidade do Nivea Creme	133
APÊNDICE C – Dados da medição da vazão mássica de Nivea Creme	134
APÊNDICE D – Dados da medição de pressão de Nivea Creme	136
APÊNDICE E – Incerteza numérica conforme norma ASME V&V 20	140

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é referência na área de transplantes de órgãos e tecidos e o Sistema Único de Saúde (SUS) é responsável pelo financiamento de mais de 90% dos procedimentos realizados no país (Ministério da Saúde, 2022). Nos últimos anos, registrou-se um crescimento no número de doadores de órgãos e, conseqüentemente, de procedimentos realizados. Segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, a taxa de doadores efetivos cresceu 82% no período entre 2010 e 2019 (ABTO, 2017; ABTO, 2021).

Entretanto, a demanda por doações mantém-se expressivamente maior e, atualmente, há mais de 40 mil pessoas na fila de espera para transplantes no Brasil (Ministério da Saúde, 2023). Além disso, situações extraordinárias, como a pandemia da COVID-19, podem impactar tanto as doações como o risco dos transplantes realizados e tendem a intensificar a crise de escassez de órgãos. No Brasil, o número de doadores diminuiu de 18,1 por milhão de habitantes em 2019 para 15,1 em 2021, representando uma queda de 16,6% (ABTO, 2021).

Os transplantes de órgãos são, em muitos casos, o único tratamento possível para pacientes que sofrem de doenças irreversíveis, mas podem exigir cuidados médicos constantes e o uso de medicamentos imunossupressores pelo resto da vida (Murphy; Atala, 2013; Poley, 2020). Órgãos, tecidos e células podem ser obtidos de forma autóloga do próprio paciente ou de forma alogênica de um doador humano, que não é imunogenicamente idêntico ao paciente (Murphy; Atala, 2013). Em transplantes alogênicos, os pacientes enfrentam também a possibilidade de rejeições imunológicas (Huang *et al.*, 2017; Murphy; Atala, 2014).

Nesse sentido, a Engenharia de Tecidos compreende um importante campo da ciência que pode aliviar a crise de escassez de órgãos (Huang *et al.*, 2017; Chandra; Soker; Atala, 2020). Trata-se de uma área multidisciplinar que tem como objetivo a recuperação, regeneração e criação de tecidos e órgãos (Groll *et al.*, 2016). Aplicada à Engenharia de Tecidos, a bioimpressão 3D é uma técnica de manufatura aditiva que se destaca como uma tecnologia promissora para a fabricação de órgãos funcionais e livres de rejeição (Huang *et al.*, 2017; Poley, 2020). Além tecidos e órgãos para transplante, a bioimpressão 3D pode ser utilizada para biofabricação de carne, gordura, couro e tecidos sem animais (Ben-Arye; Levenberg, 2019; Sakaguchi *et al.*, 2021).

Utilizando sistemas CAD/CAM e modelagem matemática, a bioimpressão pode produzir estruturas 3D complexas de nano a microescala, alocar com precisão biomateriais carregados de células e fatores de crescimento (Huang *et al.*, 2017; Zhang; Wang, 2019). A bioimpressão 3D baseada em extrusão permite a deposição de biotintas com altas densidades celulares e tem compatibilidade com diferentes tipos de materiais e uma ampla gama de viscosidades (Murphy; Atala, 2014; Paxton *et al.*, 2017).

No entanto, os equipamentos e materiais para o processo de bioimpressão 3D possuem um custo elevado. Nos últimos anos, as bioimpressoras 3D disponíveis comercialmente tem custado entre US\$5.000,00 e US\$1.000.000,00 (Tashman; Shiwarski; Feinberg, 2022), o que representa uma limitação para aplicações em pesquisas, especialmente em países em desenvolvimento e que possuem orçamento limitado para esse tipo de investimento.

Em vista disso, neste trabalho investigou-se o desenvolvimento e validação de uma bioimpressora 3D construída a partir de uma impressora 3D convencional que empregava a técnica de Fabricação com Filamento Fundido (FFF).

Durante a bioimpressão por extrusão, altas tensões de cisalhamento podem ser geradas e infligidas às células em biotintas viscosas, devido ao gradiente de velocidade do fluido na passagem pela agulha (Li *et al.*, 2015). Se as tensões forem excessivas, as membranas das células podem ficar sobrecarregadas e se romperem, comprometendo a viabilidade celular do processo (Li *et al.*, 2010; Blaeser *et al.*, 2016). Por isso, na etapa de pré-processamento, simulações numéricas foram conduzidas para analisar o escoamento de diferentes composições de tintas através do bocal extrusor da bioimpressora 3D, utilizando fluidodinâmica computacional (CFD).

Além de testes mecânicos realizados com um material de referência, Nivea Creme, uma bioimpressão 3D utilizando uma biotinta comercial carregada de células musculares foi realizada para validação do protótipo.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu em adaptar e validar o protótipo de uma Bioimpressora 3D baseada em extrusão a partir de impressora 3D já existente fabricada pela empresa parceira 3DLopes® sediada em Belo Horizonte.

1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- (i) Caracterizar o comportamento reológico e modelar matematicamente tinta para impressão 3D;
- (ii) Analisar o escoamento das tintas e biotintas através do bico extrusor da bioimpressora por meio de simulações de fluidodinâmica computacional;
- (iii) Validar experimentalmente os resultados das simulações numéricas;
- (iv) Produzir adaptações de uma impressora 3D para o processo de bioimpressão 3D;
- (v) Analisar a viabilidade celular após a bioimpressão 3D e validar o funcionamento do equipamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos é um campo interdisciplinar que aplica aspectos da biologia, química, ciências dos materiais e engenharia para desenvolver substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função de um tecido ou órgão (Murphy; Atala, 2013; Khademhosseini; Langer, 2016; Groll *et al.*, 2016).

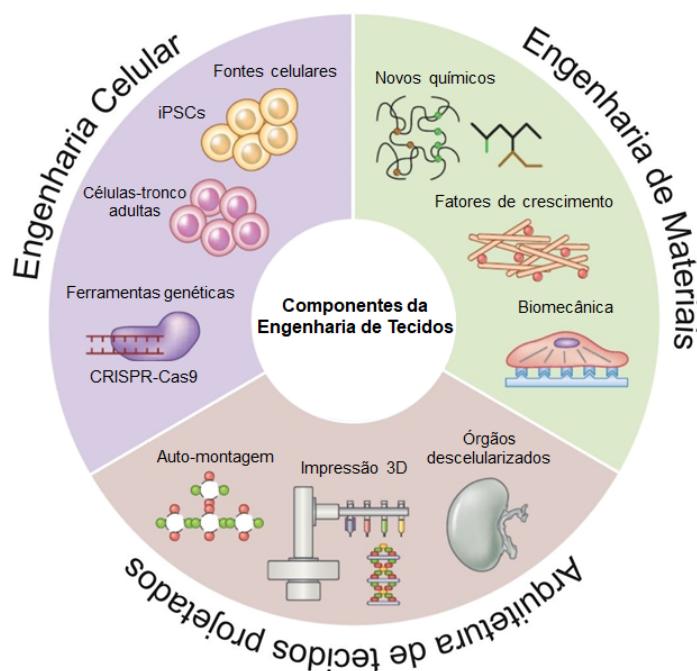
Essa área do conhecimento investiga a criação de tecidos celulares externamente ao organismo vivo e também como gerenciar melhor o reparo de tecidos dentro do corpo (McClelland *et al.*, 2005). O objetivo principal é ir além do tratamento e alcançar a cura, buscando a recuperação, regeneração ou criação de tecidos ou órgãos que falharam devido a acidentes, doenças ou anomalias congênitas (Bove *et al.*, 2021).

Resultados clínicos de sucesso foram alcançados na última década. Menasché *et al.* (2015) reportaram o primeiro adesivo cardíaco de fibrina carregado com células-tronco embrionárias humanas, modificado por engenharia de tecidos, implantado em humanos. Em um estudo clínico com 11 indivíduos, Gjerdeet *et al.* (2018) utilizaram fosfato de cálcio e células da medula óssea, expandidas *in vitro*, para induzir a formação óssea em tratamento ortodôntico.

Com o grande avanço nas duas últimas décadas, o conceito e o escopo da Engenharia de Tecidos expandiram-se (Zhang *et al.*, 2021). A principal aplicação deste campo é a construção dos substitutos para transplante *in vivo*, mas crescem também novas aplicações de tecidos biomiméticos *in vitro* e modelos de órgãos para criar bioatuadores e para o estudo farmacocinético e da patogênese das doenças (Chang; Nam; Sun, 2008a; Müller *et al.*, 2017; Ahadian; Khademhosseini, 2018). Além de reproduzir a estrutura e fisiologia do tecido *in vivo*, melhorando a previsão de respostas a drogas humanas, essa abordagem pode propor novas terapias e reduzir o número de animais usados para testes e pesquisas (Chandra; Soker; Atala, 2020).

Os conhecimentos da Engenharia de Tecidos também tem sido amplamente empregados na indústria da carne cultivada, produzida a partir do cultivo de células do tecido muscular. O aumento populacional, a preocupação com o bem-estar animal, bem como os riscos associados aos danos ambientais associados à pecuária extensiva geraram a necessidade de alternativas para obter carne, gordura e couro e tecidos sem animais (Mironov *et al.*, 2009; Ben-Arye; Levenberg, 2019; Sakaguchi *et al.*, 2021).

Figura 1 – Representação esquemática dos avanços nas duas últimas décadas que impulsionaram o desenvolvimento da Engenharia de Tecidos.



Fonte: adaptado de Khademhosseini *et al.* (2016).

Dentre os avanços que beneficiaram o desenvolvimento da Engenharia de Tecidos, apresentados na Figura 1, destacam-se os métodos para gerar células-tronco pluri-potentes induzidas (iPSCs), o desenvolvimento da mecanobiologia e a descoberta de que a rigidez do substrato pode modular a diferenciação de células-tronco, a conjugação de biomateriais eficientes e versáteis, e as novas tecnologias de biofabricação (Khademhosseini; Langer, 2016; Chandra; Soker; Atala, 2020). Caracterizada pelo uso de procedimentos automatizados para criar arranjos 3D de células (Groll *et al.*, 2019), a biofabricação, em especial a bioimpressão 3D, foi o objeto deste estudo e será abordada a seguir.

2.2 Biofabricação

Mironov *et al.* (2009) definiram a Biofabricação como “a produção de produtos biológicos complexos, vivos e não vivos, a partir de matérias-primas como células vivas, moléculas, matrizes extracelulares e biomateriais projetados”. Dentro da Engenharia de Tecidos, o termo Biofabricação refere-se ao uso de estratégias de fabricação 3D incorporando a manipulação e posicionamento de componentes celulares para mimetizar a composição e funcionalidade do tecido humano (Groll *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017).

Biologia Celular, Ciência dos Materiais e Engenharia Mecânica formam os principais pilares componentes da Biofabricação. A engenharia mecânica é fundamental para os processos e tecnologias de fabricação, em particular, para a fabricação aditiva camada por camada auxiliada por computador (Mironov *et al.*, 2009).

A abordagem convencional de Biofabricação é baseada no uso de *scaffolds* como matrizes para carregar células. Naturais ou sintéticos, os *scaffolds* são estruturas tridimensionais, sólidas e pré-fabricadas que servem como suportes temporários para as células se anexarem, migrarem, proliferarem, diferenciarem e secretarem uma matriz extracelular (Mironov *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2021). Além de biocompatíveis e seguros, os *scaffolds* devem ser porosos com poros interconectados (Gao; Cui, 2016).

As tecnologias utilizadas pela Engenharia de Tecidos para a biofabricação de *scaffolds* incluem eletrofição, evaporação de solvente, lixiviação salina, liofilização e a impressão 3D (Seol *et al.*, 2014; Chandra; Soker; Atala, 2020). No entanto, as abordagens convencionais baseadas em *scaffolds* são limitadas pela dificuldade de distribuição homogênea de células, biomateriais e moléculas bioativas dentro do sólido fabricado, comprometendo a precisa mimetização das microestruturas dos tecidos biológicos. Nesse sentido, a Bioimpressão 3D se destaca pela capacidade de controlar a distribuição e deposição de biotintas carregadas de células em locais definidos (Seol *et al.*, 2014; Colosi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2021).

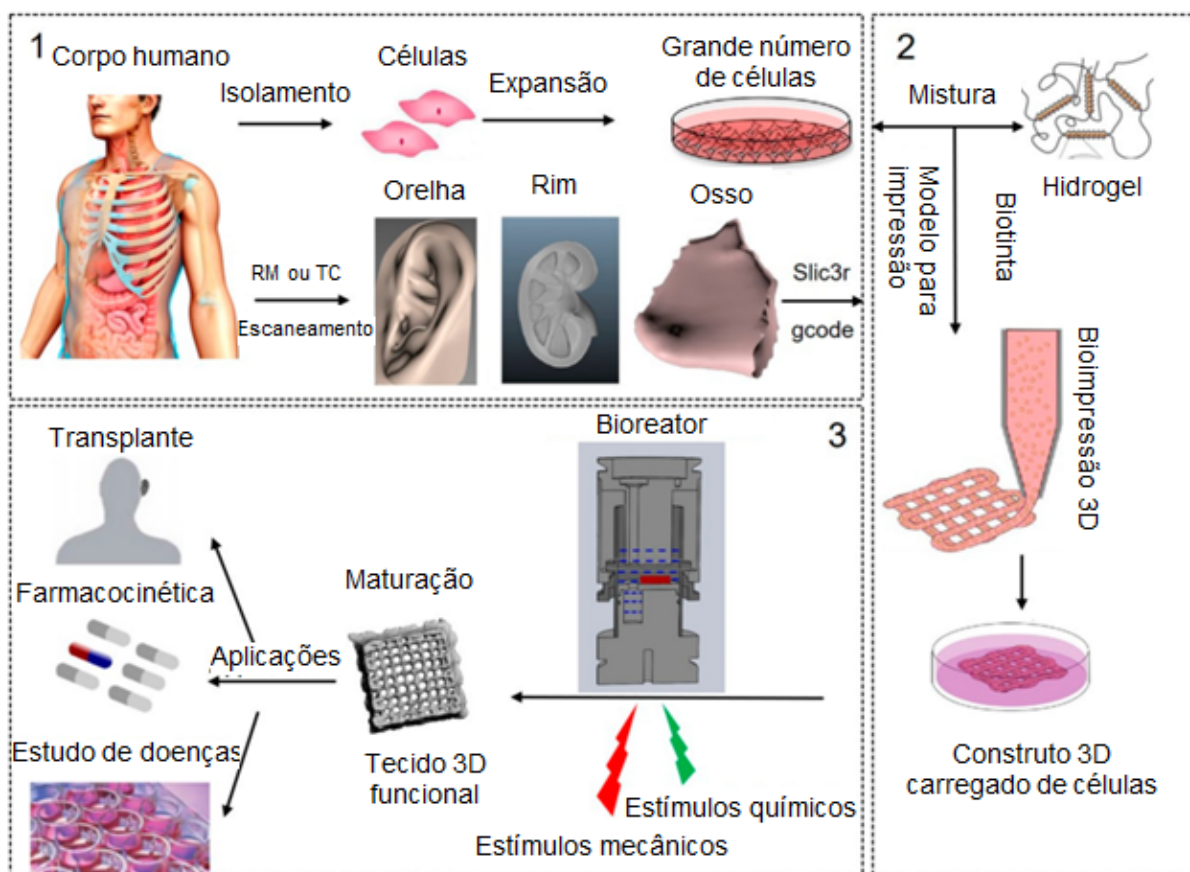
A biofabricação emprega tecnologias e processos automatizados para gerar produtos biológicos funcionais e para os subsequentes processos de maturação (Groll *et al.*, 2016). Um biorreator é geralmente utilizado para a maturação *in vitro* das estruturas tridimensionais fabricadas e carregadas de células. O biorreator simula o ambiente e a estimulação *in vivo* antes da implantação, controlando e modificando fatores como pH, temperatura, oxigenação e perfusão das células, bem como estímulos externos como tensão de cisalhamento e forças mecânicas (Gao; Cui, 2016; Zhang *et al.*, 2021).

Os recentes avanços na Biofabricação têm mostrado resultados promissores, mas as aplicações clínicas ainda encontram desafios e limitações quanto a fontes renováveis de células funcionais imunologicamente compatíveis; a biomateriais apropriados com propriedades mecânicas, químicas e biológicas desejadas; e a tecidos grandes, vascularizados e inervados, que possam se integrar facilmente ao sistema circulatório do hospedeiro com a complexidade arquitetônica dos tecidos nativos (Khademhosseini; Langer, 2016; Chandra; Soker; Atala, 2020).

2.3 Bioimpressão 3D

A impressão 3D é uma técnica de manufatura aditiva que está impulsionando inovações em diversas áreas, como arte, educação, engenharia e medicina (Murphy; Atala, 2014; Ahadian; Khademhosseini, 2018). Como abordagem de biofabricação, a bioimpressão 3D permite que biomateriais ou biomateriais carregados com células e fatores bioquímicos sejam depositados em padrões predefinidos, camada por camada, com preciso controle espacial, reproduzindo a estrutura e microarquitetura de tecidos nativos (Khademhosseini; Langer, 2016; Huang *et al.*, 2017; Chandra; Soker; Atala, 2020).

Figura 2 – Representação das etapas do processo de Bioimpressão 3D.

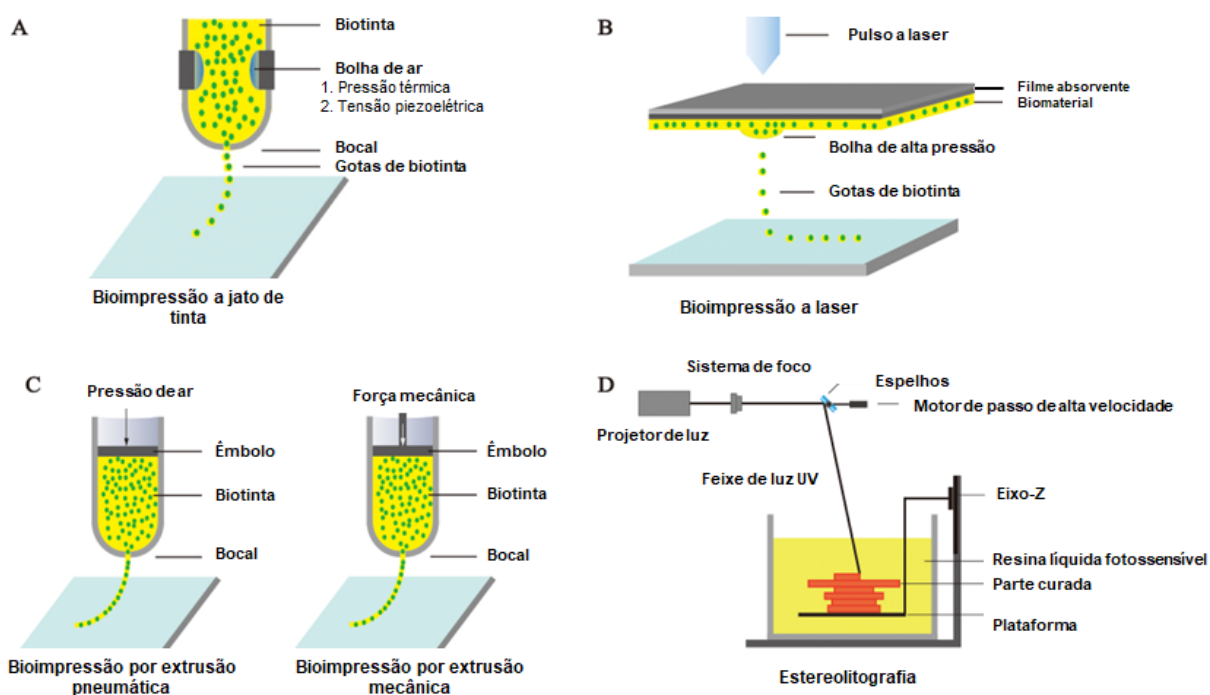


Fonte: adaptado de Zhang *et al.* (2021).

O procedimento de bioimpressão pode ser dividido nas fases de pré-processamento, processamento e pós-processamento, como ilustra a Figura 2. O pré-processamento envolve a criação do modelo digital da estrutura 3D para bioimpressão, a seleção de materiais adequados e o isolamento, cultivo e a expansão celular (Huang *et al.*, 2017; Angelopoulos *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Imagens de tecidos e órgãos podem ser obtidas por ressonância magnética (MRI) ou tomografia computadorizada (TC) e armazenadas em um arquivo de imagem digital e comunicações em medicina (DICOM) (Seol *et al.*, 2014; Zhang; Zhang, 2015). Ferramentas CAD-CAM são então utilizadas para criar o modelo 3D renderizado e com medidas específicas das dimensões (Murphy; Atala, 2014; Huang *et al.*, 2017). O modelo 3D é convertido em um arquivo STL, fatiado em finas camadas planas, com tamanho e orientação ajustáveis, e depois salvo como um código de fabricação que a impressora pode reconhecer e direcionar as deposições camada por camada, como o G-code (Murphy; Atala, 2014; Seol *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2021).

Figura 3 – Representação esquemática das principais técnicas adaptadas para bioimpressão 3D: (A) impressão a jato de tinta, (B) impressão a laser, (C) impressão baseada em extrusão, e (D) estereolitografia.



Fonte: adaptado de Huang *et al.* (2017)

Na etapa de processamento, a impressora carregada com biomateriais e células executa o código gerado para fabricar o tecido ou órgão. A impressão a jato de tinta, impressão por extrusão, impressão assistida por laser e a estereolitografia, ilustradas na Figura 3, são as principais técnicas adaptadas para bioimpressão 3D (Murphy; Atala, 2014; Gao; Cui, 2016; Huang *et al.*, 2017; Zhang; Wang, 2019) e serão apresentados com mais detalhes nas subseções a seguir, com especial enfoque dado à bioimpressão baseada em extrusão. A escolha do tipo de bioimpressão depende das necessidades específicas do projeto, das características dos biomateriais e do tipo de tecido que está

sendo desenvolvido. Cada uma dessas técnicas possui suas vantagens e desvantagens em termos de densidade e viabilidade celular, compatibilidade de biomateriais, resolução e custo (Murphy; Atala, 2014; Huang *et al.*, 2017).

As etapas de pós-impressão incluem a manutenção das construções carregadas de células em estufas para análises *in vitro* e/ou a maturação em biorreatores até um potencial transplante *in vivo* ou uso em aplicações alimentícias de carne cultivada (Murphy; Atala, 2014; Huang *et al.*, 2017; Angelopoulos *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

Em comparação com outras técnicas de biofabricação, a bioimpressão 3D tem vantagens como alta precisão e rápida velocidade de construção, capacidade de deposição simultânea de vários tipos celulares e diferentes biomateriais em localizações definidas (Zhang; Zhang, 2015; Zhang; Wang, 2019). Além disso, os modelos bioimpressos em 3D podem substituir a cultura celular 2D convencional, fornecendo profundidade espacial e melhorando as dinâmicas interações célula-célula e célula-matriz da fisiologia *in vivo* (Matai *et al.*, 2020).

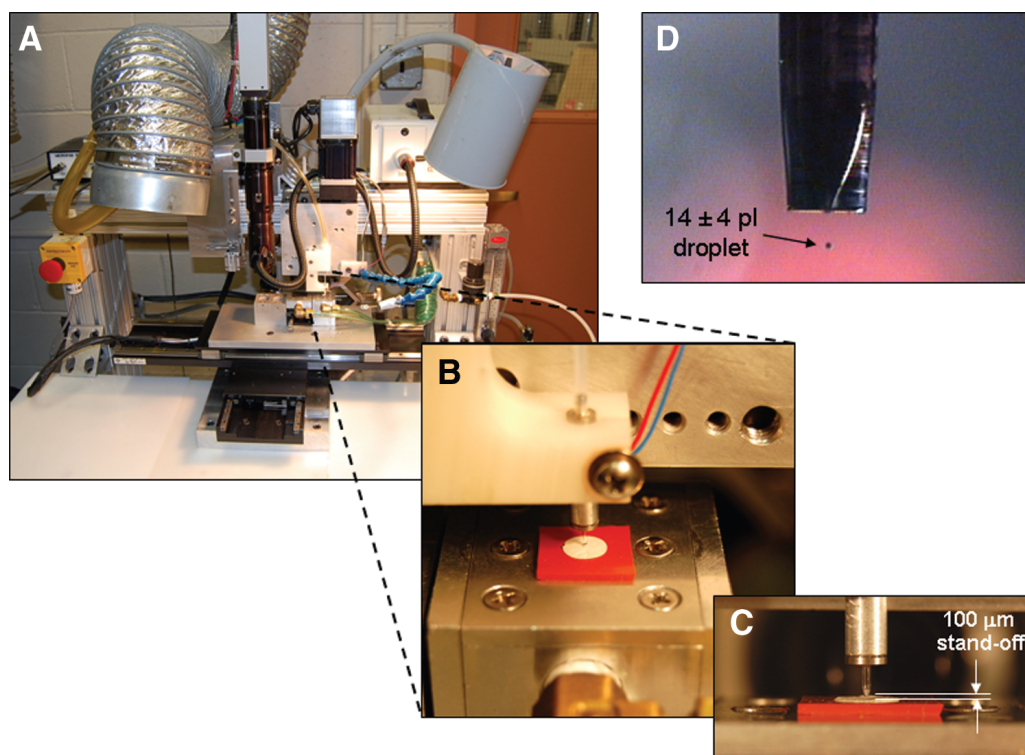
Apesar do rápido avanço da bioimpressão 3D nos últimos anos, a sua aplicação clínica ainda é significativamente limitada devido a desafios que ainda persistem. Na etapa de pré-processamento, os desafios incluem a seleção ou preparação adequada e padronizada de biomateriais, a incorporação celular às biotintas, a esterilização e garantia de ambientes assépticos (Zhang; Wang, 2019; Angelopoulos *et al.*, 2020). Na etapa de processamento, há desafios tecnológicos, que incluem a necessidade de maior resolução, com obtenção de uma maior precisão em relação ao modelo CAD, maior velocidade para fabricar construções de dimensões clinicamente relevantes e a comutação precisa de diferentes tipos de células e biomateriais para criar estruturas 3D multicelulares (Murphy; Atala, 2014; Colosi *et al.*, 2016; Emmermacher *et al.*, 2020). Quanto à viabilidade do construto a longo prazo, umas das principais dificuldades consiste na necessidade de criar inervações e redes vasculares interconectadas para garantir o suprimento de sangue e nutrientes nos tecidos impressos, bem como remover produtos residuais (Gao; Cui, 2016; Jia *et al.*, 2016; Matai *et al.*, 2020).

2.3.1 Bioimpressão a jato de tinta

Muito semelhante à impressão a jato de tinta 2D convencional, a bioimpressão a jato de tinta é uma técnica sem contato na qual gotículas de biotintas são depositadas em volumes bem definidos sobre um substrato, em posições determinadas previamente por um sistema CAD/CAM (Murphy; Atala, 2014; Zhang; Zhang, 2015; Gao; Cui, 2016; Matai *et al.*, 2020). Essa técnica pode ser categorizada pelo mecanismo usado para gerar a gota e os métodos mais amplamente utilizados são térmicos e piezoelétricos (Huang *et al.*, 2017; Matai *et al.*, 2020).

Bioimpressoras a jato de tinta térmicas utilizam o aquecimento localizado de até 300°C para gerar e colapsar pequenas bolhas de ar, que formam pulsos de pressão e ejetam gotículas de biotinta (Gao; Cui, 2016; Huang *et al.*, 2017). Em sistemas piezoelétricos, o pulso de pressão é gerado pela atuação de cristais piezoelétricos, que mudam de forma ao serem submetidos a variações de tensão e produzem uma onda acústica capaz de pressionar as gotículas biotinta para fora do bocal (Murphy; Atala, 2014; Matai *et al.*, 2020).

Figura 4 – Sistema de impressão a jato de tinta criado por Cooper *et al.* (2010).



Fonte: Cooper *et al.* (2010).

A bioimpressão a jato permite alterar o tamanho e a densidade da gota, tendo a capacidade de introduzir gradientes de concentração, e oferece vantagens como alta resolução e velocidade de impressão, e baixo custo. Os desafios dessa técnica estão relacionados ao entupimento do bocal, à dificuldade de direcionar as gotículas e alcançar altas densidades celulares e, principalmente, à seleção de biotintas compatíveis, limitada a materiais no estado líquido e de baixas viscosidades (Murphy; Atala, 2014; Zhang; Zhang, 2015; Huang *et al.*, 2017).

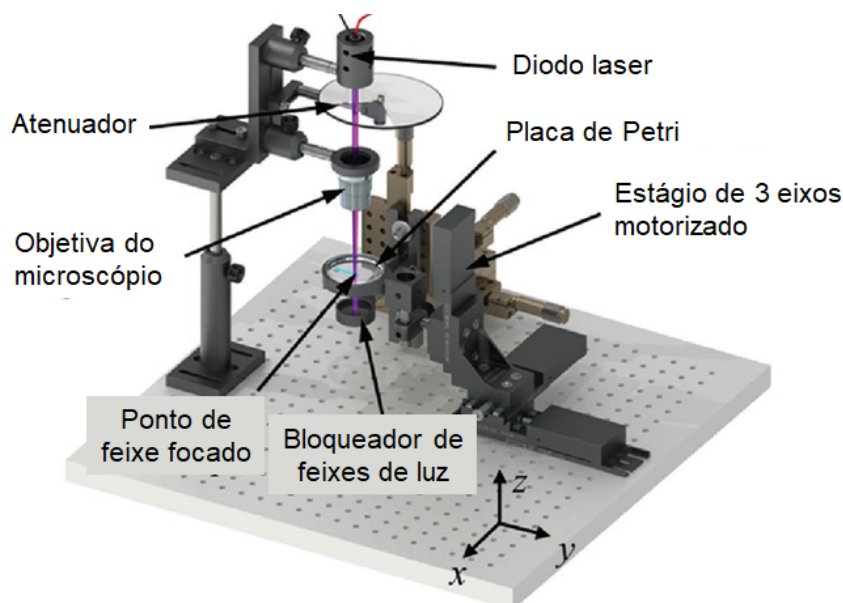
Grupos de pesquisa têm tentado desenvolver bioimpressoras 3D baseadas nesta técnica para diversos tecidos. Cooper *et al.* (2010) utilizaram uma impressora a jato de tinta piezoelétrica customizada, mostrada na Figura 4, para depositar fatores de crescimento dentro de *scaffolds* a serem semeados com células musculares. Para impressão de tecido cartilaginoso, Cui *et al.* (2012) desenvolveram uma plataforma de bioimpressão adaptada a partir de uma impressora de jato térmico convencional (HP Deskjet 500) e adicionaram uma lâmpada ultravioleta para fotopolimerização simultânea. Projetando microvasos, Hewes *et al.* (2017) utilizaram um bocal piezoelétrico para imprimir gotículas de alginato/fibrinogênio carregadas com células endoteliais.

2.3.2 Bioimpressão a laser

Baseada nos princípios da transferência direta induzida por laser, a bioimpressão 3D a laser (LAB) emprega um feixe de luz pulsada focado em uma camada de filme absorvente, formando uma bolha de alta pressão que impulsiona a biotinta em forma de gotículas na direção do substrato (Murphy; Atala, 2014; Zhang; Zhang, 2015; Huang *et al.*, 2017).

A resolução desta técnica é influenciada por fatores como a densidade de energia do laser, a molhabilidade do substrato, a tensão superficial e viscosidade da biotinta. Por não utilizar bocal, com LAB é possível depositar biotintas com alta densidade celular, não há problemas de entupimento, permitindo o uso de uma variedade de materiais, como hidrogéis e materiais cerâmicos, e evita o desgaste celular por cisalhamento, oferecendo alta viabilidade celular (Murphy; Atala, 2014; Gao; Cui, 2016; Zhang *et al.*, 2021). Entretanto, a baixa vazão e a preparação do filme metálico tornam a bioimpressão a laser demorada (Murphy; Atala, 2014; Huang *et al.*, 2017), o alto custo do equipamento é uma limitação para pesquisas e a influência da exposição ao laser nas células não foi totalmente investigada (Gao; Cui, 2016; Zhang *et al.*, 2021).

Figura 5 – Esquema 3D do sistema de impressão a laser utilizado por Wang *et al.* (2018).



Fonte: adaptado de Wang *et al.* (2018).

A bioimpressão a laser está sendo cada vez mais utilizada e desenvolvida. Keriquel *et al.* (2017) empregaram essa técnica para a bioimpressão *in situ*, isto é, diretamente sobre o defeito *in vivo* na calvária de camundongos, a fim de compreender como diferentes geometrias e distribuições celulares impactam na regeneração do tecido ósseo desses animais. Zhang *et al.* (2017) investigaram os efeitos na capacidade de impressão de uma biotinta viscoelástica carregada de células durante a bioimpressão a laser, enquanto Wang *et al.* (2018) propuseram, em pesquisas sobre câncer, o uso da bioimpressão direta a laser, combinando um fotoiniciador altamente reativo e biocompatível com um laser de onda contínua, mostrado na Figura 5.

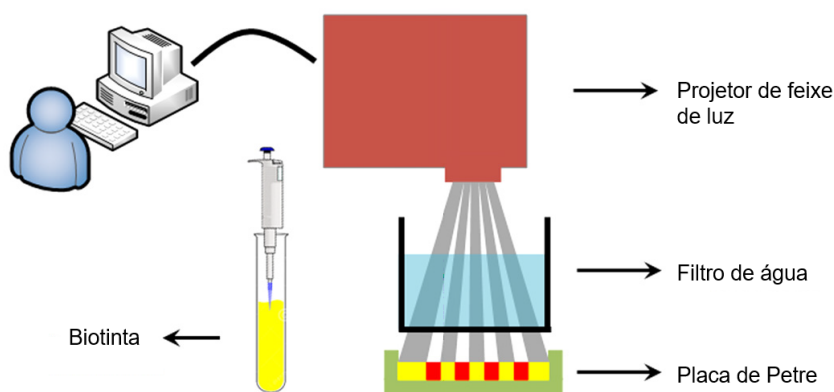
2.3.3 Estereolitografia

A estereolitografia (SLA) foi o primeiro método de impressão 3D desenvolvido e também encontrou aplicações na bioimpressão, principalmente para a fabricação de *scaffolds*. Para solidificar seletivamente materiais fotossensíveis camada por camada, essa técnica emprega um projetor de luz ultravioleta (UV) e microespelhos digitais que controlam a intensidade da luz (Murphy; Atala, 2014; Wang *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017).

Destaca-se pela alta resolução e precisão, permitindo a utilização de uma ampla variedade de materiais de engenharia junto a componentes bioativos e biomiméticos, mas sua aplicação com biotintas carregadas de células ainda é restrita, por implicar

em baixa resolução quando se utiliza luz visível ou possíveis efeitos mutagênicos e carcinogênicos quando se utiliza luz UV (Huang *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

Figura 6 – Representação esquemática do processo de impressão 3D baseado em estereolitografia de luz visível.



Fonte: adaptado de Wang *et al.* (2015).

Sistemas de bioimpressão de baixo custo baseados em estereolitografia também vêm sendo desenvolvidos nos últimos anos. Wang *et al.* (2015) utilizaram um projetor comercial com um filtro de água para evitar a radiação infravermelha prejudicial do projetor, mostrado na Figura 6, e imprimiram biotintas de PEGDA e GelMA carregadas com fibroblastos para demonstrar a viabilidade desse sistema. Zhou *et al.* (2016) usaram um equipamento de estereolitografia de mesa para a bioimpressão de matrizes ósseas e investigaram a interação entre células de câncer de mama e células do estroma ósseo.

2.3.4 Bioimpressão por extrusão

A bioimpressão por extrusão é a abordagem mais popular e tem as melhores perspectivas para a bioimpressão *in situ* (Zhang; Zhang, 2015; Matai *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). As biotintas são colocadas em seringas plásticas e podem ser dispensadas em substratos estéreis como filamentos cilíndricos contínuos por sistemas de acionamento pneumático ou mecânico (Murphy; Atala, 2014; Matai *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

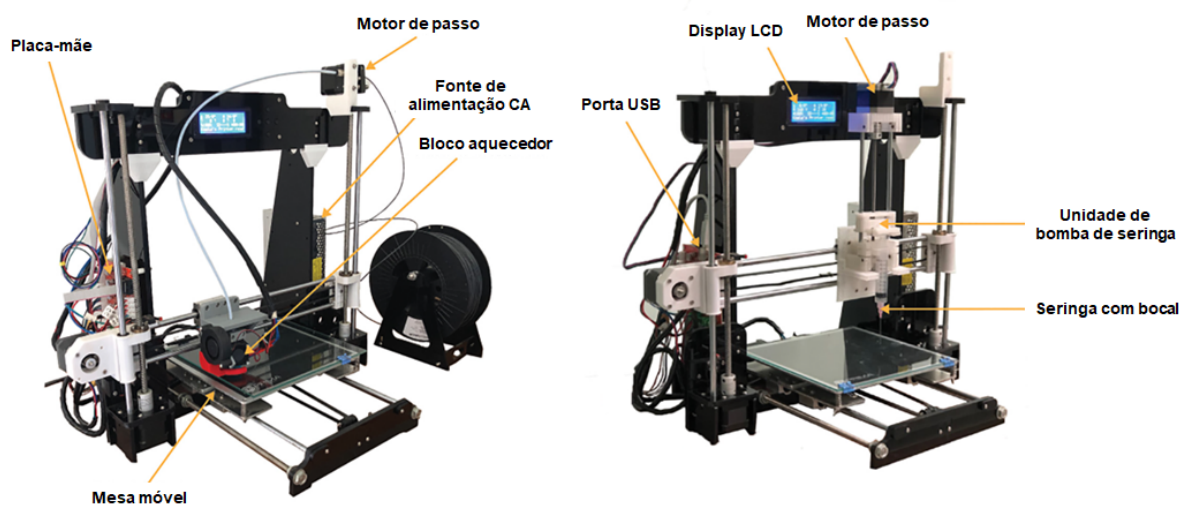
Os métodos mais comuns para extrusão de biotintas são sistemas de distribuição pneumáticos, que utilizam gás pressurizado para aplicar uma força contínua sobre um pistão ou diretamente sobre a biotinta, ou mecânicos, baseados no movimento de um pistão ou na rotação de um parafuso. Os sistemas de distribuição mecânica baseados em

parafuso oferecem maior controle espacial e são vantajosos na deposição de biotintas altamente viscosas. As impressoras acionadas pneumáticamente têm a vantagem de ter componentes de mecanismo de acionamento mais simples, com a força limitada apenas pelas capacidades de pressão de ar do sistema, mas podem sofrer com atraso do volume de gás comprimido. (Murphy; Atala, 2014; Matai *et al.*, 2020).

Ao aplicar uma força contínua, filamentos ininterruptos são depositados em duas dimensões, conforme orientação definida pelo sistema CAD-CAM, enquanto a mesa ou o cabeçote de extrusão é movido ao longo do eixo z, com a camada depositada servindo de base para a camada seguinte (Murphy; Atala, 2014; Zhang; Zhang, 2015). Após a bioimpressão, as construções podem ser reticuladas por luz, calor, enzimas ou agentes químicos para formar estruturas 3D mecanicamente estáveis (Zhang; Zhang, 2015; Matai *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

A bioimpressão baseada em extrusão permite deposição de biotintas com altas densidades celulares em velocidades de deposição médias a rápidas e tem compatibilidade com diferentes tipos de materiais, com uma ampla gama de viscosidades (Murphy; Atala, 2014; Zhang; Zhang, 2015; Gómez-Blanco *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). Essa abordagem também se destaca pela facilidade de operação e capacidade de alto rendimento (Liu *et al.*, 2017b; Ahadian; Khademhosseini, 2018). No entanto, a resolução da bioimpressão por extrusão é baixa, o entupimento do bocal ainda é um problema frequente e as células encapsuladas são expostas a tensões cisalhantes que podem reduzir a viabilidade celular (Zhang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021).

Figura 7 – A impressora 3D antes da conversão equipada com um extruso com bloco aquecedor e a bioimpressora 3D modificada por Ioannidis *et al.* (2020).

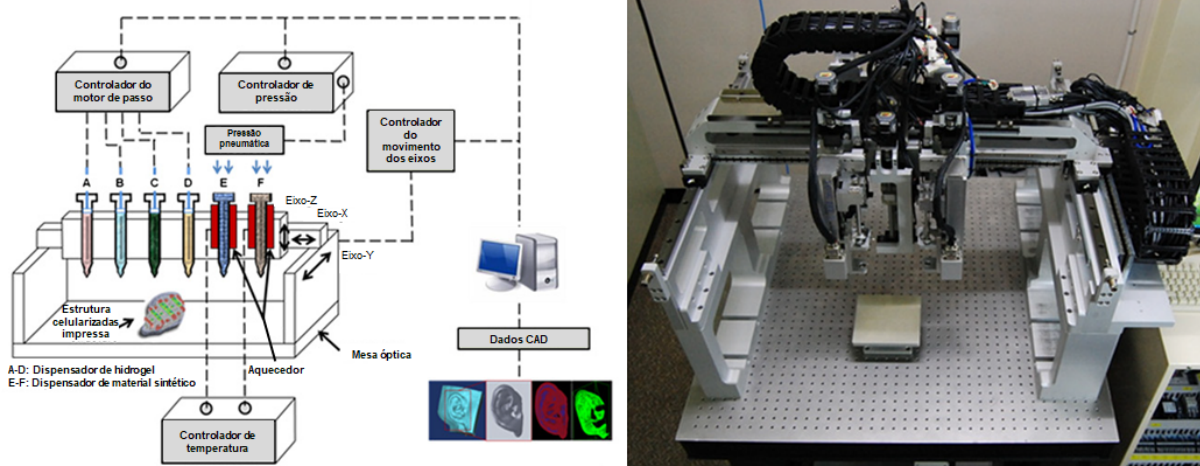


Fonte: adaptado de Ioannidis *et al.* (2020).

As vantagens apresentadas por esta abordagem contribuem para que ela seja a tecnologia de impressão 3D comercial mais utilizada nos últimos anos (Huang *et al.*, 2017; Gómez-Blanco *et al.*, 2020). Atualmente, uma variedade de bioimpressoras estão disponíveis comercialmente, como a Cellink BioX® 3D printer, Gesim Bioscaffolder®, Allevi 3D e a Corning® Matribot® Bioprinter. Apesar disso, muitos grupos de pesquisa optam por criar seus próprios dispositivos (Tarassoli *et al.*, 2021).

Ainda que o custo da bioimpressão baseada em extrusão seja baixo em comparação com as demais abordagens (Liu *et al.*, 2017a; Wang *et al.*, 2021), os equipamentos comercializados atualmente ainda possuem preço elevado para as aplicações em pesquisa. Buscando superar este problema, Ioannidis *et al.* (2020) converteram uma impressora 3D convencional (DIY Anet A8 Prusa i3), baseada em deposição fundida, em uma bioimpressora 3D, mostrada na Figura 7. Os autores demonstraram a funcionalidade do equipamento imprimindo biotintas de alginato e gelatina carregadas com células-tronco. Apesar do sucesso utilizando agulhas com diâmetro de 0,26 mm, a bioimpressora não foi capaz de fornecer a pressão necessária para a extrusão com diâmetros menores (Ioannidis *et al.*, 2020).

Figura 8 – Representação esquemática e foto do sistema multicabeçote construído por Lee *et al.* (2014).

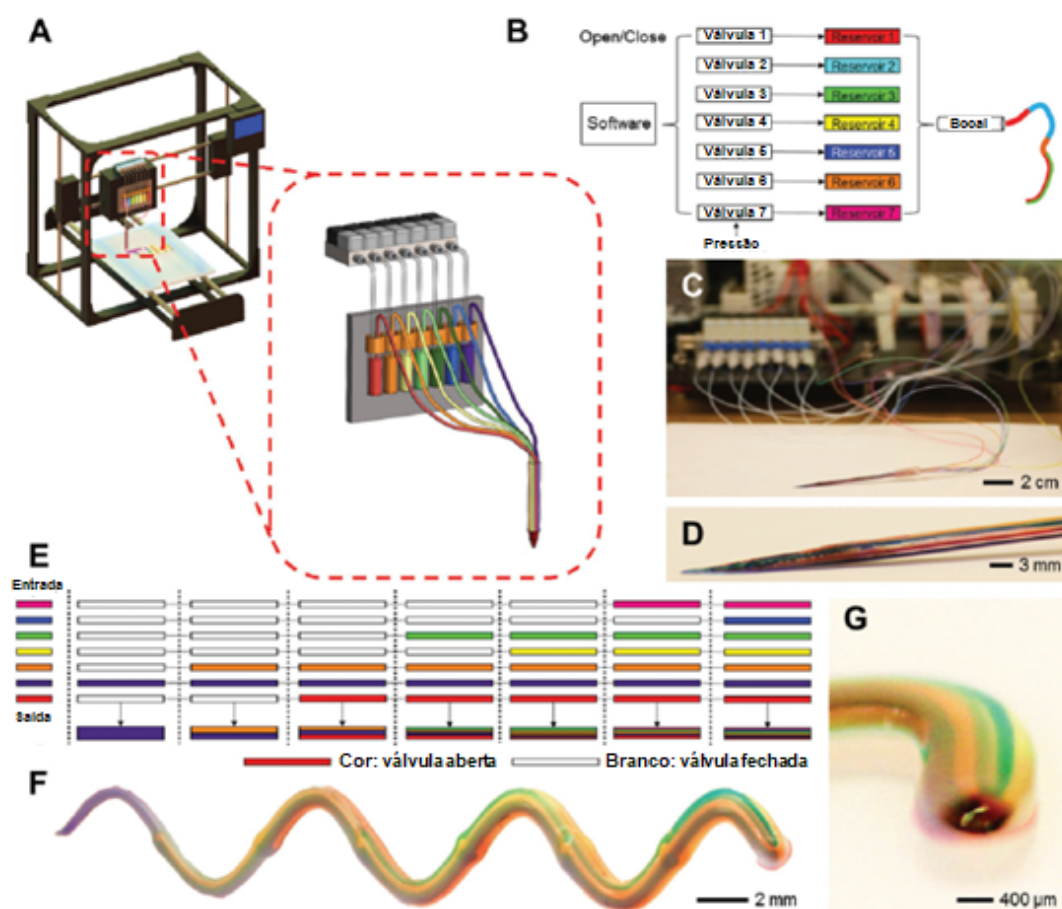


Fonte: adaptado de Lee *et al.* (2014).

Bioimpressoras de extrusão têm sido equipadas com múltiplos cabeçotes de impressão que permitem a deposição de diferentes biotintas com mínima contaminação cruzada, facilitando a distribuição em série de vários materiais sem necessidade de remonta-gens ou reprogramações e aumentando a complexidade das construções (Murphy; Atala, 2014; Frost *et al.*, 2019; Matai *et al.*, 2020). Nesse sentido, utilizando um sistema multicabeçote de construção de tecidos/órgãos (MtoBS) com pistão pneumático

e capacidade para seis seringas montadas e controladas individualmente, mostrado na Figura 8, Lee *et al.* (2014) imprimiram hidrogéis carregados com diferentes células derivadas do tecido adiposo para formar uma estrutura em formato de orelha e ainda puderam incluir uma tinta de biomaterial sacrificial para estruturar a geometria.

Figura 9 – Representação da bioimpressora de extrusão multimaterial contínua sintonizável digitalmente com sete canais conectados a reservatórios acionados individualmente por válvulas pneumáticas programáveis.



Fonte: adaptada de Liu *et al.* (2017b).

Apesar do potencial de expansão desta abordagem utilizando um número maior de cabeçotes, a velocidade do processo é inevitavelmente reduzida em função da comutação mecânica entre os bicos fisicamente separados. Por isso, Liu *et al.* (2017b) propuseram uma plataforma de bioimpressão por extrusão multimaterial capaz de ejetar continuamente diferentes tipos de biotintas individual ou simultaneamente, como mostrado na Figura 9. Com um único cabeçote de impressão contendo sete canais de tamanhos iguais conectados a reservatórios, os autores ajustaram a pressão pneumática e da duração do disparo das válvulas de controle para obter biotintas com diferentes viscosidades e comandar padrões de distribuição com mais rápida alternância (Liu *et al.*, 2017b).

2.4 Biotintas

Biotintas são formulações contendo células e adequadas para processamento utilizando uma tecnologia automatizada de biofabricação. Essas formulações podem ou não incluir biomateriais e componentes biologicamente ativos, como fatores de crescimento, DNA, miRNA, citocinas e exossomos (Groll *et al.*, 2019). Por outro lado, o termo tinta de biomateriais é utilizado para se referir à precursores de hidrogéis que, após o procedimento de fabricação, podem ser utilizados para semeadura celular ou estudos *in vivo* (Groll *et al.*, 2019; Matai *et al.*, 2020).

O uso de biotintas carregadas de células possibilita a impressão do tecido em uma única etapa, bem como a distribuição homogênea dessas células dentro da estrutura (Göhl *et al.*, 2018). As células podem ser incluídas nas biotintas em diferentes ambientes e formas, como células únicas, agregadas em esferoides, organizadas em minittecidos ou organoides (Groll *et al.*, 2019). Derivadas de fontes eticamente aceitáveis e com o potencial de serem mantidas em cultura indefinidamente, as células usadas nas biotintas podem ser células-tronco, primárias ou células já especializadas, com base no tecido ou órgão de interesse (Murphy; Atala, 2013; Matai *et al.*, 2020).

As células-tronco são promissoras para aplicações em engenharia de tecidos devido à sua capacidade de diferenciação e autorrenovação, gerando múltiplos fenótipos celulares funcionais específicos, mas essas células são mais propensas aos estímulos ambientais (Murphy; Atala, 2013; Frost *et al.*, 2019; Matai *et al.*, 2020). São vários os tipos de células-tronco para engenharia de tecidos humanos usados em processos de bioimpressão 3D baseados em extrusão, como células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (hASCs) (Pati *et al.*, 2014); células-tronco derivadas de líquido amniótico humano (Kang *et al.*, 2016); e principalmente células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MSCs) (Jia *et al.*, 2016; Daly *et al.*, 2016; Ioannidis *et al.*, 2020). As células primárias representam uma boa escolha para a bioimpressão baseada em extrusão de tecidos únicos, mas essas células não são resistentes a grandes períodos de tempo em cultura (Gonçalves, 2020; Matai *et al.*, 2020).

A formação do tecido é influenciada pela densidade celular da biotinta. O processo de bioextrusão aplicará algumas forças às células que podem comprometer a sua viabilidade e, nesse sentido, espera-se que a alta densidade inicial de células na construção bioimpressa leve a uma formação de tecido mais rápida, mas esse parâmetro pode afetar significativamente as propriedades da biotinta (Hölzl *et al.*, 2016; Matai *et al.*, 2020).

2.4.1 Biomateriais para Biotintas

A seleção adequada de materiais para biotintas é um fator-chave para a fabricação de tecidos funcionais através da bioimpressão 3D. Os biomateriais aplicados à bioimpressão devem replicar as funções biológica e mecânica da matriz extracelular e fornecer às células o ambiente certo para proliferar, migrar, diferenciar e formar tecidos (Murphy; Atala, 2013; Ahadian; Khademhosseini, 2018; Chandra; Soker; Atala, 2020). Os materiais adotados devem, então, ser compatíveis com sistemas biológicos, proteger as células contra estresses mecânico e térmico durante a impressão e considerar possíveis alterações a longo prazo devido a interação com o material (Murphy; Atala, 2014; Hölzl *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2021). Outra propriedade importante é a biodegradabilidade do material, uma vez que as células ancoradas tridimensionalmente dentro do biotinta começam a secretar a própria matriz e formar o tecido (Kang *et al.*, 2016; Zhang; Wang, 2019).

Além das propriedades biológicas, a funcionalidade dos tecidos e órgãos impressos depende das propriedades reológicas e mecânicas da biotinta, como viscosidade, tensão superficial e capacidade de reticulação (Zhang; Wang, 2019; Matai *et al.*, 2020). Cada tecido e abordagem de bioimpressão têm seus requisitos ideais em relação às propriedades da biotinta e podem exigir parâmetros específicos (Hölzl *et al.*, 2016; Göhl *et al.*, 2018). No caso da bioimpressão baseada em extrusão, a biotinta deve possuir propriedades reológicas adequadas para suportar o processo com baixas forças de cisalhamento impostas às células e ao mesmo tempo manter a fidelidade da forma pós-impressão e com rigidez suficiente para manuseio e implantação (Huang *et al.*, 2017; Tarassoli *et al.*, 2021).

Após a bioimpressão, o material deve ter estabilidade a curto prazo para garantir que estruturas como poros, canais e redes não entrem em colapso (Murphy; Atala, 2014). Nesse sentido, as biotintas aplicam frequentemente biomateriais reticuláveis por luz UV ou ionicamente para reforçar mecanicamente as estruturas impressas (Ahadian; Khademhosseini, 2018; Jongprasitkul *et al.*, 2022).

As biotintas baseadas em polímeros naturais apresentam boa biocompatibilidade e se assemelham mais ao microambiente da matriz extracelular, favorecendo a fixação e proliferação celular e secreção de matriz própria. (Murphy; Atala, 2014; Tarassoli *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Por outro lado, os polímeros sintéticos podem ter as propriedades físico-químicas adaptadas e controladas para atender os requisitos da bioimpressão por extrusão e conter proteínas bioativas que respondem a estímulos externos (Murphy; Atala, 2014; Chandra; Soker; Atala, 2020; Tarassoli *et al.*, 2021).

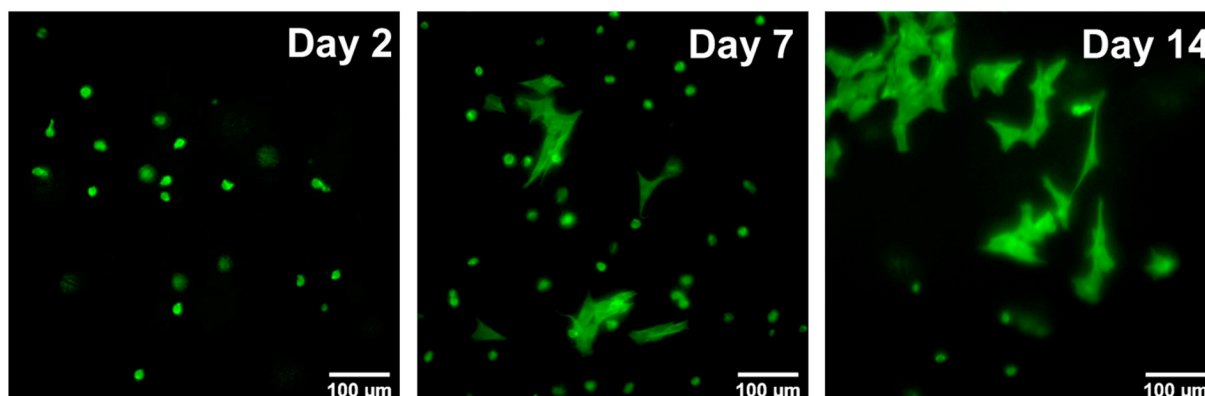
As biotintas utilizadas em bioimpressões baseadas em extrusão incluem biomateriais baseados em polímeros naturais, como alginato (Lee *et al.*, 2014; Paxton *et al.*, 2017; Poley, 2020), agarose (Daly *et al.*, 2016) e ácido hialurônico (Ngo *et al.*, 2020); polímeros sintéticos, como polietilenoglicol diacrilato (PEGDA) (Joas *et al.*, 2018; Frost *et al.*, 2019) e policaprolactona (PCL) (Lee *et al.*, 2014; Poley, 2020); e matrizes de tecidos descelularizadas (Pati *et al.*, 2014). Em uma revisão sistemática, Tarassoli *et al.* (2021) identificaram que as composições a base de alginato e PCL são as biotintas mais utilizadas na bioimpressão por extrusão, seguidas de gelatina e gelatina metacrilatada (GelMA), e que o uso combinado de materiais sintéticos e naturais tem crescido.

Com o grande progresso recente, uma variedade de tintas comerciais para bioimpressão 3D estão disponíveis no mercado, como a Gel4Cell® OsteoInk® Lifeink® 200, HumaTein™ PeptilInks® e CELLINK® Bioink. Projetada para imprimir modelos de tecido humano com qualquer sistema de bioimpressão 3D, a CELLINK® Bioink é composta por polissacarídeos não derivados de animais e contém 0,5% (p/p) alginato e 2% (p/p) de nanofibras de celulose altamente hidratadas (Avila *et al.*, 2016). Essa composição foi patenteada pela UPM-Kymmene Corporation e CELLINK AB, tem reticulação química rápida e é adequada para a engenharia de tecidos moles, cartilagosos, enxertos ósseos e modelos de câncer de fígado (Hölzl *et al.*, 2016; CELLINK, 2023b).

Utilizando bocais com diferentes geometrias e diâmetros, Bahrd (2017) avaliou a viabilidade celular em estruturas bioimpressas com a CELLINK™ Bioink carregadas com células-tronco humanas da papila apical (SCAP) e encontrou de 37 a 53% de sobrevivência após o bioimpressão. No entanto, do primeiro ao sétimo dia pós-impressão, as células mantiveram formato esférico e propriedades aderentes não foram evidenciadas (Bahrd, 2017).

Boulaoui *et al.* (2022) avaliaram o efeito da bioimpressão na viabilidade de células musculares da linhagem C2C12 encapsuladas em CELLINK™ Bioink a uma densidade de 5×10^6 células/ml. Os autores relataram que as estruturas impressas apresentaram viabilidade celular entre 77% e 82% após 4h da bioimpressão. Em relação à morfologia, as células C2C12 tinham forma esférica 2 dias após a bioimpressão, mas algumas células começaram a se espalhar e apresentar morfologia fusiforme, como mostra a Figura 10, em análises feitas 7 e 14 dias depois (Boulaoui *et al.*, 2022).

Figura 10 – Alterações morfológicas de células C2C12 ao longo do tempo em construto impresso com CELLINK™ Bioink.



Fonte: Boularaoui *et al.* (2021).

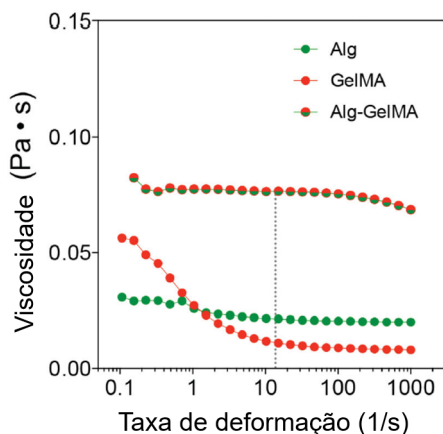
2.4.2 Comportamento reológico de biotintas

As formulações de biotintas com propriedades mecânicas e reológicas adequadas para formar impressões estáveis geralmente apresentam ambiente desfavorável à migração e proliferação celular (Hölzl *et al.*, 2016; Matai *et al.*, 2020). Materiais altamente viscosos podem fornecer suporte estrutural para o construto, mas o aumento associado da tensão cisalhante pode causar danos às células e entupir o bocal. Materiais de baixa viscosidade fornecem ambiente adequado para manter a viabilidade celular, mas os filamentos tendem a se espalhar e colapsar após deposição (Hölzl *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2018).

Determinada pela temperatura, tipo, concentração e peso molecular do polímero, a viscosidade é uma medida da resistência de um fluido ao escoamento e determina qual a taxa de deformação gerada ao aplicar uma dada tensão de cisalhamento (White, 2011; Zhang *et al.*, 2021). As biotintas precisam ter valores de viscosidade suficientes para permitir o escoamento através dos bicos de impressão e manter a capacidade de formar filamentos retendo a geometria após a deposição (Hölzl *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2017; Poley, 2020).

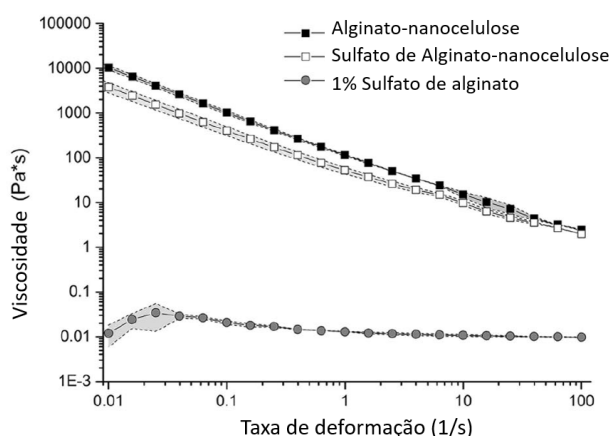
Biomateriais como alginato, como mostra a Figura 11, são bastante utilizados em composições de biotintas, mas geralmente exibem baixa viscosidade e comportamento newtoniano em baixas taxas de cisalhamento (Colosi *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2017). Para aumentar a viscosidade e a capacidade de impressão de hidrogéis contendo alginato, nanofibras de celulose vêm sendo combinadas às soluções e, como mostra a Figura 12, dominam o comportamento reológico (Müller *et al.*, 2017; Frost *et al.*, 2019).

Figura 11 – Comparação da viscosidade de alginato e GelMA e a combinação de ambos.



Fonte: adaptado de Colosi *et al.* (2016).

Figura 12 – Combinação de alginato com nanocelulose e uma solução de sulfato de alginato.



Fonte: adaptado de Müller *et al.* (2017).

O tipo e a densidade celular são fatores importantes que podem afetar as propriedades das biotintas, principalmente em formulações poucas viscosas. Guillotin *et al.* (2010) estudaram o efeito da viscosidade de biotintas compostas de meios de cultura suplementados com alginato e células de carcinoma de coelho, B16, em uma concentração de 4×10^7 células/ml, e encontraram que essa densidade celular aumentou em 20% a viscosidade da solução de alginato a 1% (p/v). Por outro lado, ensaios de reometria com biotintas de ácido hialurônico com e sem células PC-12 não resultaram em uma diferença significativa na viscosidade para uma densidade de 10^6 células/ml (Ngo *et al.*, 2020).

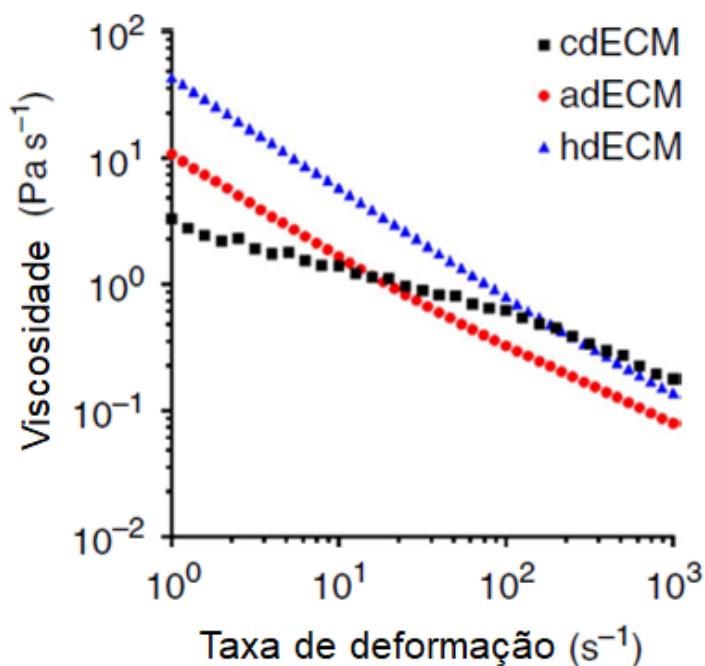
Emmermacher *et al.* (2020) não encontraram diferenças reológicas para uma biotinta composta alginato, metilcelulose e agarose carregada com células-tronco mesenquimais humanas imortalizadas a uma densidade de 2×10^7 cell/ml. Por outro lado, para as células de manjeriço, que são maiores e agregadas, em concentrações de 0,1 a 0,4 g de biomassa por grama de biotinta, tiveram um efeito considerável nos valores de viscosidade da biotinta composta dos mesmos biomateriais (Emmermacher *et al.*, 2020). Esses resultados indicam que a densidade celular pode influenciar o comportamento reológico a depender do tipo de célula e biomateriais escolhidos.

2.4.2.1 Pseudoplasticidade

Na bioimpressão por extrusão, a biotinta é armazenada em uma seringa com diâmetro relativamente grande, então a camada limite onde atuam as forças cortantes não tem espessura relevante, uma vez que a grande maioria das células não estará nessa região. Porém, há uma grande redução do diâmetro ao passar pela agulha e a for-

mulação sofrerá cisalhamento em uma extensão expressiva. Nesse sentido, muitos autores destacam a importância da propriedade de pseudoplasticidade, caracterizada pela diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação ou da tensão aplicada (Hözl *et al.*, 2016; Paxton *et al.*, 2017; Joas *et al.*, 2018; Groll *et al.*, 2019; Poley, 2020; Ngo *et al.*, 2020; Gómez-Blanco *et al.*, 2020; Tarassoli *et al.*, 2021).

Figura 13 – Propriedades reológicas das tintas preparadas a partir de dECM de cartilagem (cdECM), dECM de coração (hdECM) e dECM adiposo (adECM).

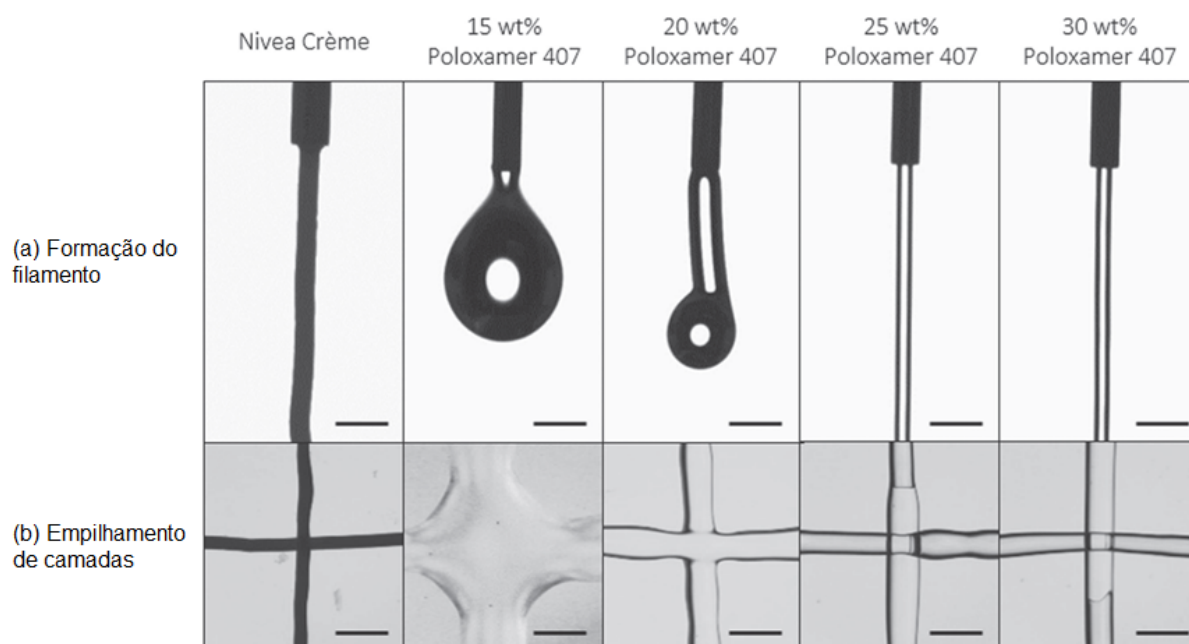


Fonte: adaptado de Pati *et al.* (2014).

Esse comportamento desejado para materiais submetidos a extrusão já foi observado em microambientes similares ao celular, como mostra a Figura 13. Ensaios reológicos indicaram que tintas baseadas em matrizes extracelulares descelularizadas (dECM) apresentam pseudoplasticidade na faixa de taxa de cisalhamento de 1 a 1000 s⁻¹ (Pati *et al.*, 2014).

Utilizado como tinta de demonstração em procedimentos de impressão 3D por extrusão, o Nivea® Creme também apresentou comportamento pseudoplástico em análises reológicas apresentadas por Paxton *et al.* (2017) e Tu *et al.* (2022). Esse creme corporal é capaz de formar filamentos consistentes e manter a estrutura da geometria impressa sem colapsar, e suas propriedades foram usadas como referência para a produção tintas projetadas para ter a mesma capacidade de impressão (Paxton *et al.*, 2017; Tu *et al.*, 2022).

Figura 14 – Comparação da formação de (a) filamentos e (b) camadas para amostras de Nivea Crème e diferentes composição de poloxamer 407.



Fonte: adaptado de Paxton *et al.* (2017).

Após a deposição, as forças cisalhantes desaparecem e a viscosidade do material deve aumentar rapidamente para manter a estabilidade e fidelidade à forma da estrutura impressa (Joas *et al.*, 2018; Groll *et al.*, 2019). Assim, a cinética de recuperação da viscosidade da biotinta após o cisalhamento e a tensão de escoamento também são importantes para garantir a sustentação (Joas *et al.*, 2018).

2.4.2.2 Ensaios mecânicos e reológicos

As propriedades das biotintas podem ser mensuradas por meio de ensaios de reometria. Para medir a tensão de escoamento do fluido, isto é, a tensão de cisalhamento inicial necessária para o fluido começar a escoar, um método comum é a extrapolação da curva de escoamento. Nesse caso, aplica-se uma rampa de taxa de deformação para obter a tensão de cisalhamento, assim o ponto de escoamento é calculado, por meio de uma regressão linear, tomando a interseção da curva com o eixo da ordenada (Nguyen; Boger, 1992; Nascimento, 2007).

A tensão de escoamento também pode ser medida aplicando uma rampa de tensão de cisalhamento. Analisando em escala logarítmica a curva da taxa de deformação em função da tensão de cisalhamento, o ponto de escoamento é definido pelo ponto de inflexão da curva, associado a um aumento repentino da taxa de deformação (Nas-

cimento, 2007; Emmermacher *et al.*, 2020). Alguns autores indicam também a análise do diagrama de viscosidade em função da tensão de cisalhamento, utilizada neste trabalho. Nesse caso, a tensão de escoamento é definida como o ponto de interseção entre duas regressões lineares na região de platô e regiões de queda de viscosidade, que indicam quando o material começou a escoar (Paxton *et al.*, 2017; Tu *et al.*, 2022).

Para verificar as propriedades de pseudoplasticidade, o teste mais amplamente empregado consiste na medição da viscosidade em função de taxas de deformação controladas em cisalhamento rotacional (Pati *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2016; Paxton *et al.*, 2017; Joas *et al.*, 2018; Frost *et al.*, 2019).

Para a cinética de recuperação da viscosidade, medições da viscosidade da biotinta são feitas em três situações: sob uma baixa taxa de deformação por um período de tempo, seguida de uma alta taxa aplicada por um segundo período e, por fim, uma taxa de cisalhamento reduzida é aplicada durante mais um intervalo de tempo (Paxton *et al.*, 2017; Poley, 2020; Jongprasitkul *et al.*, 2022).

A dependência da viscosidade em relação ao tempo e à temperatura também podem ser investigadas. Pode-se manter a biotinta em uma dada tensão de cisalhamento ou taxa de deformação durante um período de tempo, com temperatura constante, para avaliar a ocorrência de tixotropia ou reopexia (NASCIMENTO, 2007). Da mesma forma, rampas ou degraus de temperaturas podem ser utilizados para avaliar biotintas termorresponsivas (Poley, 2020).

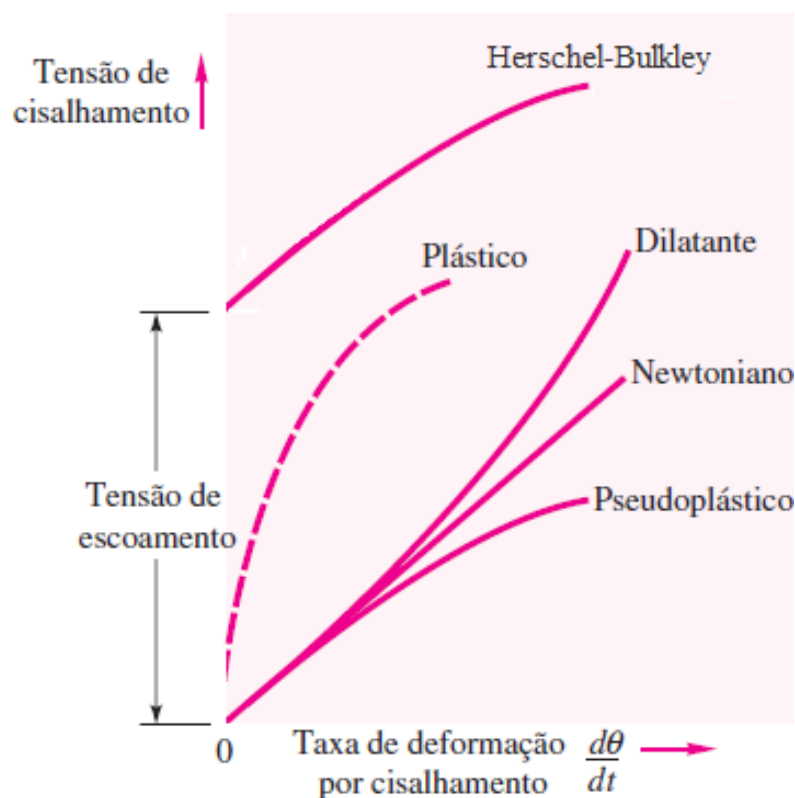
Alguns autores também caracterizam a tensão superficial do material, para avaliar se há formação de gotas ou filamentos (Gómez-Blanco *et al.*, 2020; Tu *et al.*, 2022). E, após a bioimpressão e reticulação, as propriedades do material também podem ser avaliadas. Tarassoli *et al.* (2021) apontam a variabilidade nos tipos de testes biomecânicos utilizados para caracterizar biotintas apresentadas na literatura. Para tecidos ósseos e cartilagosos, testes de compressão são os mais aplicados, enquanto o módulo elástico é mais investigado em bioimpressões de tecidos moles, como tecidos musculares e vasculares (Tarassoli *et al.*, 2021).

2.4.2.3 Modelos constitutivos

Durante o escoamento de um fluido, como ocorre no processo de extrusão, a viscosidade estabelece a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação do fluido. Se essa relação é linear e independente do tempo, dependendo apenas do material e sua temperatura e pressão, o valor da viscosidade é constante e o fluido é denominado Newtoniano. Se essa relação não é constante, o fluido é dito não-Newtoniano. Os fluidos não-Newtonianos podem ser classificados em dependentes e independentes do tempo e viscoelásticos.

Também chamados "puramente viscosos" ou "inelásticos", os materiais independentes do tempo são indiferentes à duração e ao histórico da cinemática do cisalhamento e não apresentam recuperação elástica parcial após deformação (Chhabra; Richardson, 2008). A representação da curva de escoamento para fluidos newtoniano e não newtonianos de propriedades independentes do tempo de cisalhamento está apresentada na Figura 15.

Figura 15 – Curvas de escoamento de fluidos newtoniano e não newtonianos de propriedades independentes do tempo de cisalhamento.



Fonte: adaptado de White *et al.* (2011).

Modelos matemáticos desenvolvidos para fluidos não-newtonianos independentes do tempo são amplamente empregados na literatura para caracterizar biotintas e tintas de biomateriais utilizadas em processos de bioimpressão por extrusão.

O modelo de Ostwald-de-Waele ou Lei de Potência, apresentado na Equação 1, vem sendo bastante utilizado para descrever a viscosidade de biotintas com comportamento pseudoplástico (Dharmadasa, 2016; Müller *et al.*, 2017; Frost *et al.*, 2019; Gómez-Blanco *et al.*, 2020; Jongprasitkul *et al.*, 2022).

$$\mu = K \left(\frac{du}{dr} \right)^{(n-1)} = K(\dot{\gamma})^{(n-1)} \quad (1)$$

onde μ é a viscosidade aparente, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, K é o índice de consistência da Lei de Potência e n é o expoente da Lei de Potência, que consiste no índice de comportamento e indica o quanto o fluido se desvia do modelo newtoniano.

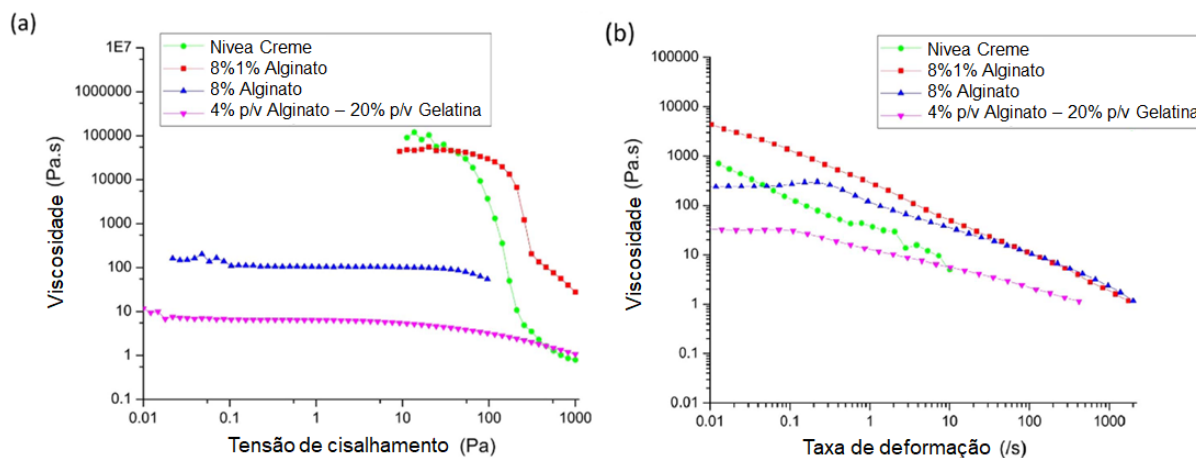
Para calcular a tensão de cisalhamento na parede de bocais retos e estreitos gerada pelo escoamento de diferentes biotintas, alguns autores utilizaram o modelo da Lei de Potência combinado com a Lei de Hagen-Poiseuille e obtiveram a relação apresentada Equação 2 (Blaeser *et al.*, 2016; Suntornnond *et al.*, 2016; Paxton *et al.*, 2017; Distler *et al.*, 2020; Trucco *et al.*, 2021).

$$\tau_{\text{wall}} = K \left(\frac{\dot{Q}(1/n + 3)}{\pi R^3} \right)^n \quad (2)$$

onde τ_{wall} é a tensão de cisalhamento na parede do bocal, \dot{Q} é a vazão volumétrica, R é o raio do bocal e K e n são os índices da Lei de Potência.

Paxton *et al.* (2017) aplicaram o modelo da Lei de Potência à curva de escoamento do Nivea Creme para estimar seu grau de pseudoplasticidade, como mostra a Figura 16 e calcularam a tensão de cisalhamento considerando índices iguais a $n = 0,552$ e $K = 26,1 \text{ Pa.s}^n$.

Figura 16 – Viscosidade do Nivea Creme e formulações de alginato e gelatina: (a) Rampa de tensão de cisalhamento e (b) Rampa de taxa de deformação.



Fonte: adaptado de Paxton *et al.* (2017)

Composta por alginato e nanofibras de celulose, a CELLINK® Bioink apresenta propriedades pseudoplásticas consistentes (CELLINK, 2023b). O primeiro modelo matemático para o comportamento reológico de formulações similares a CELLINK Bioink foi apresentado por Müller *et al.* (2017) que modelou uma solução com 1% de sulfato de alginato e 1,36% de nanocelulose como um fluido não-newtoniano em escoamento incompressível e que segue a Lei de Potência, com índices $n = 0,0863$ e $K = 56,503 \text{ Pa.s}^n$.

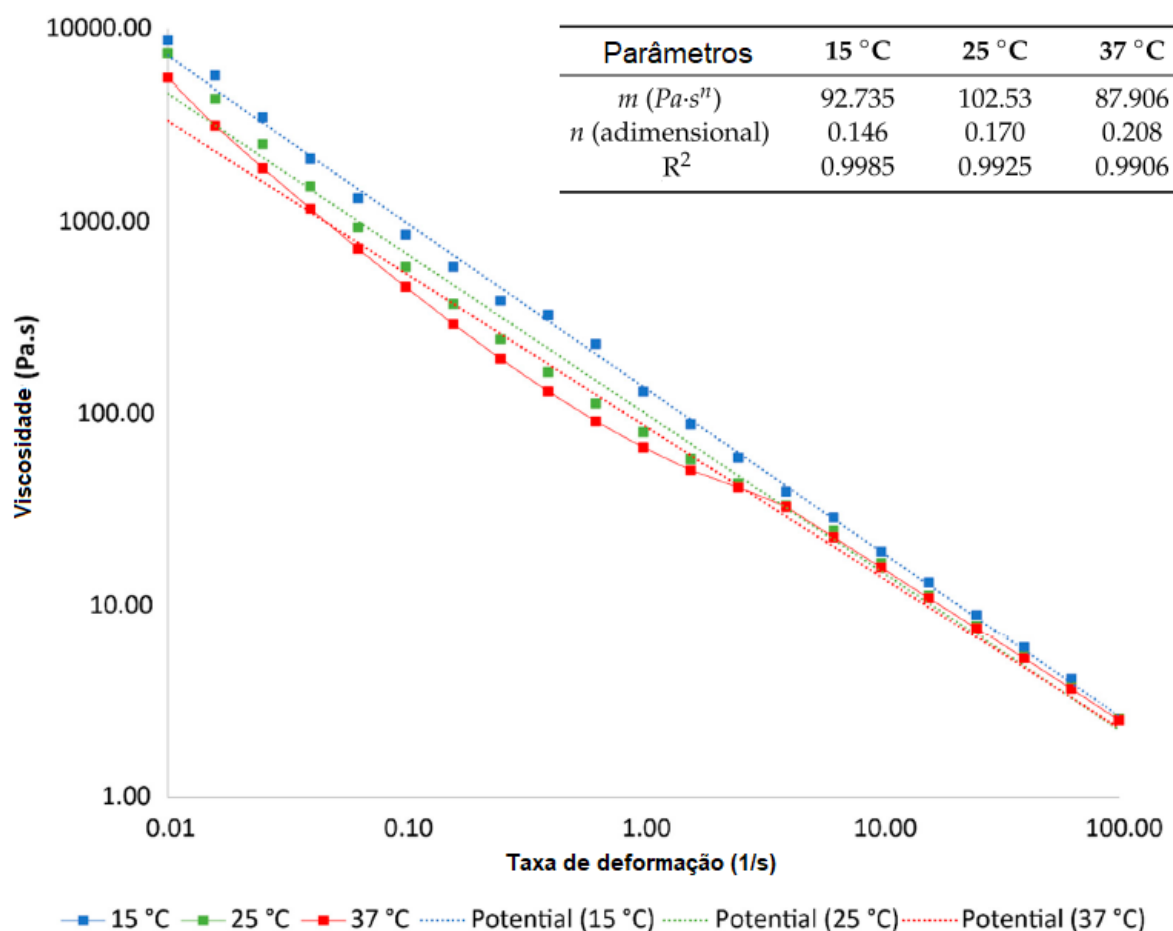
Para avaliar por meio de simulação computacional como a temperatura influencia a tensão de cisalhamento e os parâmetros de impressão da CELLINK® Bioink, Gómez-Blanco *et al.* (2020) ajustaram a Lei de Potência às curvas de escoamento da tinta a 15, 25 e 37°C e obtiveram os índices mostrados na Figura 17. Os autores declararam que os dados das curvas de escoamento foram fornecidas pela empresa.

O modelo Herschel-Bulkley, também chamado Bingham Generalizado, foi empregado para biotintas que demonstraram precisar de uma tensão inicial para começar a escoar e está apresentado na Equação 3 (Sarker; Chen, 2017; Joas *et al.*, 2018; Emmermacher *et al.*, 2020).

$$\tau = \tau_0 + K \left(\frac{du}{dr} \right)^n \quad (3)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento, τ_0 é a tensão de escoamento, K é o índice de consistência Herschel–Bulkley e n é o índice de comportamento Herschel–Bulkley.

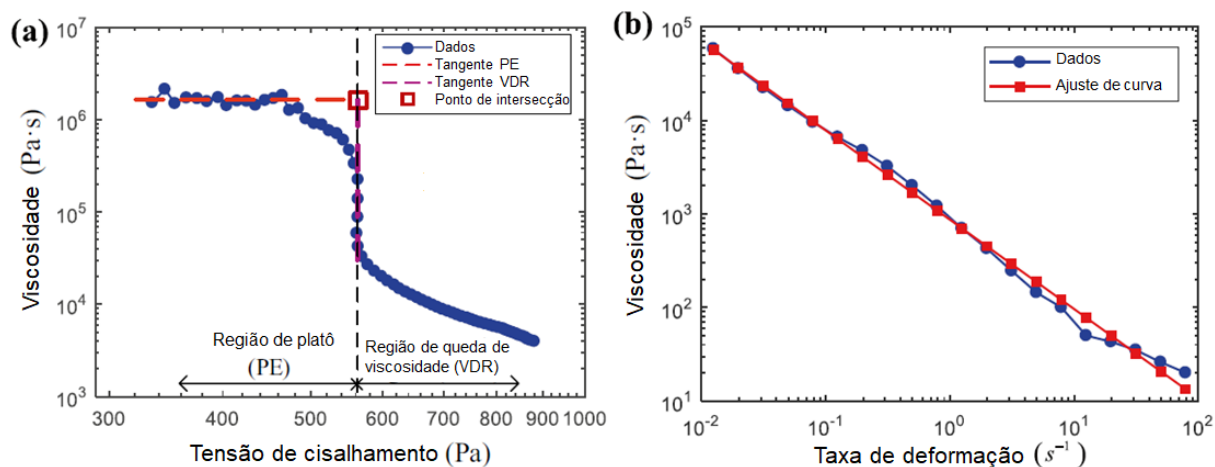
Figura 17 – Viscosidade da CELLINK® Bioink em função da taxa de deformação sob diferentes temperaturas.



Fonte: adaptado de Gómez-Blanco *et al.* (2020).

Apesar de não ter empregado o modelo Herschel-Bulkley, Paxton *et al.* (2017) relataram uma tensão de escoamento, $\tau_0 = 72,1$ Pa, para o Nivea Creme. Em um dos primeiros trabalhos abordando as propriedades reológicas desse creme, Schulz *et al.* (2008) propuseram uma adaptação à um reômetro rotacional buscando medir tensões de escoamento para valores muito baixos de taxa de deformação. Por considerá-lo um material complexo com comportamento não-linear e/ou tensão de escoamento, os autores utilizaram Nivea Crème para testar o protótipo e realizar a adaptação, incorporando suas propriedades reológicas na malha do circuito de controle do motor. Nos testes com diferentes velocidades angulares, foram encontrados valores de tensão de escoamento entre 200 e 350 Pa (Schulz; Sierro; Nijman, 2008).

Figura 18 – Viscosidade do Nivea Creme: (a) Rampa de tensão de cisalhamento e (b) Rampa de taxa de deformação.



Fonte: adaptado de Tu *et al.* (2022).

Tu *et al.* (2022) utilizaram o modelo Herschel–Bulkley para descrever o comportamento do Nivea Creme e avaliar numericamente a fidelidade dos filamentos formados. A partir das curvas mostradas na Figura 18, os autores encontraram expressiva tensão de escoamento, $\tau_0 = 563$ Pa, e índices iguais a $n = 0,045$ e $K = 867,02$ Pa·s^{*n*}.

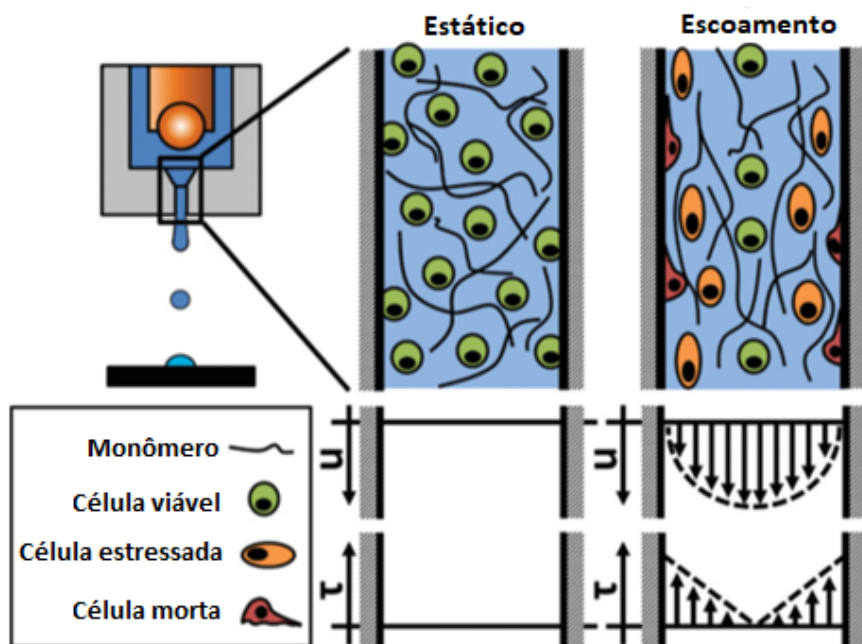
2.5 Parâmetros de impressão

2.5.1 Viabilidade Celular

Durante o escoamento da biotinta, devido ao gradiente de velocidade próximo à parede do bocal, as células podem ser submetidas a elevadas tensões de cisalhamento e sofrer deformações (Li *et al.*, 2015). Se essas tensões forem excessivas, como ilustrado na Figura 19, as membranas das células ficam sobrecarregadas e danificadas a ponto não sobreviverem ao processo, impactando a viabilidade celular da construção bioimpressa (Li *et al.*, 2010; Blaeser *et al.*, 2016).

Além da magnitude da tensão de cisalhamento, estudos que utilizaram reômetros para submeter biotintas carregadas com células animais ou vegetais ao cisalhamento diferentes períodos revelaram que a duração da exposição à tensão também é um parâmetro crítico (Li *et al.*, 2010; Emmermacher *et al.*, 2020).

Figura 19 – Tensões que incidem sobre as células dentro dos bocais de impressão.

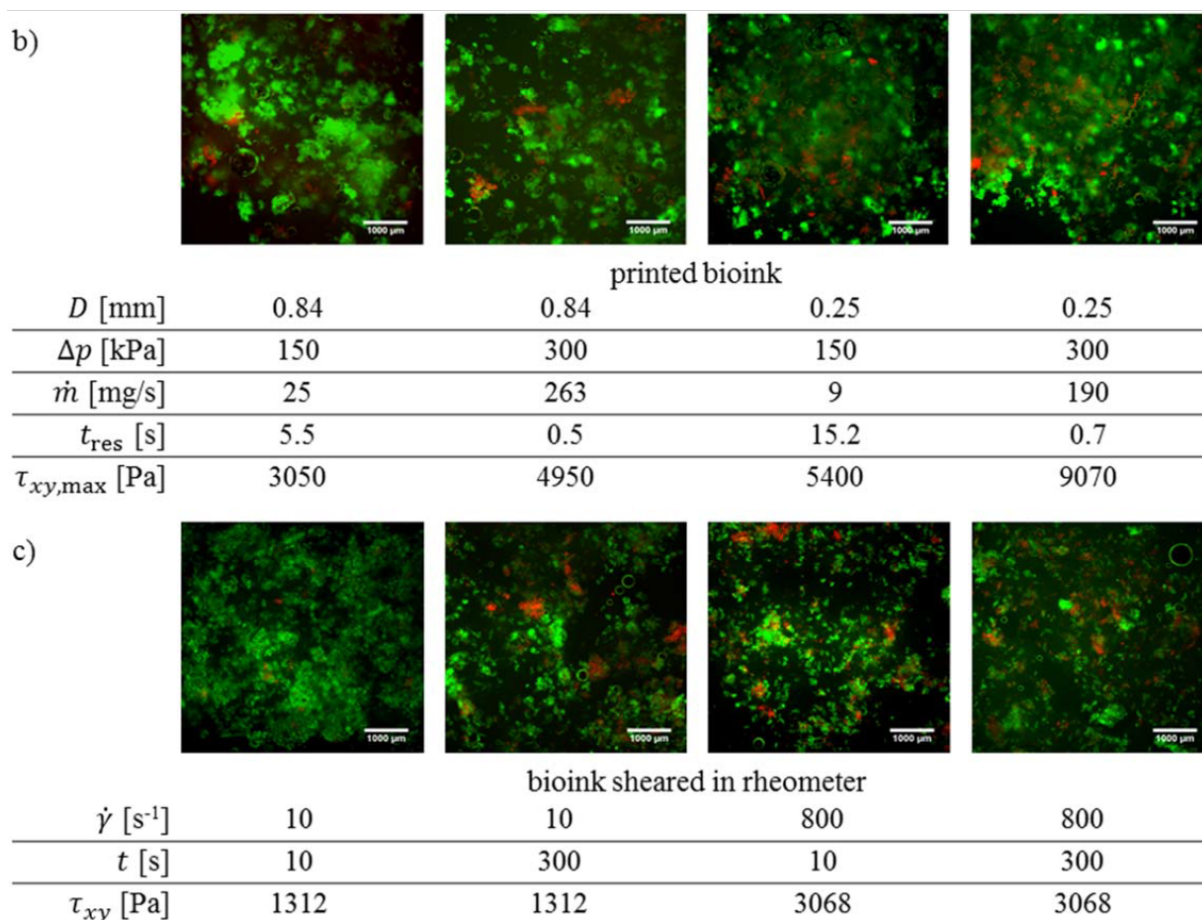


Fonte: adaptado de Blaeser *et al.* (2016).

A sensibilidade ao cisalhamento durante o processo de extrusão é afetada pelo tamanho e pela forma das células utilizadas na biotinta. Em geral, células maiores, dependendo da espécie e do tipo, tendem a ser mais sensíveis ao cisalhamento, enquanto células mais esféricas mostram menor sensibilidade, devido às diferenças em seus citoesqueletos e membranas (Emmermacher *et al.*, 2020).

Emmermacher *et al.* (2020) testaram a viabilidade de células-tronco mesenquimais humanas imortalizadas e células vegetais de manjeriço, após bioimpressão e cisalhamento no próprio reômetro, como mostra a Figura 20. Os autores concluíram que a tensão de cisalhamento máxima na impressão não deve exceder 1,3 kPa. Para células animais, valores de tensão maiores têm sido reportados na literatura.

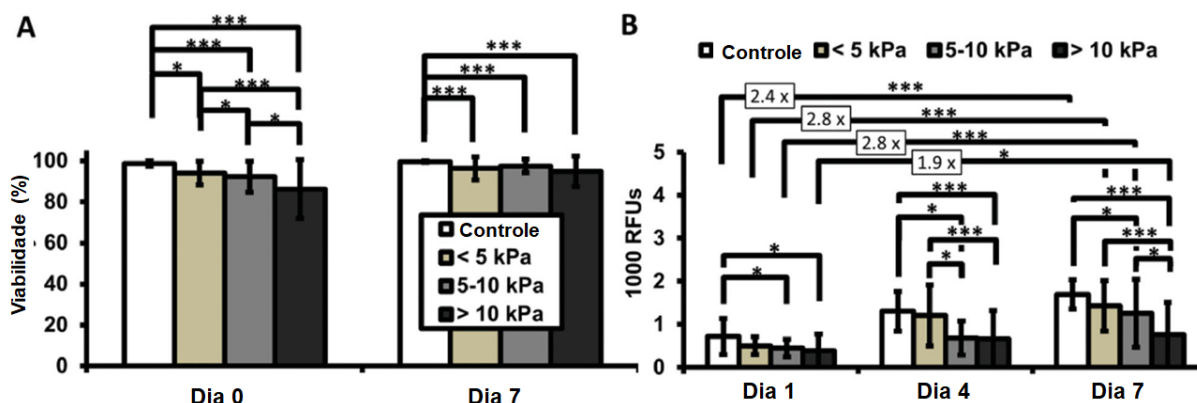
Figura 20 – Viabilidade da cultura de células de manjeriço em biotinta composta por alginato, metilcelulose e agarose após impressão por extrusão e cisalhamento no reômetro sob diferentes valores de tensão e tempo de exposição.



Fonte: adaptado de Emmermacher *et al.* (2020).

Blaeser *et al.* (2016) avaliaram a viabilidade de fibroblastos de camundongo (L929) e células-tronco mesenquimais humanas (hMSC), separadamente misturadas com alginato a densidade de 1×10^6 células/ml, e concluíram que tensões abaixo de 5kPa tiveram um impacto mínimo na viabilidade celular. Os autores observaram ainda que, apesar da diminuição imediata da viabilidade após a impressão sob tensões mais elevadas, houve um aumento para 95-97% após 7 dias, como mostra a Figura 21a. Quanto ao potencial de proliferação, como mostra a Figura 21b, observaram a redução significativa quando as células foram submetidas a tensões acima de 10 kPa (Blaeser *et al.*, 2016).

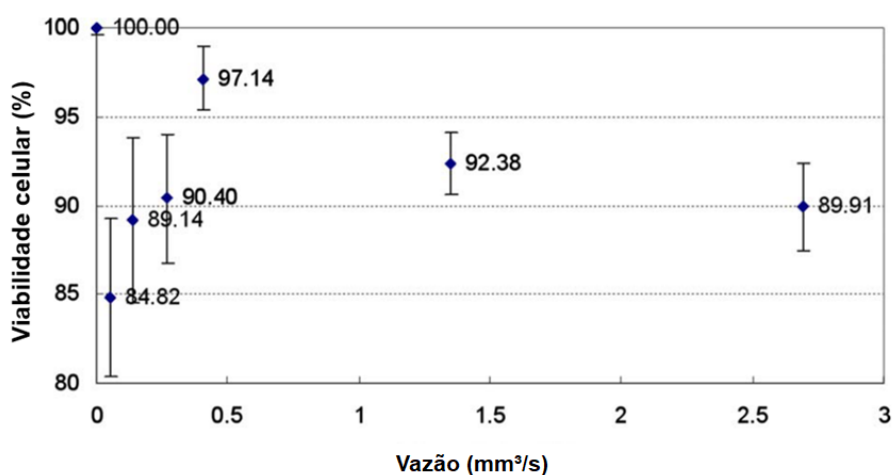
Figura 21 – Impacto de curto e longo prazo de diferentes níveis de tensão de cisalhamento na viabilidade e proliferação de células-tronco mesenquimais humanas.



Fonte: adaptado de Blaeser *et al.* (2016).

A tensão de cisalhamento depende da viscosidade da biotinta e é diretamente influenciada por parâmetros de impressão como vazão e diâmetro do bocal (Blaeser *et al.*, 2016; Daly *et al.*, 2016; Paxton *et al.*, 2017). O aumento da pressão de extrusão sobre biotintas de alginato, que provoca um aumento da vazão, está associado à diminuição da viabilidade celular em medições feitas imediatamente após a bioimpressão (Chang; Nam; Sun, 2008b; Nair *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010).

Figura 22 – Viabilidade celular em função da vazão volumétrica para biotinta composta de quitosana e gelatina com 1×10^7 células/ml.



Fonte: adaptado de Cheng *et al.* (2008).

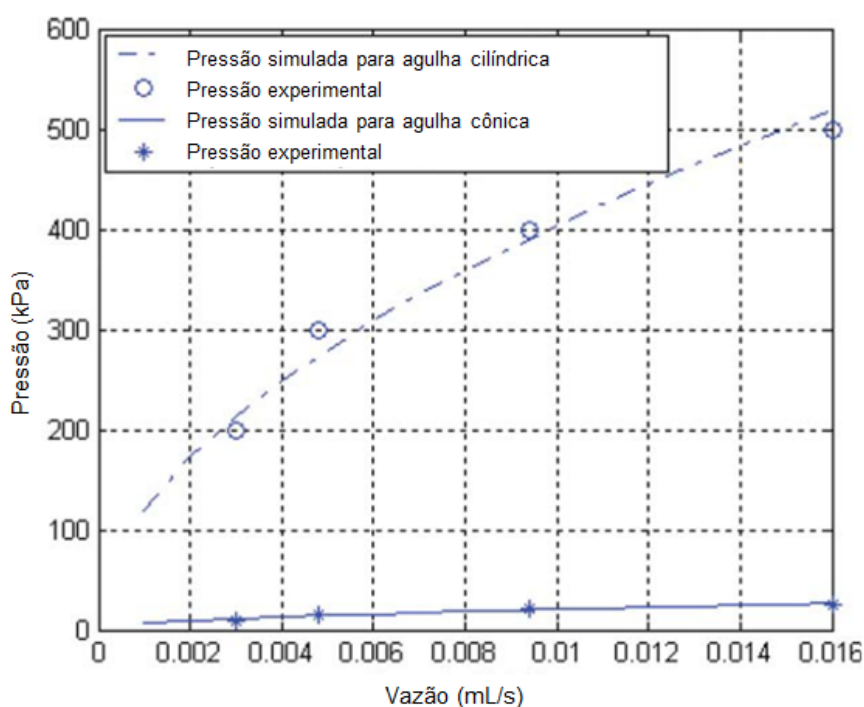
Cheng *et al.* (2008) utilizaram biotintas de gelatina e quitosana carregadas com hepatócitos a uma densidade 1×10^7 células/ml para avaliar a influência sobre a viabilidade celular da vazão volumétrica, que variou entre 0,2 e 20 mm³/s. Os autores encontraram que houve um aumento da viabilidade celular à medida que a vazão aumentava até 0,5

mm³/s, quando atingiu seu máximo (97%) e, então, começou a diminuir gradualmente (Cheng *et al.*, 2008), como mostrado na Figura 22.

A velocidade de movimento do conjunto extrusor no plano também pode induzir forças adicionais de compressão ou de tração sobre os filamentos depositados no substrato. Altas velocidades podem levar a uma força de tração mais elevada sobre a biotinta entre o bocal e o substrato, enquanto velocidades baixas demais podem ser compressivas (Chang; Nam; Sun, 2008b).

Em relação ao diâmetro do bocal extrusor, para agulhas retas, a diminuição do diâmetro está associada a uma significativa diminuição da viabilidade celular imediatamente após a bioimpressão (Chang; Nam; Sun, 2008b; Nair *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010). Por outro lado, sob as mesmas condições de impressão, o uso de agulhas cônicas reduz o dano infligido às células (Li *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017a).

Figura 23 – Pressões de ar necessárias para obter as mesmas vazões em bocais com pontas cilíndricas e cônicas.

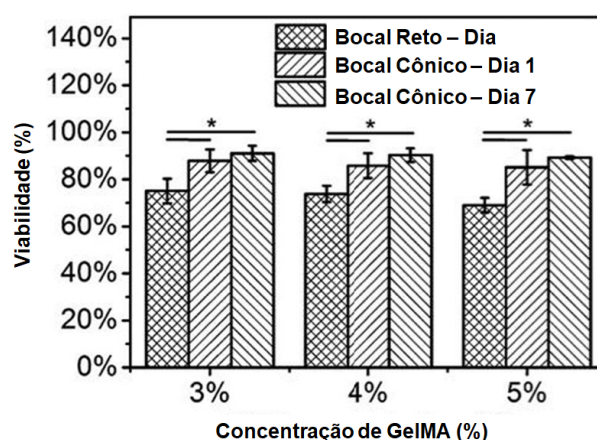


Fonte: adaptado de Li *et al.* (2011).

Li *et al.* (2011) investigaram o impacto da geometria da agulha (25G) na vazão e no dano de células Schwann e fibroblastos 3T3 em processos de bioimpressão baseados em extrusão. O uso de agulhas cônicas levou a vazões muito mais altas sob as mesmas condições de pressão do que as agulhas retas e, para vazões equivalentes, provocou menor dano celular, como mostrado na Figura 23.

Liu *et al.* (2017a) avaliaram a influência da geometria do bocal de impressão sobre a viabilidade celular, utilizando biotintas compostas por géis físicos de gelatina metacrilóil (GelMA) e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), com densidade de 4×10^6 células/ml. Quando uma agulha reta de calibre 27 foi usada para bioimpressão, a viabilidade no primeiro dia foi de 69 a 75%, enquanto para o bocal cônico a viabilidade foi de 85 a 88%, corroborando a hipótese de que o uso de geometrias cônicas é mais adequado para o processo de bioimpressão baseado em extrusão, como mostrado na Figura 24.

Figura 24 – O efeito do processo de bioimpressão na viabilidade celular para diferentes composições de géis físicos de GelMA e diferentes pontas de bocais extrusores.



Fonte: adaptado de Liu *et al.* (2017a).

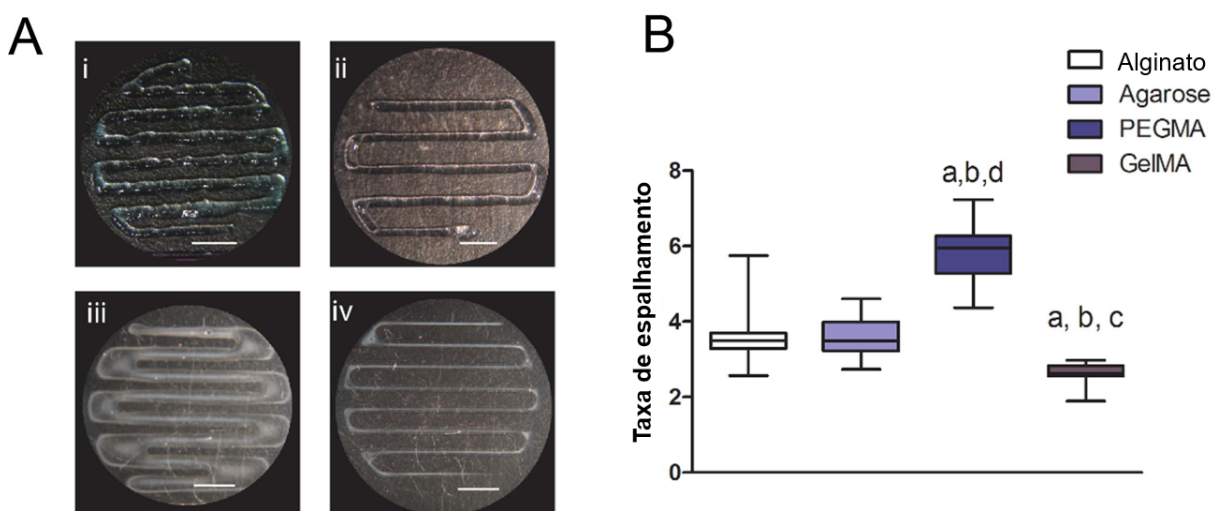
Em cultura estática, o transporte de oxigênio e nutrientes e a remoção de resíduos ocorrem principalmente por difusão (Angelopoulos *et al.*, 2020) e a distância máxima estabelecida na literatura para as células sobreviverem sem vascularização é de aproximadamente 100–200 μm (Kang *et al.*, 2016). Assim, a manutenção da viabilidade celular após o processo de bioimpressão também é influenciada pelo diâmetro de saída da agulha, uma vez que esse parâmetro impacta a espessura e a porosidade da estrutura e, conseqüentemente, sobre a distância de transporte por difusão (Matai *et al.*, 2020). O diâmetro do filamento extrudado não deve exceder 400 μm e estruturas com poros e microcanais vem sendo impressas para a biofabricação de tecidos (Gao; Cui, 2016; Williams *et al.*, 2018).

2.5.2 Printabilidade

Diferente da típica precisão observada em impressões que utilizam tintas sólidas, como metais e plásticos, a impressão de biotintas enfrenta desafios para reproduzir e manter a arquitetura da estrutura projetada (Göhl *et al.*, 2018). O termo printabilidade

vem sendo utilizado para se referir a capacidade de depositar biotintas com precisão espacial e fidelidade à geometria do modelo CAD, produzindo filamentos tubulares, contínuos e com tamanho próximo ao diâmetro de saída do bocal, conservando-se assim após a impressão sem colapsar (Murphy; Atala, 2014; Zhang *et al.*, 2021; Tu *et al.*, 2022).

Figura 25 – (A) Comparação da printabilidade usando (i) Alginato, (ii) Agarose (iii) PEGMA (BioINKTM) e (iv) GelMA, (B) Taxa de espalhamento pós-impressão (diâmetro do filamento/diâmetro da agulha).

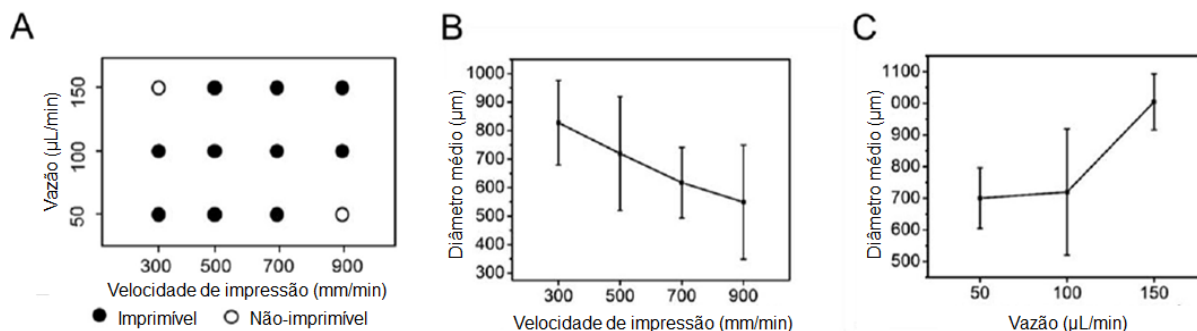


Fonte: adaptado de Daly *et al.* (2016).

A printabilidade é determinada pelas propriedades reológicas dos materiais, como tensão superficial, viscosidade, cinética de gelificação ou reticulação (Paxton *et al.*, 2017; Tarassoli *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). Para diferentes biomateriais utilizados em impressão, Daly *et al.* (2016) mediram a taxa de espalhamento do filamento, definida como a largura do filamento impresso dividida pelo diâmetro da agulha, e relataram que a composição baseada em GelMA teve a menor taxa de espalhamento ($1,43 \pm 0,36$), enquanto alginato ($3,35 \pm 0,93$) e agarose ($2,58 \pm 1,06$) apresentaram maiores taxas e maior variabilidade entre os filamentos.

Os parâmetros de impressão, como diâmetro do bocal, vazão, velocidade de movimentação do cabeçote de extrusão, altura de camada e a distância entre a mesa receptora e o bocal também afetam diretamente a printabilidade e a resolução da construção (Matai *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021). Como mostra a Figura 26, o diâmetro dos filamentos depositados diminui quando a velocidade de movimentação do bocal é elevada e, alternativamente, mantendo a velocidade constante, o diâmetro aumenta com o aumento na vazão (Liu *et al.*, 2017a).

Figura 26 – Mapeamento da printabilidade mostrando o efeito da velocidade de movimento do bocal e da vazão no desempenho de impressão de uma biotinta composta por géis físicos de GelMA.



Fonte: adaptado de Liu *et al.* (2017a).

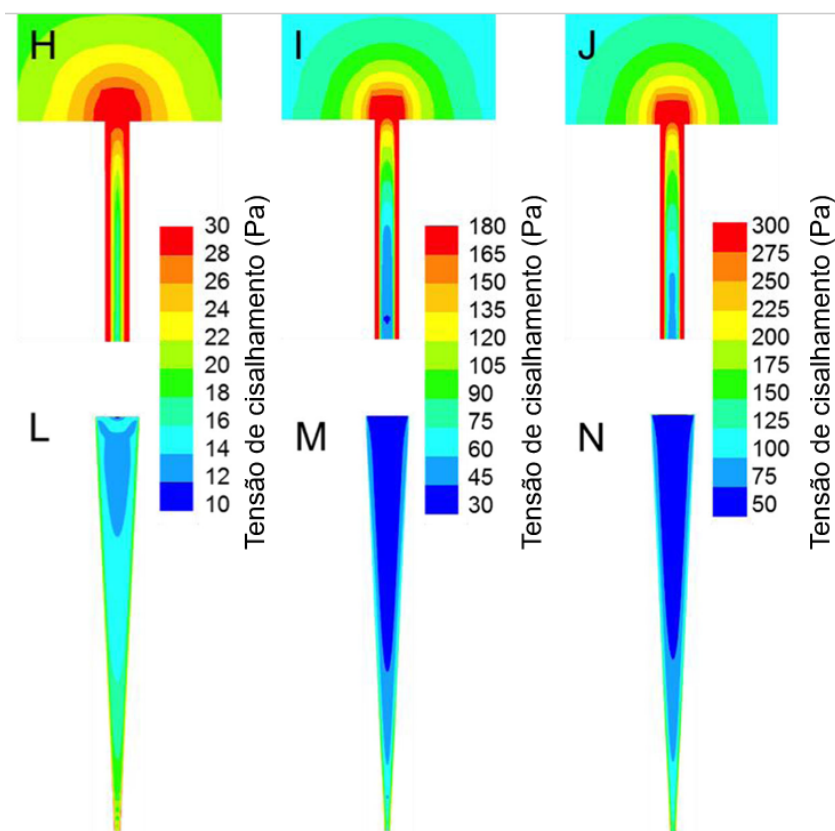
2.6 Fluidodinâmica Computacional

Além de oneroso, o preciso comportamento da biotinta fluindo dentro de estreitos bocais extrusores é difícil de ser alcançado por testes experimentais (Gómez-Blanco *et al.*, 2020). Em complemento aos métodos analíticos e experimentais, os métodos de simulação numérica podem fornecer diversas informações sobre o escoamento da biotinta, a viabilidade celular e a formação de filamentos (Tu *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2017). Métodos numéricos resolvem as equações que governam um problema por meio de um sistema de equações algébricas discretizadas no espaço e no tempo, sendo os mais comuns o Método dos Volumes Finitos (MVF), o Método dos Elementos Finitos (MEF) e o Método das Diferenças Finitas.

O uso da Dinâmica de Fluidos Computacional (CFD, do inglês Computational Fluid Dynamics) como parte do processo de bioimpressão otimiza a seleção de biotintas e parâmetros de impressão adequados, minimizando iterações e custos (Göhl *et al.*, 2018; Gómez-Blanco *et al.*, 2020). De acordo com as propriedades da biotinta, simulações numéricas podem ajudar a identificar os parâmetros ótimos para uma impressão rápida, com alta vazão e dentro dos limites de tensão de cisalhamento suportados pelas células.

Liu *et al.* (2017a) utilizaram o Ansys Fluent® baseado no método dos volumes finitos, para analisar as tensões de cisalhamento geradas pelo escoamento de biotintas compostas por géis físicos de gelatina metacrilóil (GelMA) para diferentes geometrias do bocal de impressão. Os autores mostraram que o uso de um bocal cônico resultou em altas tensões de cisalhamento apenas na saída da agulha, como mostra a Figura 27, diminuindo a exposição das células às tensões (Liu *et al.*, 2017a).

Figura 27 – Distribuição de tensão de cisalhamento durante o processo de bioimpressão com vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ usando um bico reto 27G e um bico cônico para soluções de GelMA 3%, 4%, e 5%.

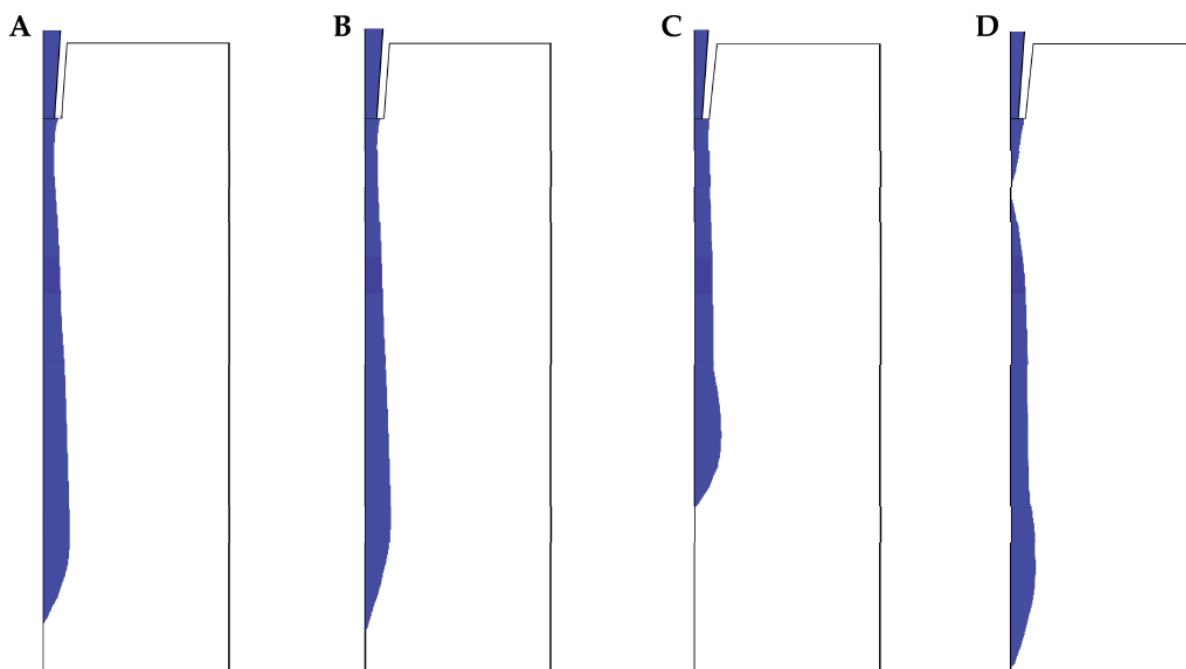


Fonte: adaptado de Liu *et al.* (2017a).

Além de propor um modelo analítico para solucionar o escoamento da biotinta pelo bocal de impressão, Emmermacher *et al.* (2020) utilizaram o Ansys Fluent® para estabelecer as relações entre os parâmetros do escoamento, o diâmetro do bocal e as propriedades de uma tinta composta por alginato, metilcelulose e agarose. Os autores validaram experimentalmente o modelo utilizando como tinta uma solução apenas com metilcelulose.

Utilizando o COMSOL® Multiphysics, *software* baseado no método dos elementos finitos, Gómez-Blanco *et al.* (2020) analisaram a estabilidade do filamento formado no ar, apresentada na Figura 28, e a dinâmica em regime transiente do escoamento da CELLINK™ Bioink através de três pontas cônicas com diferentes diâmetros, sob três temperaturas. Joas *et al.* (2018) aplicaram o método dos volumes finitos no OpenFOAM® para determinar o campo de escoamento de hidrogéis contendo PEGDA no interior de bocais cilíndricos.

Figura 28 – Formação do filamento de CELLINK™ Bioink: (A) 20G a 25 °C durante um pico de baixa pressão, (B) 20G a 37 °C durante um pico de baixa pressão, (C) 22G a 25 °C ao final da simulação, e (D) 22G a 37 °C durante um pico de baixa pressão.



Fonte: adaptado de Gómez-Blanco *et al.* (2020).

Outra abordagem, o método de simulação de volume de fluido (VOF) é utilizado para capturar a ocupação das fronteiras em escoamentos multifásicos (Silva; Filho, 2018). Utilizando o *software* OpenFOAM, Tu *et al.* (2022) aplicaram o método de simulação VOF para capturar a interface entre o ar e filamentos de Nivea Creme e de uma tinta de celulose, extrudados de forma livre, e analisar a estabilidade e o diâmetro formado.

Os modelos computacionais também podem ajudar a prever propriedades mecânicas dos produtos impressos. Investigando os módulos elástico e de cisalhamento de construtos bioimpressos com células, Hölzl *et al.* (2016) utilizaram o ABAQUS para resolver um modelo de elementos finitos não-linear de um hidrogel com diferentes densidades e distribuição dos agregados celulares dentro do fluido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho, uma impressora 3D convencional que empregava a técnica de Fabricação com Filamento Fundido (FFF) foi customizada para construção de um protótipo de bioimpressora 3D baseada em extrusão, em parceria com a empresa 3DLopes®. O protótipo foi utilizado para validação experimental da simulação numérica do escoamento da tinta e para os testes de bioimpressão com células do tecido muscular. A extrusão de uma biotinta através do bico de uma bioimpressora 3D foi modelada como um problema de escoamento viscoso de fluido não-newtoniano que, devido à pressão exercida pelo pistão, flui através da seringa e da agulha cônica. A seguir são descritos os procedimentos experimentais relacionados à validação do modelo fluidodinâmico computacional e à bioimpressão e as etapas para análise por simulação numérica do escoamento.

3.1 Customização da impressora 3D

Para o desenvolvimento de uma Bioimpressora 3D, uma impressora 3D convencional foi customizada para extrusão de biotintas e tintas de biomateriais, em parceria com a empresa 3DLopes®. A impressora modelo 3D Tower Pro utilizava originalmente a tecnologia de manufatura aditiva por extrusão FFF. Conforme definido em trabalhos anteriores (Silveira, 2019; Poley, 2020), o sistema extrusor de filamentos plásticos com o bloco aquecedor foi substituído por um extrusor mecânico de hidrogéis e biotintas, cujo mecanismo é composto por um pistão movido por fuso excêntrico à seringa. Um anel roscado foi encaixado no fuso e o pistão foi conectado em um pequeno flange à frente deste anel, como mostram as Figuras 29 e 30. O pistão empurra o biomaterial pelo bocal e o deposita na superfície de impressão.

Um motor de passo do tipo Nema® 17, VDC 12V, 1,7 A (42BYGHW609) é responsável pela movimentação do fuso e, conseqüentemente, do pistão. A movimentação do carro no plano XY e da mesa em Z é feita por motores do mesmo tipo. Os motores são controlados por uma placa de processamento e a impressora é comandada pelo *G-code*, que contém todas as instruções que o equipamento deve executar, como a trajetória que o cabeçote da impressora deve percorrer e a velocidade de impressão e extrusão do material.

Figura 29 – Foto frontal da bioimpressora 3D, com cabeçote extrusor, interface de usuário, mesa de impressão e os eixos de movimentação.

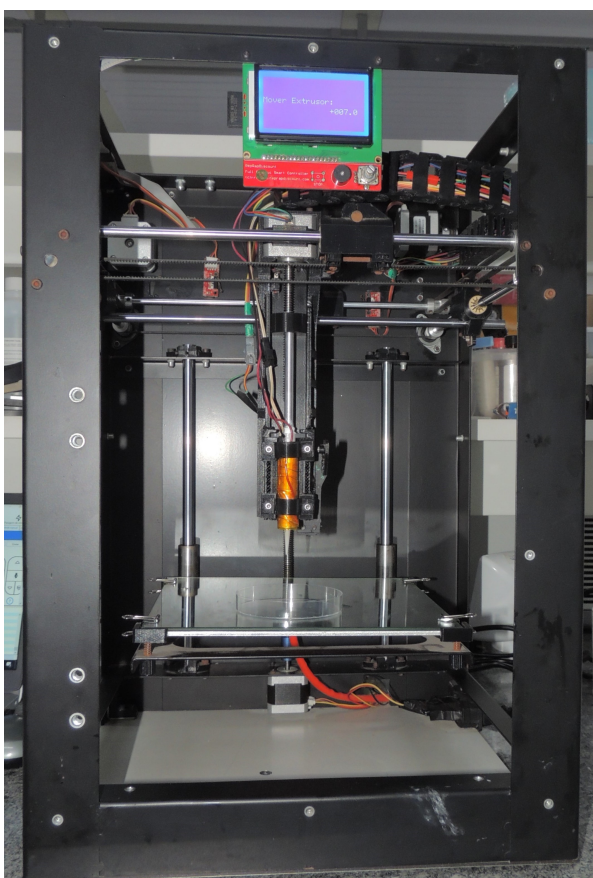
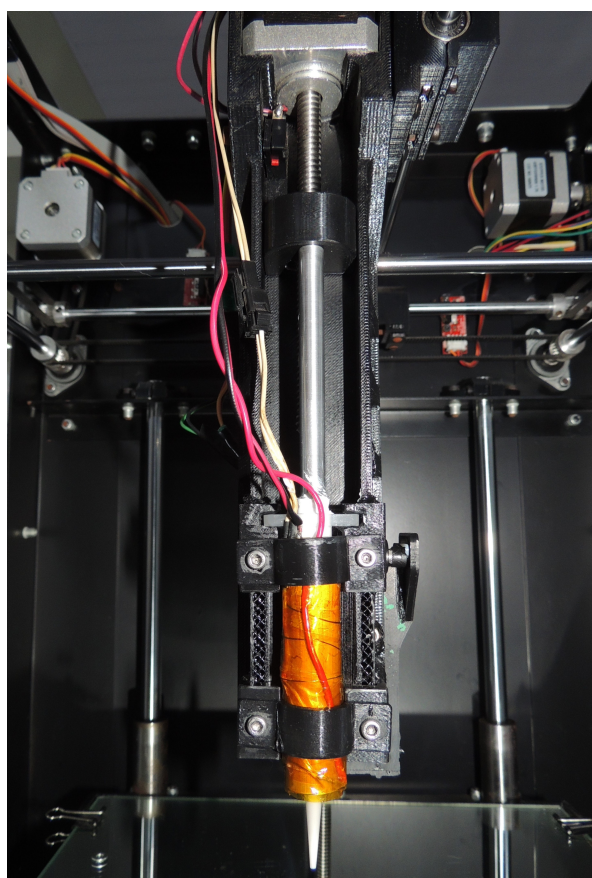


Figura 30 – Cabeçote extrusor com pistão acionado por um fuso excêntrico à seringa, que fica dentro do aquecedor e fixada.



A partir do *G-code*, é possível controlar a velocidade do pistão para deposição de material e quanto ele se desloca, bem como o movimento dos carros em X e Y e da mesa em Z. Para a impressão de modelos 3D, o fatiamento e código *G-code* customizado foram feitos utilizando o PrusaSlicer 2.6.0 (Prusa Research, República Checa). A placa RAMBo (*RepRap Arduino-compatible Mother Board*) foi utilizada como hardware e o *firmware* original da impressora, Marlin 2.0, foi adaptado pela 3DLopes® para possibilitar o movimento do pistão e o movimento do conjunto extrusor no plano.

O sistema extrusor foi encaixado no cabeçote de impressão e adaptado para funcionar inicialmente com uma seringa de 10 mL. Ao longo do trabalho, o suporte foi alterado para uma seringa de 3 mL. No bico da seringa, foram rosqueadas agulhas de precisão com diferentes diâmetros. As fixações do suporte também foram alteradas para apenas duas travas (superior e inferior) ao invés de um molde completamente fechado. Assim, permitiu-se a utilização da seringa adaptada com uma tomada de pressão e foi possível visualizar o corpo da seringa durante o processo.

O protótipo possui um sistema aquecedor para biotintas que precisam ser impressas a uma temperatura superior a temperatura ambiente. Além do aquecedor da mesa de impressão, a seringa pode ser encaixada em um tubo de alumínio, que foi envolvido por um fio condutor e dissipa calor pelo efeito Joule.

3.2 Materiais para impressão

3.2.1 Creme Nívea

Uma vez que a realização de testes mecânicos para configuração de parâmetros de impressão e a validação do modelo computacional utilizando uma biotinta ou tinta de biomaterial exigiria uma quantidade de material muito onerosa ao projeto, para a primeira etapa experimental, optou-se por utilizar outro fluido, que fosse acessível e apresentasse comportamento reológico semelhante ao de biotintas. O Nívea® Creme (Beiersdorf Global AG, Alemanha) foi o material escolhido, inclusive por se dispor de testes similares na literatura para comparação (Paxton *et al.*, 2017; Tu *et al.*, 2022).

3.2.1.1 Determinação da massa específica

A massa do Nívea Creme foi medida à temperatura de 25°C utilizando uma balança de precisão classe II, modelo KN 2000 da marca Digimed® (Digicrom Analítica Ltda, Brasil), que tem capacidade de 2000 g, valor de divisão (resolução) de 0,01 g e valor de divisão de verificação de 0,1 g.

Para calcular a massa específica, Nívea Creme foi inserido em uma seringa BD® com escala de graduação até 10 ml e resolução 0,2 ml. Foram feitas 10 medições das massas da seringa vazia e preenchida com Nívea Creme até a sua graduação máxima. Após cada medição, a seringa foi esvaziada antes de repetir o procedimento. A massa específica (ρ) foi então calculada conforme a Equação 4.

$$\rho = \frac{m_t - m_s}{V_s} \quad (4)$$

onde m_t é a média da massa total da seringa preenchida com Nívea Creme, m_s é a média da massa da seringa vazia e V_s é o volume da seringa.

3.2.1.2 Ensaio reológico

Os ensaios de reometria foram realizados em triplicatas utilizando-se um reômetro modular compacto modelo MCR 302 (Anton Paar, Áustria), equipado com placa Peltier e localizado em laboratório do Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno (CTNano/UFGM). O equipamento mostrado na Figura 31 operou no modo rotacional com um sistema de medição com geometria de placas paralelas (\varnothing 25 mm) e uma distância de 0,5 mm entre as placas e os ensaios foram conduzidos a temperatura de 25°C. Baseando-se em ensaios com Nivea Creme realizados por Paxton *et al.* 2017 e Tu *et al.* 2022, foram feitas medições para definir a tensão de escoamento e caracterizar o comportamento viscoso do fluido.

Figura 31 – Reômetro modular compacto modelo MCR 302.



Uma rampa de tensão de cisalhamento variando de 1 a 1000 Pa foi aplicada ao Nivea Creme e o ponto de escoamento foi definido pela interseção entre uma regressão linear na região de platô e, paralela ao eixo, uma reta que representa a queda de viscosidade do diagrama de tensão de cisalhamento-viscosidade. Esse ponto indicou que o material começou a fluir. Medidas da viscosidade absoluta foram realizadas variando a taxa de deformação de 0,01 a 1000 s⁻¹ ou até a taxa de deformação mais alta alcançável antes que o material saísse do sistema placa-placa. Os dados foram obtidos em triplicatas, tratados através do Jupyter® Notebook.

3.2.2 Biotinta

Para que uma tinta seja considerada adequada para bioimpressão, ela deve ter boa printabilidade e manter a viabilidade celular. Então, na fase final deste trabalho para validação da bioimpressora, uma biotinta já estudada na literatura e estabelecida no mercado foi escolhida. A biotinta composta de nanofibras de celulose (NFC) e alginato, CELLINK® Bioink (CELLINK AB, Gothenburg, Sweden), foi carregada de células musculares da linhagem C2C12 para procedimento de bioimpressão.

3.2.2.1 Cultura celular

Mioblastos de camundongo imortalizados (C2C12) foram obtidos através do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). No Laboratório de Biologia Celular e Molecular do ICB (Instituto de Ciências Biológicas) da UFMG, foram mantidos em frascos de cultura de tecidos em meio de crescimento (MC) [MC: DMEM-high glucose (Gibco), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (Gibco) e 1% v/v de penicilina/estreptomicina (Gibco)]. As células foram utilizadas entre a terceira e sexta passagem e cultivadas em estufa à 5% de CO₂ e 37°C.

Os construtos bioimpressos foram mantidos em meio de cultura contendo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina.

3.2.2.2 Preparação da biotinta

A biotinta utilizada neste trabalho foi preparada baseada no método proposto pelo Protocolo de Bioimpressão (CELLINK, 2023c; CELLINK, 2023a).

Com um adaptador Luer Lock do tipo fêmea-fêmea, 1 mL de CELLINK® Bioink foi transferido para uma seringa BD® de 3 mL. Para homogeneizar a composição antes de combiná-la com as células, outra seringa foi conectada ao adaptador e utilizada para misturar a biotinta, empurrando os êmbolos para frente e para trás, tomando cuidado para evitar a entrada de ar. A biotinta foi manipulada e mantida a temperatura ambiente (aprox. 25°C).

Figura 32 – Processo de mistura da biotinta carregada de células utilizando duas seringas conectadas com adaptadores fêmea-fêmea Luer Lock.



Conforme sugerido pelo protocolo da CELLINK® Bioink, 1,1 milhão de células foram suspensas em 100 μ L de meio de cultura. A suspensão de células foi transferida para uma seringa BD de 3 mL utilizando uma micropipeta Eppendorf. As duas seringas foram conectadas com o adaptador Luer Lock e as soluções foram misturadas empurrando suavemente os êmbolos para frente e para trás até obter uma mistura homogênea, como mostrado na Figura 32. A mistura foi movida para uma das seringas e dispensada no cartucho-seringa (Optimum® Nordson EFD, EUA) da impressora, que foi tampado.

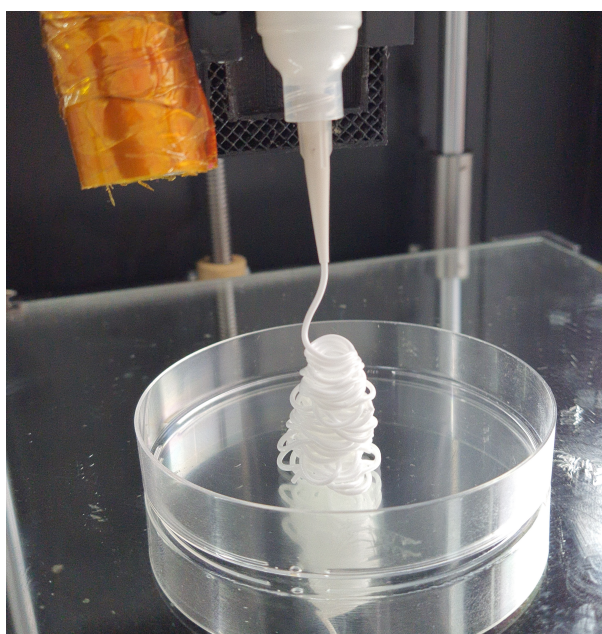
3.3 Testes de extrusão e impressão 3D

Para validação experimental das simulações numéricas, o mecanismo de extrusão da bioimpressora 3D foi testado com diferentes velocidades e agulhas de precisão utilizando apenas Nivea Creme. Já a segunda etapa experimental foi conduzida com o objetivo de testar o equipamento com biotintas carregadas com células e analisar a printabilidade e a viabilidade celular, demonstrando a funcionalidade do protótipo desenvolvido.

3.3.1 Testes mecânicos para modelo fluidodinâmico

Para calcular a vazão mássica, parâmetro de entrada da simulação numérica, Nivea Creme foi inserido em seringas-cartuchos de 3 ml (Optimum® Nordson EFD, EUA) conectadas a agulhas de ponta cônica (SmoothFlow™ Nordson EFD, EUA). Foram escolhidas 3 velocidades de extrusão, configuradas no *software* Repetier-Host (Hot-World GmbH & Co. KG, Alemanha) como G1 E50 F0.25, G1 E50 F2.5 e G1 E50 F25. Para cada velocidade, foram feitos testes com agulhas de calibre 25G, 20G e 16G (0,25; 0,58 e 1,19 mm). O creme foi dispensado sobre uma placa de Petri, como mostra a Figura 33, e a distância entre a ponta da agulha e a placa foi de cerca de 100 mm, para evitar acúmulo de fluido na saída do bocal. Cada teste foi conduzido 5 vezes à temperatura de 25°C.

Figura 33 – Formação livre de filamentos de Nivea Creme sobre a placa de Petri.



A massa de creme dispensada através de diferentes agulhas e velocidades foi medida utilizando uma balança analítica classe I, modelo ATX224 da marca Shimadzu® (Shimadzu Corporation, Japão), que tem capacidade de 220 g, valor de divisão (resolução) de 0,0001 g e valor de divisão de verificação de 0,001 g. Um cronômetro com resolução de 0,01 s foi utilizado para medir o tempo. A vazão mássica (\dot{m}) foi então calculada conforme a Equação 5.

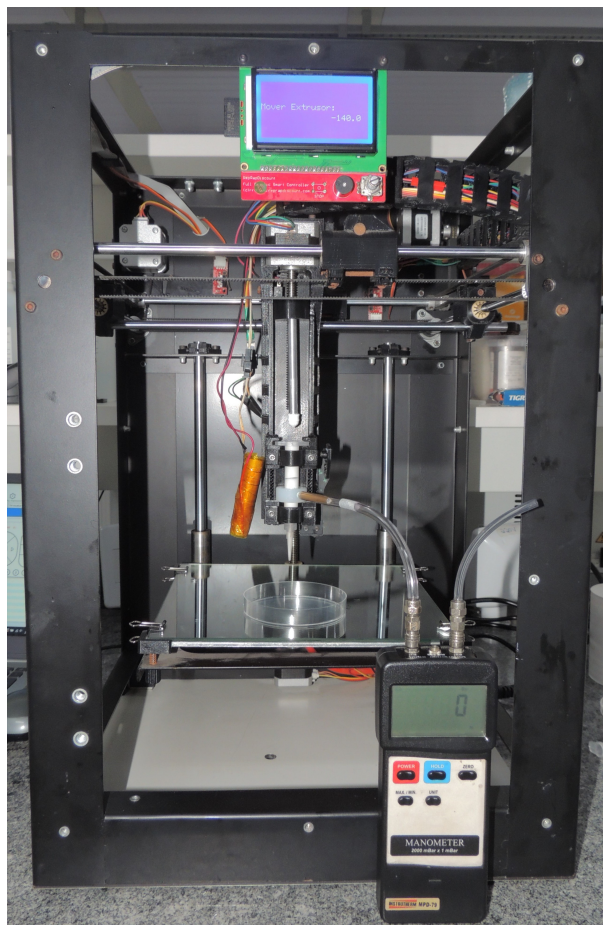
$$\dot{m} = \frac{m_t - m_p}{t} \quad (5)$$

onde m_t é a média da massa total do prato da placa de Petri com Nívea Creme, m_s é a média da massa do prato vazio e t é o tempo entre o início e o fim do escoamento do creme através da saída da agulha.

Uma vez estabelecida a relação entre os comandos de velocidade e a vazão mássica, foram feitas medidas de pressão utilizando uma seringa adaptada. O parâmetro de saída, isto é, o resultado da simulação numérica validado experimentalmente foi a variação da pressão (Δp) entre a entrada e a saída do domínio dos modelos dos bocais extrusores. A variação da pressão é a diferença entre a pressão exercida sobre o fluido na entrada da seringa e a pressão no ambiente (saída da agulha). Um manômetro diferencial digital portátil modelo MPD-79 (Instrutherm Instrumentos de Medição, Brasil) foi utilizado para medir a diferença pressão entre esses pontos. O instrumento tem capacidade para medir pressões de até 2000 mBar, com resolução de 1 mBar.

Para o protótipo desenvolvido, uma velocidade de deslocamento do pistão deve ser configurada e a pressão exercida sobre o fluido não pode ser obtida diretamente. Sendo assim, foi necessário desenvolver um mecanismo para medição da pressão e validação do modelo computacional. Resultados numéricos presentes na literatura (Emmermacher *et al.*, 2020) sugerem que a queda de pressão ao longo do corpo cilíndrico da seringa é desprezível em relação ao valor da pressão total exercida sobre o fluido. Assim, optou-se por inserir uma tomada de pressão no corpo da seringa próximo ao bico, para ter maior estabilidade da medição e ser coerente com a entrada do domínio do modelo utilizado nas simulações numéricas. A outra tomada do manômetro diferencial foi deixada livre à pressão atmosférica do ambiente do laboratório, conforme mostrado na Figura 34.

Figura 34 – Sistema desenvolvido para medição da pressão na seringa de impressão utilizando manômetro.



Para criar o ponto de tomada de pressão no cartucho, um anel de nylon foi colocado como suporte sobre o corpo da seringa e foi feito um furo lateral permitindo a passagem do fluido. Nesse ponto, um tubo de latão (diâmetro interno de 3 mm e diâmetro externo de 4,2 mm) foi conectado através de uma rosca métrica ISO 60° de 5x0,80, que foi feita internamente no furo lateral do anel e externamente em uma das extremidades do tubo. A outra extremidade foi conectada à uma mangueira transparente de PVC, acoplada ao manômetro. Empregando-se a mesma configuração de velocidade de extrusão utilizada para medir as diferentes vazões mássicas, valores de pressão foram então aferidos.

3.3.1.1 Calibração do manômetro

O manômetro diferencial digital foi calibrado no Laboratório de Bioengenharia (LABBIO/UFMG), utilizando um tubo em U contendo mercúrio com uma extremidade aberta para a atmosfera do ambiente e outra conectada em uma das entradas do manômetro diferencial. Uma trena com resolução de 0,5 mm foi empregada para medir a diferença

de altura das colunas de mercúrio dentro tubo em U. O manômetro digital, modelo MPD-79, permite a visualização da medida convertida para outras unidades, como mmHg, e este recurso foi conferido e utilizado.

Medições foram feitas em 10 pontos diferentes entre 30 e 600 mmHg, valores dentro da faixa de medição operada durante os testes de extrusão com Nivea Creme. Para cada ponto, foram feitas 5 medições da altura da coluna de mercúrio, possibilitando o cálculo da incerteza de calibração.

3.3.2 Printabilidade

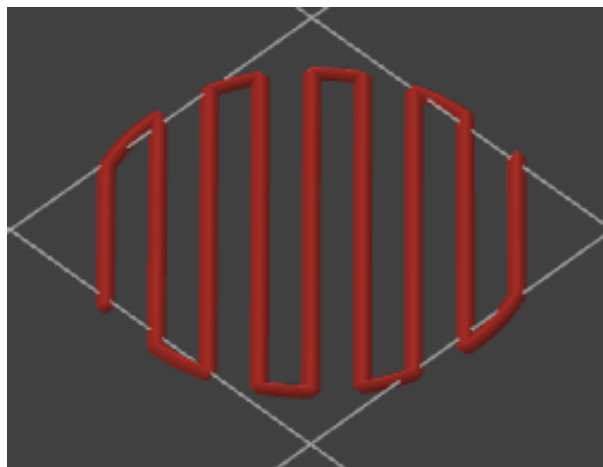
Para avaliar a printabilidade da CELLINK® Bioink contendo células C2C12, um padrão com uma única camada foi impresso e fotografado de cima e as imagens foram usadas para medir a largura dos filamentos impressos pelo *software* ImageJ.

A printabilidade foi medida em relação a taxa de espalhamento, definida como a largura do filamento impresso dividida pela espessura de extrusão. Além de comparar os filamentos formados pela biotinta com os filamentos de Nivea Creme para as mesmas configurações de impressão, a influência do diâmetro de saída do bocal e a vazão de extrusão foi analisada.

Foram escolhidos as agulhas calibre 22G, recomendada pela fabricante CELLINK, e calibre 25G, que confere maior precisão na deposição do material. Ambas as agulhas são do tipo SmoothFlow™ (Nordson EFD, EUA). A vazão mássica foi medida para as impressões de Nivea Creme utilizando uma balança analítica classe I e um cronômetro. Com a densidade calculada para o Nivea Creme, a vazão foi convertida para volumétrica para comparação com a biotinta e com os valores estabelecidos nos modelos de simulação numérica.

A geometria foi definida no PrusaSlicer como um cilindro de uma cada com 11 mm diâmetro. Para o bocal 22G, foi configurada uma altura de 0,41 mm para a camada, formando um padrão de preenchimento retilíneo com densidade de 30% e espessura de extrusão de 0,45 mm, conforme mostrado na Figura 35. Com essas configurações, a velocidade de impressão, que é o movimento do cabeçote da impressora nas direções X e Y, foi configurada para 5 e 15 mm/s.

Figura 35 – Padrão retilíneo formado por uma camada para medição da taxa de espalhamento dos filamentos impressos.



Para o bocal 25G, definiu-se uma altura de 0,25 mm, formando padrão de preenchimento retilíneo e densidade de 25%, espessura de extrusão de 0,30 mm e velocidade de 10 mm/s. A velocidade de extrusão não pode ser ajustada diretamente no *software*, sendo definida internamente de acordo com parâmetros como o diâmetro do filamento e a velocidade de impressão, e por isso foi medida.

A avaliação estatística foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelos testes Turkey de comparação múltipla feita em python usando Jupyter® Notebook. Para cada amostra, foi tomada uma medida da largura de todos os filamentos ($n = 9$ para 22G e $n = 11$ para 25G). Diferenças significativas foram assumidas para valores abaixo de $p = 0,05$.

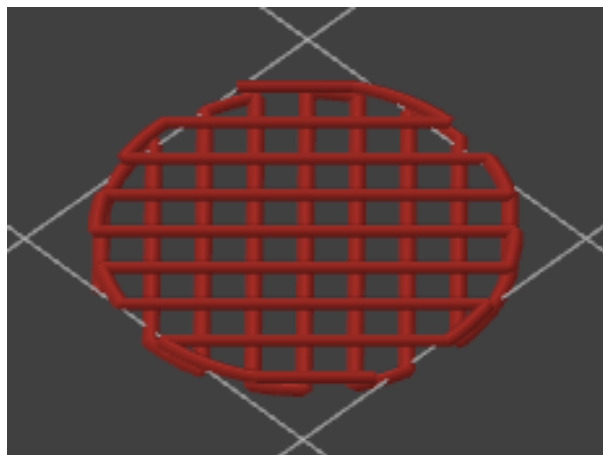
3.3.3 Bioimpressão 3D

A desinfecção da bioimpressora 3D e da cabine de segurança biológica classe II foi realizada primeiramente com álcool 70% e os equipamentos foram irradiados com luz U.V. por 20 minutos antes de iniciar a bioimpressão. A agulha de bico cônico, com proteção UV, foi esterilizada em banho de álcool por 20 minutos e secada naturalmente em fluxo laminar estéril.

O cartucho de biotinta foi preparado conforme descrito no item 3.2.2. Uma agulha de bico cônico com proteção UV de calibre 22G (SmoothFlow™ Nordson EFD, EUA) foi conectada ao cartucho e a biotinta foi extrudada sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro. A geometria foi definida no PrusaSlicer como um cilindro sólido com 11 mm diâmetro e altura de 0,8 mm, formado com padrão de preenchimento retilíneo

e densidade de 30%, conforme mostrado na Figura 36 e detalhado no G-code apresentado no Apêndice A. As amostras foram formadas por duas camadas com altura definida em 0,40 e 0,30 mm. A espessura de extrusão foi de 0,45 mm. A velocidade de impressão foi configurada para 5 mm/s, representando uma vazão volumétrica de aproximadamente 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. As impressões foram realizadas a temperatura de 25°C.

Figura 36 – Padrão de impressão com duas camadas para formar os construtos bioimpressos com CELLINK® Bioink carregada de células.



Uma vez que a bioimpressão foi finalizada, as lamínulas foram transferidas com auxílio de uma pinça estéril para placas de 24 poços de poliestireno tratado e os construtos submergidos na solução de reticulação (crosslinking) contendo CaCl_2 50 mM (CELLINK AB, Gothenburg, Suécia). Após 5 minutos, a solução foi removida e os construtos foram lavados uma vez com phosphate buffer solution (PBS) e foi adicionado meio de cultura. A placa foi, então, colocada dentro de uma incubadora para retornar as células ao ambiente fisiológico, a 37°C, 5% de CO_2 .

3.4 Cálculo da incerteza de medição

Para determinar a incerteza das medições, utilizou-se a metodologia proposta pelo Guia para a Expressão de Incerteza de Medição (INMETRO, 2012). Primeiramente, calculou-se as incertezas combinadas para cada grandeza que foi obtida de forma direta (tempo, massa, volume e o pressão diferencial), conforme a Equação 6.

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) = \sum_{i=1}^N u_i^2(y) \quad (6)$$

onde u_c é a incerteza combinada associada a cada medição direta e u_i é a incerteza

associada à cada fonte de erro. Foram considerados os erros associados à resolução dos instrumentos e a repetitividade das medições. Para a medição da pressão, foi estimada a incerteza de calibração. Para a medição do tempo, foi considerado ainda um erro associado ao tempo de reação de 1 s em que operador pode atrasar ou adiantar ao parar o cronômetro.

No caso de instrumentos digitais, foi considerado que os erros associados a resolução limitada dos instrumentos seguem uma distribuição uniforme de probabilidade e a incerteza pode ser calculada pela equação 7.

$$u_{\text{uniforme}}(x_i) = \frac{a}{\sqrt{3}} \quad (7)$$

onde u_a é igual a metade da resolução do instrumento. No caso de instrumentos analógicos, uma distribuição triangular foi considerada e a incerteza foi calculada pela Equação 8.

$$u_{\text{triangular}}(x_i) = \frac{a}{\sqrt{6}} \quad (8)$$

Já a repetitividade das medições foi definida pela incerteza tipo A, com distribuição de probabilidade *t-student*, calculada conforme a Equação 9.

$$u(x_i) = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

onde s é o desvio-padrão experimental da média e n é o número de observações.

As grandezas de interesse são a densidade e vazão mássica, obtidas por meio de medições indiretas, e a pressão, obtida diretamente. No caso da densidade e da vazão mássica, as incertezas associadas à medição de cada variável (massa, volume e tempo) foram combinadas através da Equação 10.

$$u_c^2(y) = \left[\sum_{i=1}^N \frac{\partial f}{\partial x_i} u(x_i) \right]^2 \quad (10)$$

onde f é a função matemática contínua e derivável que relaciona y com as grandezas de entrada, x_i corresponde as variáveis de entrada obtidas por medição direta e $u(x_i)$ é a incerteza-padrão associada à cada fonte de erro. No caso do cálculo da densidade, f é a massa dividida pelo volume, enquanto a vazão corresponde à massa dividida pelo tempo.

Após o cálculo da incerteza combinada, o grau de liberdade efetivo para as grandezas obtidas por medição indireta foi determinado pela equação de Welch-Satterthwaite, Equação 11.

$$\frac{u_c^A(y)}{v_{\text{eff}}} = \sum_{i=1}^N \frac{u_i^A(y)}{v_i} \quad (11)$$

onde v_{eff} é o número de graus de liberdade efetivos e v_i é o número de graus de liberdade associado à cada fonte de erro.

Por fim, a incerteza combinada expandida foi então obtida, conforme a Equação 12, multiplicando-se a incerteza combinada pelo coeficiente de abrangência *t-student*, k , considerando 95% de probabilidade.

$$U = k u_c(y) \quad (12)$$

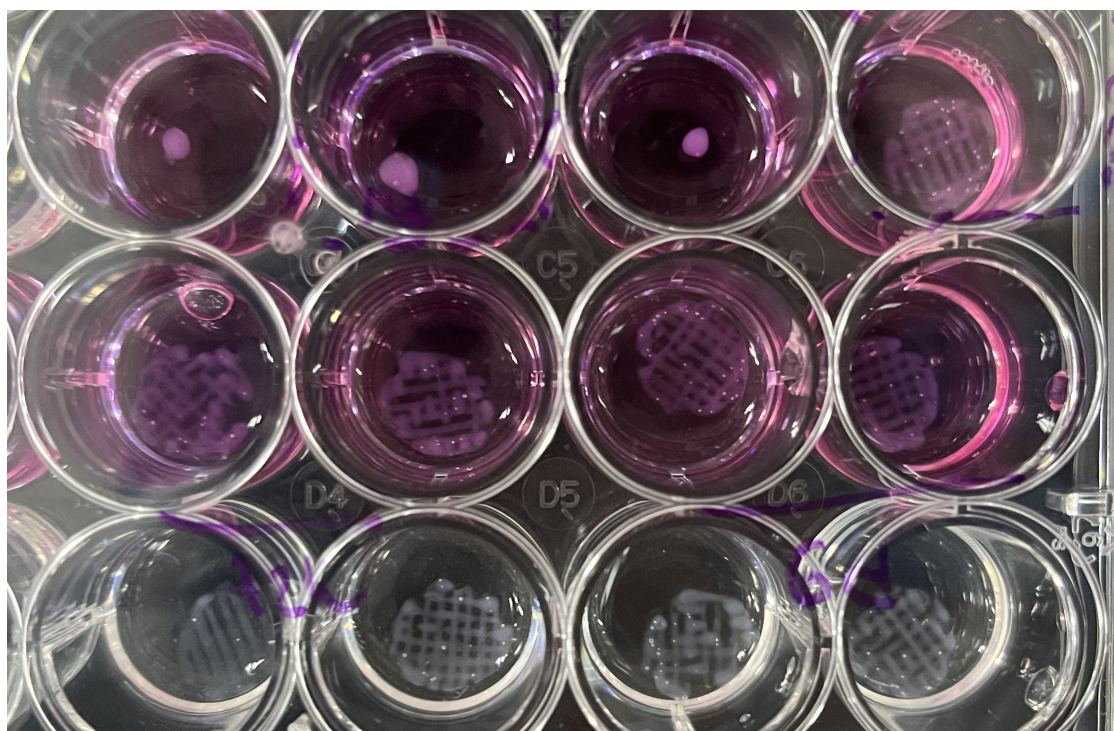
3.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi qualitativamente determinada por meio de marcação fluorescente LIVE/DEAD (Invitrogen) nos construtos bioimpressos após o processo de impressão (2h) e cultivados por 3, 6 e 14 dias. Os construtos carregados de células foram incubados por 30 minutos com 2 μM de calceína e 2 μM de homodímero de etídeo-1 diluídos em meio de cultura completo para corar as células vivas. Após esse tempo, foram lavados com PBS. Imagens de microscopia de fluorescência (FM) foram obtidas usando um microscópio de fluorescência AxioVertA.1 (Carl Zeiss, Alemanha), visualizando células vivas (verdes) e mortas (vermelhas). As análises de viabilidade celular para validação do protótipo foram feitas em duplicatas técnicas.

Como mostrado na Figura 37, além das estruturas 3D bioimpressas, foram utilizados grupos controle em culturas 2D e 3D. O grupo de controle 2D consistiu em uma cultura

celular convencional com a mesma concentração de células que foi misturada à biotinta. O grupo de controle 3D foi feito após o encapsulamento das células na biotinta, mas antes do processo de impressão, ou seja, as células foram misturadas com a biotinta e as amostras coletadas através da seringa 3D sem agulha.

Figura 37 – Placa de cultura com as amostras dos grupos controle 2D e 3D em meio de cultura, bem como os construtos impressos, imersos em meio (rosa) ou reticulação (translúcido).



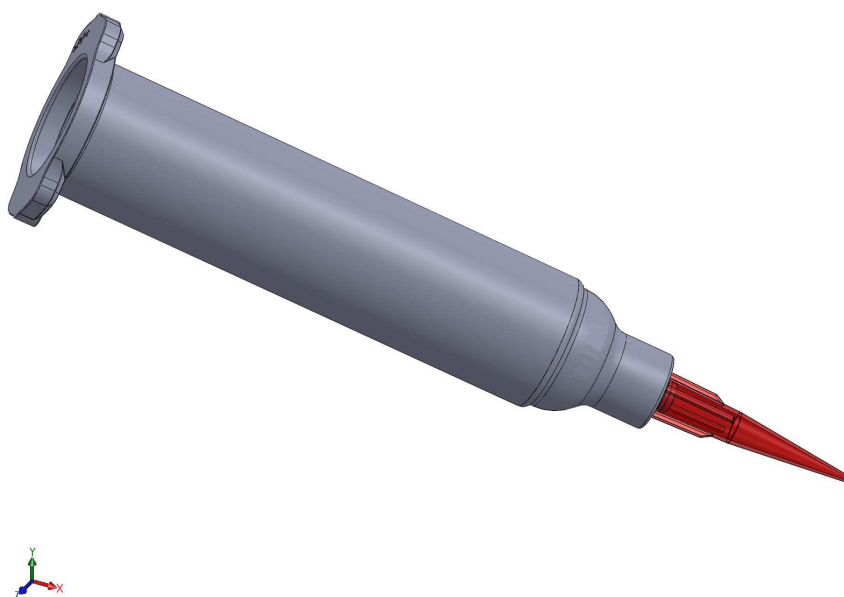
A morfologia celular também foi acessada pela marcação com actina. Para isso, as construções bioimpressas contendo as células foram lavadas duas vezes com PBS e depois fixadas com formaldeído 3,7% à temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras foram então lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton-X100 0,5% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas novamente com PBS e incubadas com Alexa Fluor 546 faloidina 1:100 em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e os núcleos celulares foram corados com DAPI (diluído a 1: 1.000 em PBS) durante 1 min à temperatura ambiente. As amostras foram visualizadas em placas Fluorodish® em microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert.A1.

3.6 Modelagem matemática e simulação numérica

3.6.1 Modelo geométrico

As geometrias dos bocais extrusores foram obtidas de arquivos 3D-CAD fornecidos pela fabricante (Nordson Corporation, Westlake, EUA) através do site 3D Content-Central¹. Os modelos foram feitos nos *softwares* SolidWorks® 2020 SP3.0 (Dassault Systèmes S.A, FR) e Rhinoceros® 7 (Robert McNeel & Associates, EUA), conectando uma seringa (Optimum® Nordson EFD, EUA) a agulhas de ponta cônica (Smooth-Flow™ Nordson EFD, EUA), como ilustra a Figura 38. Uma seringa de 3 ml foi utilizada para o modelo junto com agulhas de diâmetro interno de saída de 1,19 mm (16G), 0,58 mm (20G), 0,41 mm (22G) e de 0,25 mm (25G).

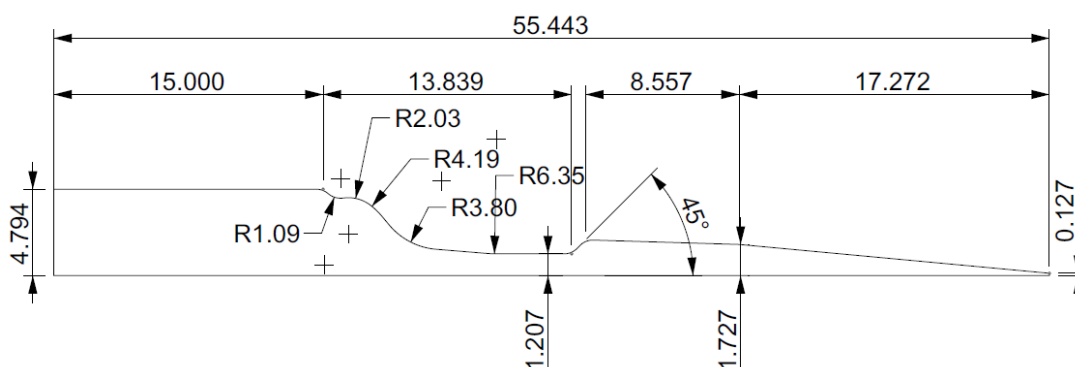
Figura 38 – Combinação geométrica dos modelos 3D da seringa e com o bocal 25G.



Uma vez que a geometria apresenta simetria em relação ao eixo, o modelo foi simplificado para o espaço bidimensional. Foi extraída a superfície interna na seção meridiana de cada combinação, a partir do eixo de revolução. A seção de entrada do domínio foi reduzida, mas fixada a um comprimento de 15 mm para o corpo da seringa, conforme proposto por Emmermacher *et al.* (2020), buscando garantir que o escoamento esteja desenvolvido antes da região crítica, onde há acentuada redução do diâmetro.

¹<https://www.3dcontentcentral.com/parts/supplier/EFD,-Inc.aspx> último acesso em 1 de junho de 2022.

Figura 39 – Modelo geométrico 2D axissimétrico do conjunto seringa 3 ml e bocal 25G para simulações CFD, com todas as dimensões em mm.



Para gerar uma malha estruturada quadrilátera homogênea permitindo a redução do tamanho do elemento em direção à parede, substituiu-se a o recuo entre a agulha e a seringa por uma borda de 45°. Modelos com os vértices entre a seringa, a borda e a agulha arredondados foram utilizados para suavizar a geometria e obter uma solução estável, eliminando pontos de singularidade numérica. Mais detalhes geométricos do modelo 2D do conjunto seringa 3 ml e bocal 25G podem ser vistos na Figura 39.

3.6.2 Equações governantes

As equações governantes representam matematicamente os princípios físicos associados ao problema e, no processo de simulação computacional, elas são discretizadas e resolvidas numericamente. O escoamento de uma biotinta através do bocal de impressão é governado pela equação de conservação da quantidade de movimento (momentum), descrita pela Equação 13.

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho \vec{u}) + \nabla \cdot (\rho \vec{u} \vec{u}) = -\nabla p + \nabla \cdot \bar{\bar{\tau}} + \rho \vec{g} + \vec{F} \quad (13)$$

onde ρ é a massa específica do fluido, \vec{u} é o campo de velocidade, p é a pressão estática, $\bar{\bar{\tau}}$ é o tensor de tensão, e $\rho \vec{g}$ e \vec{F} são a força gravitacional do corpo e as forças externas do corpo, respectivamente.

Para um fluido não-newtoniano com densidade constante escoando sob pressão através de um bocal axissimétrico em regime permanente, e desprezando as forças de campo, a relação simplificada mostrada na Equação 14 foi obtida.

$$\nabla \cdot (\rho \vec{u} \vec{u}) = -\nabla p + \nabla \cdot \bar{\bar{\tau}} \quad (14)$$

O tensor de tensões será definido pela equação constitutiva que melhor representar o comportamento reológico do fluido. No caso dos fluidos não-newtonianos, a tensão de cisalhamento aplicada não é diretamente proporcional à taxa de deformação sofrida por um elemento de fluido.

A equação de conservação da massa, apresentada na Equação 15, é utilizada como uma restrição que deve ser respeitada pelo campo de velocidade.

$$\frac{d\rho}{dt} + \nabla \cdot (\rho \vec{u}) = 0 \quad (15)$$

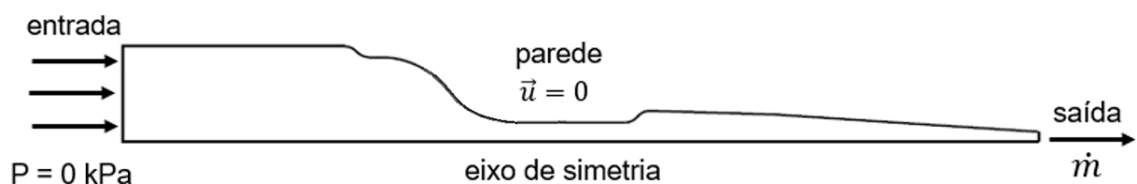
Considerando um fluido incompressível, a equação de conservação da massa pode ser simplificada como indicado na Equação 16.

$$\nabla \cdot \vec{u} = 0 \quad (16)$$

3.6.3 Condições de contorno

A linha reta central do modelo corresponde ao eixo de simetria do domínio e as bordas radiais formam a parede estacionária, em que foi aplicada a condição de não-deslizamento. Como condição de contorno na entrada do domínio foi definida pressão nula e, na seção de saída, configurou-se a vazão mássica, por ser considerada o principal fator de influência sobre a tensão de cisalhamento, que é crítica nessa região. As condições de contorno adotadas estão representadas na Figura 40.

Figura 40 – Representação esquemática das condições de contorno utilizadas nas simulações numéricas.



Para as simulações do escoamento de Nivea Creme, foram utilizados os diferentes valores de vazão mássica calculados a partir das medições experimentais. Para a análise do escoamento da tinta comercial CELLINK® Bioink, vazões volumétricas de 1, 50 e 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ foram usadas como referências, estabelecidas com base em valores semelhantes relatados na literatura (Colosi *et al.*, 2016; Distler *et al.*, 2020; Göhl *et al.*, 2018; Jia *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2015).

3.6.4 Simulações numéricas

As simulações de fluidodinâmica computacional foram conduzidas utilizando o *software* ANSYS Fluent® 2022 R1 (ANSYS Inc., Canonsburg, PA), em unidade de processamento (CPU) com configuração Intel(R) Core(TM) i7-7700K 4.20 GHz, memória RAM de 16 GB e placa de vídeo SSD LITEON L8H-256V2G-11 M.2 2280 256GB.

A análise foi feita no domínio bidimensional com condição de axissimetria e o *solver* utilizado foi do tipo *pressure-based*, em que a restrição de conservação de massa para o campo de velocidade é alcançada resolvendo uma equação de correção da pressão. O cálculo foi realizado aplicando o algoritmo SIMPLE para o acoplamento pressão-velocidade. Para discretização espacial, adotou-se a função de interpolação UpWind (UDS) para o momento e os esquemas de segunda ordem e PRESTO! para a pressão. Priorizou-se o esquema de segunda ordem, padrão da Ansys para esses casos, mas foi utilizado o esquema PRESTO! para as simulações cuja curva de resíduos não indicava convergência dentro das 100 primeiras iterações. Adotou-se o valor de 10^{-6} como critério de convergência para o resíduo das equações de conservação.

Foram simulados numericamente os escoamentos da tinta comercial CELLINK® Bioink e, para fins de validação do modelo numérico, de Nivea Creme. Os modelos Herschel-Bulkley e Lei de Potência foram testados para modelar o comportamento viscoso do Nivea Creme com os dados obtidos experimentalmente. Dois modelos relatados na literatura para o Nivea Creme também foram simulados e comparados: o modelo de Paxton *et al.* (2017), que empregaram a Lei de Potência com $K = 26,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ e $n = 0,552$, e o modelo de Tu *et al.* (2022), que propuseram o uso do modelo Herschel-Bulkley com $\tau_0 = 563 \text{ Pa}$, $K = 867,02 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ e $n = 0,045$.

Para a CELLINK® Bioink, os dados apresentados por Gómez-Blanco *et al.* (2020) foram utilizados. Os autores modelaram essa biotinta segundo a Lei de Potência, com $K = 102,53 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ e $n = 0,170$ para a temperatura de 25°C . A densidade foi considerada $1000 \text{ kg}/\text{m}^3$ (CELLINK, 2023b).

Na configuração do Ansys Fluent, foi utilizado o modelo Herschel-Bulkley para definir a viscosidade de todos os fluidos simulados. Ao selecionar este modelo, o algoritmo calcula a viscosidade (η) a partir das Equações 17 e 18, conforme o valor da taxa de deformação crítica $\dot{\gamma}_c$ (ANSYS, 2022).

Para $\dot{\gamma} > \dot{\gamma}_c$:

$$\eta = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} + K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (17)$$

Para $\dot{\gamma} < \dot{\gamma}_c$:

$$\eta = \frac{\tau_0(2 - \frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c})}{\dot{\gamma}_c} + k\dot{\gamma}_c^{n-1} \left((2 - n) + (n - 1)\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c} \right) \quad (18)$$

onde τ_0 é a tensão limite de escoamento (Pa), K é o índice de consistência de fluxo (Pa.sⁿ) e n é o expoente da lei de potência.

Com a tensão limite de escoamento igual a zero, fluidos representados pela Lei de Potência foram considerados um caso particular do modelo Herschel-Bulkley. A taxa de deformação crítica, a partir da qual o modelo selecionado é válido, foi definida como o limite mínimo da taxa de deformação adotada no ensaio reológico para caracterização do fluido. Paxton *et al.* (2017) relataram medições com taxa de deformação mínima igual a 0,01 s⁻¹; Tu *et al.* (2022) o valor de 0,0125 s⁻¹; e Gómez-Blanco *et al.* (2020) apresentaram gráfico com dados reológicos entre 0,01 e 100 s⁻¹.

Uma vez que a bioimpressão por extrusão foi operada em uma condição de baixa vazão e sem alterações térmicas, o escoamento foi modelado como laminar e isotérmico e o fluido assumido como incompressível, em consonância com a literatura (Göhl *et al.*, 2018; Gómez-Blanco *et al.*, 2020; Müller *et al.*, 2017).

Verificou-se o regime de escoamento calculando-se o número de Reynolds generalizado (Re), conforme proposto por Metzner e Reed (1955) e posteriormente por Chhabra e Richardson (2008). Para fluidos que seguem a Lei de Potência ou o modelo de Herschel-Bulkley, o número de Reynolds foi obtido através da Equação 19.

$$\text{Re}_{\text{MR}} = \frac{\rho V^{2-n} D^n}{8^{n-1} K \left(\frac{3n+1}{4n} \right)^n} \quad (19)$$

onde ρ é a densidade (kg/m^3), V é a velocidade média de escoamento (m/s), D é o diâmetro, n é o índice de comportamento da lei de potência e K é o índice de consistência. A velocidade média foi calculada em função do diâmetro e da vazão volumétrica.

Para avaliar a transição de escoamento laminar para turbulento, adotou-se o critério de Ryan e Johnson (1959), em que se a desigualdade apresentada na Equação 20 for satisfeita, o escoamento pode ser considerado laminar.

$$\text{Re} \leq \frac{6464n}{(3n + 1)^2} (2 + n)^{\frac{2+n}{1+n}} \quad (20)$$

3.6.5 Validação dos resultados numéricos e experimentais

3.6.5.1 Comparação com a literatura

A comparação com resultados já publicados na literatura foi inicialmente utilizada para analisar a qualidade da solução numérica e os estudos de independência de malha. O trabalho de Emermmacher *et al.* (2020) foi utilizado como referência, uma vez que estes autores apresentaram de forma detalhada os dados e a metodologia adotada para a simulação numérica, bem como os resultados obtidos em validação experimental, permitindo a comparação com o modelo feito no presente trabalho.

Para validar seu modelo numérico, Emermmacher *et al.* (2020) utilizaram uma mistura a base apenas de metilcelulose, denominada M-30, e a descreveram através do modelo Power-Law, como mostra a Equação 21.

$$\tau_{M-30} = 71.01\gamma^{0.419} \quad (21)$$

Nessas simulações, as condições de contorno empregadas foram pressão zero na entrada do domínio e vazão mássica na saída, variando conforme o calibre da agulha de ponta cônica, como mostra a Tabela 1.

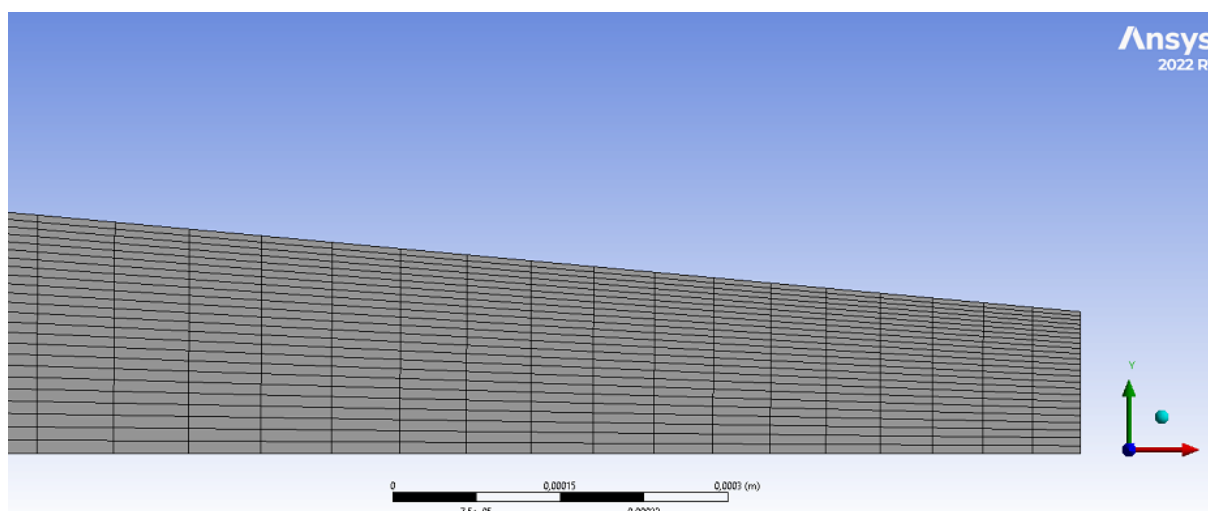
Tabela 1 – Vazão mássica e bocais utilizados por Emmermacher *et al.* (2020).

Bocal	Vazão mássica [mg/s]
10cc20GA	27,43
10cc22GA	14,60
10cc25GA	3,777

3.6.5.2 Teste de independência de malha

Malhas estruturadas uniformes com elementos quadriláteros foram geradas para cada domínio geométrico utilizado nas simulações, com o mesmo tamanho (*element size*). Uma vez que a região da camada-limite junto à parede é a de maior interesse, adotou-se um fator de transição geométrica suave (*smooth transition*), reduzindo a altura do elemento em direção à parede ao longo de toda a geometria. Na última parte da ponta cônica, para evitar elevada razão de aspecto, também foi aplicado um fator de transição para reduzir a largura do elemento na direção da saída. A Figura 41 apresenta a malha 4, mais grosseira, na região da saída da agulha 25G, onde é possível ver a redução do tamanho do elemento nas duas direções.

Figura 41 – Malha 4 na região de saída do bocal para o bocal 25G.



Para avaliar a independência dos resultados, foram geradas 4 malhas diferentes e realizados os testes de refinamento de malha H, em que se altera o tamanho do elemento. A cada refinamento, o tamanho do elemento foi reduzido pela metade e foi verificada a diferença entre as soluções.

Para cada uma das malhas, o comprimento de elemento de malha representativo, h , foi calculado conforme a Equação 22, como sugerido pela norma ASME V&V 20 (2009), e definiu-se $h_1 < h_2 < h_3$.

$$h = \left[\frac{1}{N} \sum_{i=1}^n (\Delta A_i) \right]^{1/2} \quad (22)$$

onde A_i é a área do i -ésimo elemento e N é o número total de elementos usadas para os cálculos. O fator de refinamento r foi mantido maior que 1,3, como mostra a Equação 23.

$$r = \frac{h_{\text{coarse}}}{h_{\text{fine}}} \approx 2 \quad (23)$$

As principais características das 4 malhas utilizadas para o maior e o menor diâmetro de saída dos bocais estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Caracterização das malhas geradas utilizando o bocal 16G.

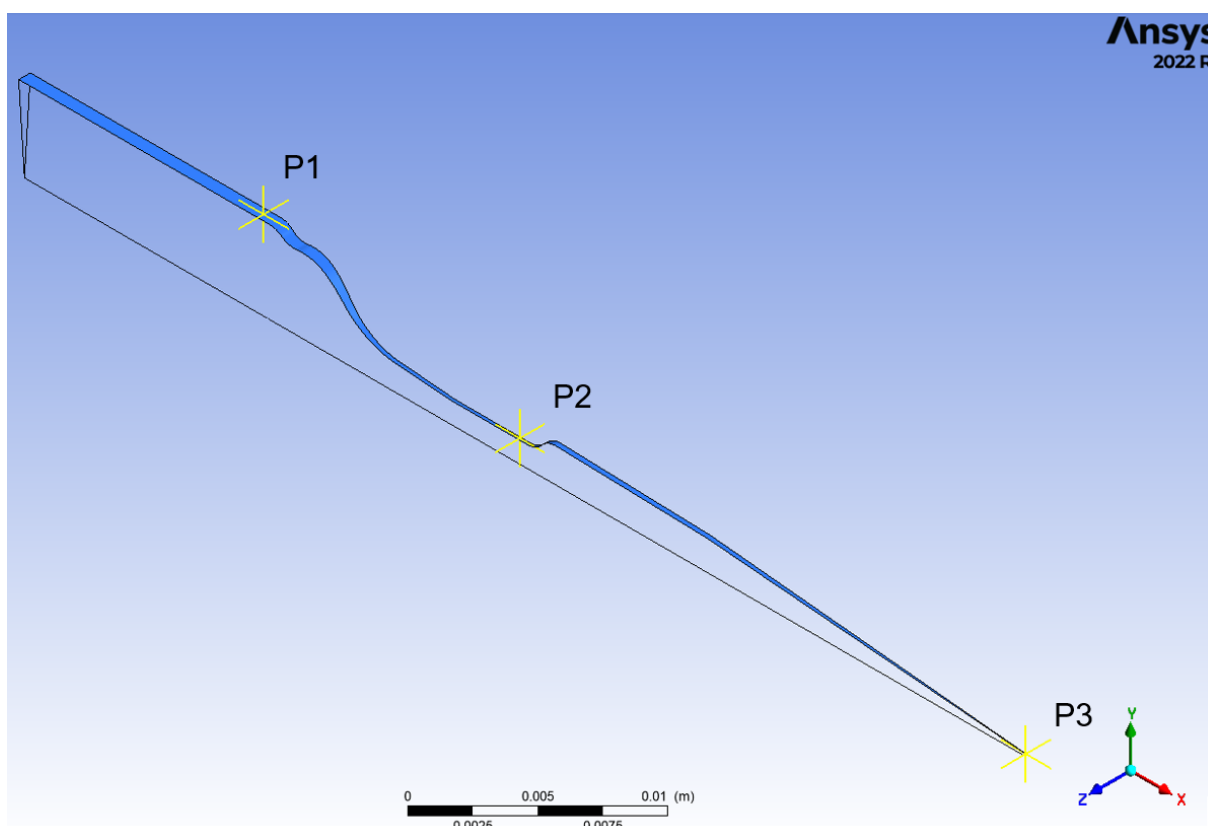
Características	Malha 4	Malha 3	Malha 2	Malha 1
Tamanho médio representativo [mm]	0,1423	0,0713	0,0357	0,0179
Nº de elementos	6600	26304	104832	418944
Nº de nós	6900	26901	106021	421319
Fator de redução (Bias Factor)	1,0300	1,0150	1,0080	1,0040
Qualidade ortogonal média	0,98926	0,9895	0,9896	0,9897
Qualidade ortogonal mínima	0,66960	0,6860	0,6910	0,6906
Razão de aspecto média	3,0616	3,0737	3,1069	3,1105
Razão de aspecto máxima	11,0110	11,2290	12,2510	12,3140

Tabela 3 – Caracterização das malhas geradas utilizando o bocal 25G.

Características	Malha 4	Malha 3	Malha 2	Malha 1
Tamanho médio representativo [mm]	0,1401	0,0702	0,0352	0,0176
Nº de elementos	6600	26304	104832	418944
Nº de nós	6900	26901	106021	421319
Fator de redução (Bias Factor)	1,0300	1,0150	1,0080	1,0040
Qualidade ortogonal média	0,9884	0,9891	0,9893	0,9895
Qualidade ortogonal mínima	0,6696	0,6860	0,6910	0,6906
Razão de aspecto média	4,1542	4,1712	4,2153	4,2202
Razão de aspecto máxima	11,5380	11,6980	12,3070	12,3630

Para verificar se as soluções numéricas com diferentes resoluções de malha estão no regime de convergência assintótica, três pontos na parede domínio foram escolhidos para comparar os valores de pressão e tensão de cisalhamento. Como mostrado na Figura 42, o primeiro ponto foi definido sobre o corpo da seringa, enquanto segundo foi escolhido na região do bico, onde há redução do seu diâmetro; já o terceiro ponto foi definido na região mais crítica do domínio, próximo ao final da agulha cônica.

Figura 42 – Pontos utilizados nos testes de malha para verificar a convergência dos resultados.



3.6.5.3 Estimativa da incerteza numérica

Conforme definido pela norma ASME V&V 20 (2009), a validação do modelo numérico deve ser precedida da verificação, para avaliar sua qualidade e estabilidade. Antes de verificar a solução, a norma orienta a verificação do código. *Software* comercial amplamente utilizado e difundido, o Ansys possui testes formais de verificação bem documentadas. O documento Fluid Dynamics Verification Manual inclui o escoamento em um tubo circular de um fluido não-newtoniano, cuja viscosidade é especificada pela lei de potência. Por isso, não foi feita a verificação do código.

A verificação de cálculo é aplicada ao modelo computacional destinado a prever os resultados experimentais de validação, neste caso, o escoamento de Nivea Creme. Uma vez que a solução exata para este escoamento não é conhecida, a verificação foi realizada a partir do erro estimado ou incerteza da solução numérica (u_{num}). Empregou-se então o índice de convergência da malha (*Grid Convergence Index - GCI*), uma estimativa da incerteza com 95% de confiabilidade, multiplicando o valor da incerteza combinada pelo fator de segurança (FS) (ASME, 2009).

Para calcular o GCI, primeiro calculou-se a ordem de convergência (p), conforme a Equação 24.

$$p = \frac{1}{\ln r_{21}} \left[\ln \left| \frac{\varepsilon_{32}}{\varepsilon_{21}} \right| + q(p) \right] \quad (24)$$

onde $\varepsilon_{32} = \phi_3 - \phi_2$, $\varepsilon_{21} = \phi_2 - \phi_1$, ϕ denota o valor da variável de interesse na simulação e $q(p) = 0$, uma vez que o fator de refinamento, r , é constante. Neste trabalho, foram utilizados para os cálculos e comparados os valores da pressão no ponto 3. Calculou-se, então, os valores extrapolados (ϕ_{ext}), conforme a Equação 25.

$$\phi_{ext}^{21} = \frac{r_{21}^p \phi_1 - \phi_2}{r_{21}^p - 1} \quad (25)$$

Na próxima etapa, calculou-se o erro relativo aproximado (e_a), Equação 26, e o erro relativo extrapolado (e_{ext}), Equação 27.

$$e_a^{21} = |\phi_1 - \phi_2| \quad (26)$$

$$e_{\text{ext}}^{21} = \left| \frac{\phi_{\text{ext}}^{21} - \phi_1}{\phi_{\text{ext}}^{21}} \right| \quad (27)$$

Por fim, calculou-se o GCI, de acordo com a Equação 28.

$$\text{GCI}_{\text{refinado}}^{21} = \text{FS} \left(\frac{e_a^{21}}{r_{21}^p - 1} \right) \quad (28)$$

onde FS = 1,25 para um intervalo de confiança de 95% em estudos envolvendo três malhas estruturadas, conforme sugerido pela norma (ASME, 2009). Associou-se então a incerteza numérica expandida com GCI, considerando uma distribuição normal, com 95% de confiança e grau de liberdade efetivo infinito ($t_{st}=2$), conforme a Equação 29.

$$u_{\text{num}} = \frac{U_{\text{num}}}{t_{st}} = \frac{\text{GCI}}{2} \quad (29)$$

3.6.5.4 Diferença entre valores numéricos e experimentais

Combinação de todos os erros no resultado da simulação e no resultado experimental, o erro de comparação da validação (E) é definido pela Equação 30.

$$E = S - D = \delta_S - \delta_D \quad (30)$$

onde S é o valor simulado, D é o valor experimental, δ_S é o erro da solução numérica e δ_D é o erro do valor experimental. O valor obtido através da simulação (S) e comparado com a medida experimental (D) foi a variação da pressão.

Os erros da simulação (δ_S) podem ser atribuídos aos erros oriundos das hipóteses e simplificações do modelo (δ_{model}), da solução numérica (δ_{num}), ou dos parâmetros de entrada da simulação (δ_{input}), conforme a Equação 31.

$$\delta_S = \delta_{\text{model}} + \delta_{\text{num}} + \delta_{\text{input}} \quad (31)$$

Assim, tem-se que o erro do modelo pode ser obtido conforme a Equação 32, onde u_{val} é a incerteza padrão da validação.

$$\delta_{\text{model}} = E - (\delta_{\text{num}} + \delta_{\text{input}} - \delta_D) = (E \pm u_{\text{val}}) \quad (32)$$

Para determinar a incerteza padrão combinada, utilizou-se as incertezas associadas a estes parâmetros, que são independentes, como mostra a Equação 33.

$$u_{\text{val}} = \sqrt{u_{\text{num}}^2 + u_{\text{input}}^2 + u_D^2} \quad (33)$$

A incerteza numérica foi obtida conforme procedimento apresentado no item 3.6.5.3 deste trabalho, a incerteza experimental relação ao resultado (pressão) e a incerteza relacionada ao input (vazão mássica e densidade) foram calculadas conforme apresentado no item 3.4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

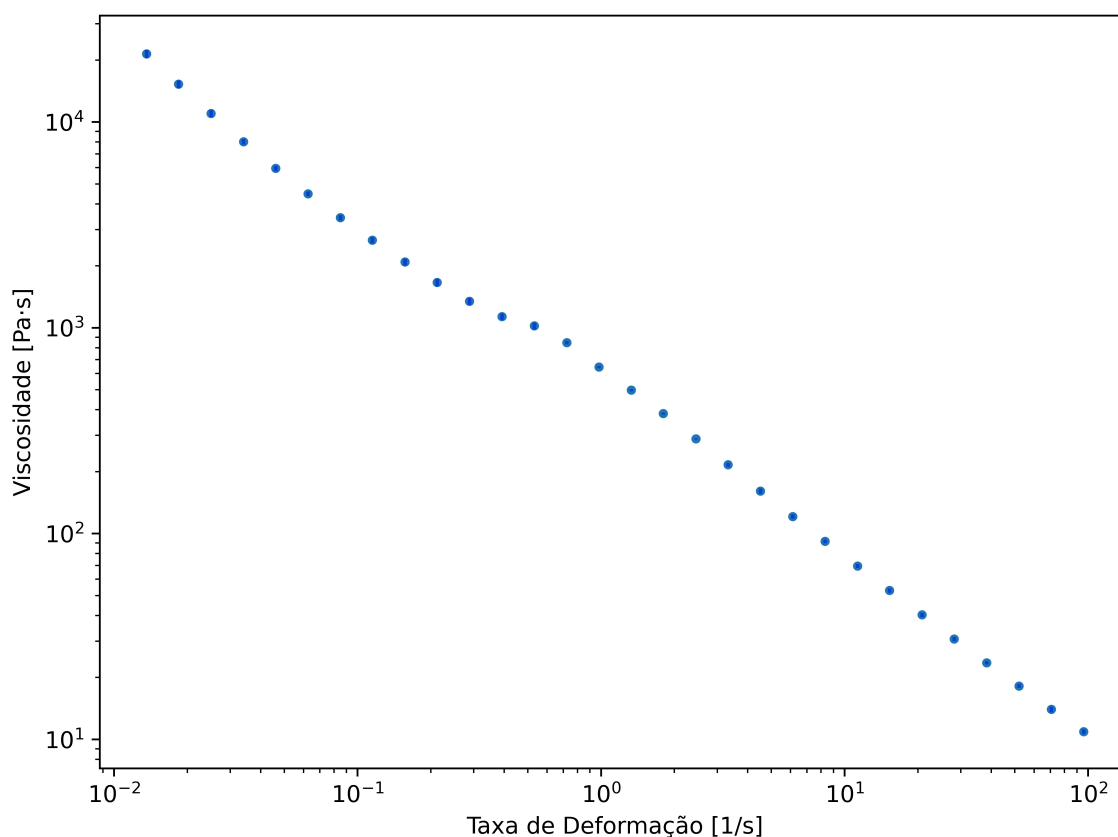
4.1 Simulações de Fluidodinâmica Computacional

4.1.1 Caracterização do Nivea Creme

A densidade do Nivea Creme foi determinada em $\rho = (972,20 \pm 10,60) \text{ kg/m}^3$ a 25°C e pressão ambiente, onde o número após o símbolo \pm é o valor numérico da incerteza expandida, estimado para ter um nível da confiança de 95%, conforme cálculo apresentado no Apêndice B.

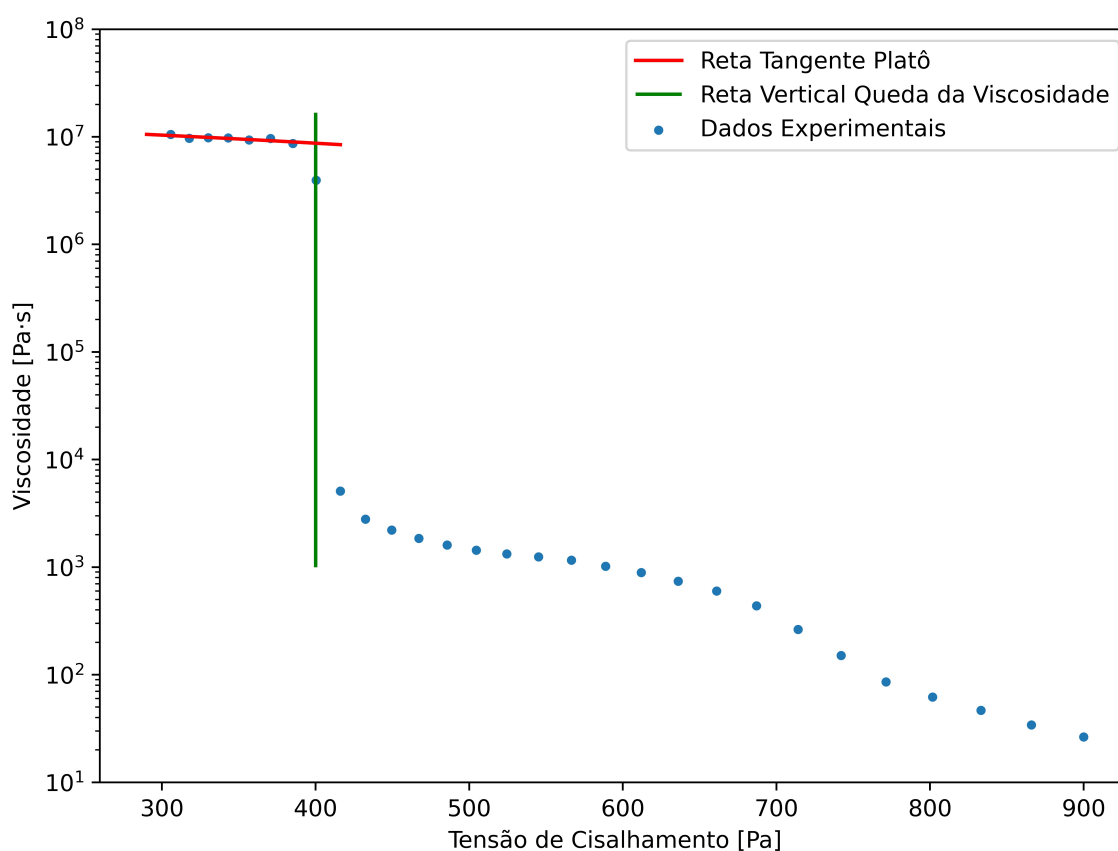
Ao ser submetido a rampa de taxa de deformação para caracterização de seu comportamento viscoso em ensaio reológico, Nivea Creme demonstrou pseudoplasticidade. Como mostrado na Figura 43 e em consonância com a literatura (Paxton *et al.*, 2017; Tu *et al.*, 2022), a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de deformação. Destaca-se que o desvio-padrão foi muito menor que o valor das variáveis medidas e as barras de erro se tornaram muito pequenas para serem perceptíveis no gráfico.

Figura 43 – Resultados experimentais da viscosidade do Nivea Creme em função da rampa de taxa de deformação.



A ordem de grandeza da viscosidade foi coerente com os valores apresentados por Tu *et al.* (2022) em todo o intervalo de taxa de deformação analisado neste trabalho. Por outro lado, a viscosidade obtida foi significativamente diferente dos resultados de Paxton *et al.* (2017). Além de reportarem dificuldades e inconsistências na medição da amostra de Nivea Creme para taxas de deformação mais altas, Paxton *et al.* (2017) encontraram valores de viscosidade com aproximadamente duas ordens de grandeza menores dentro do intervalo de 10^{-2} a 100 s^{-1} .

Figura 44 – Resultados experimentais da viscosidade do Nivea Creme em função da rampa de tensão de cisalhamento. A linha vermelha representa a regressão linear na região de platô da viscosidade, enquanto a linha verde representa a queda da viscosidade.

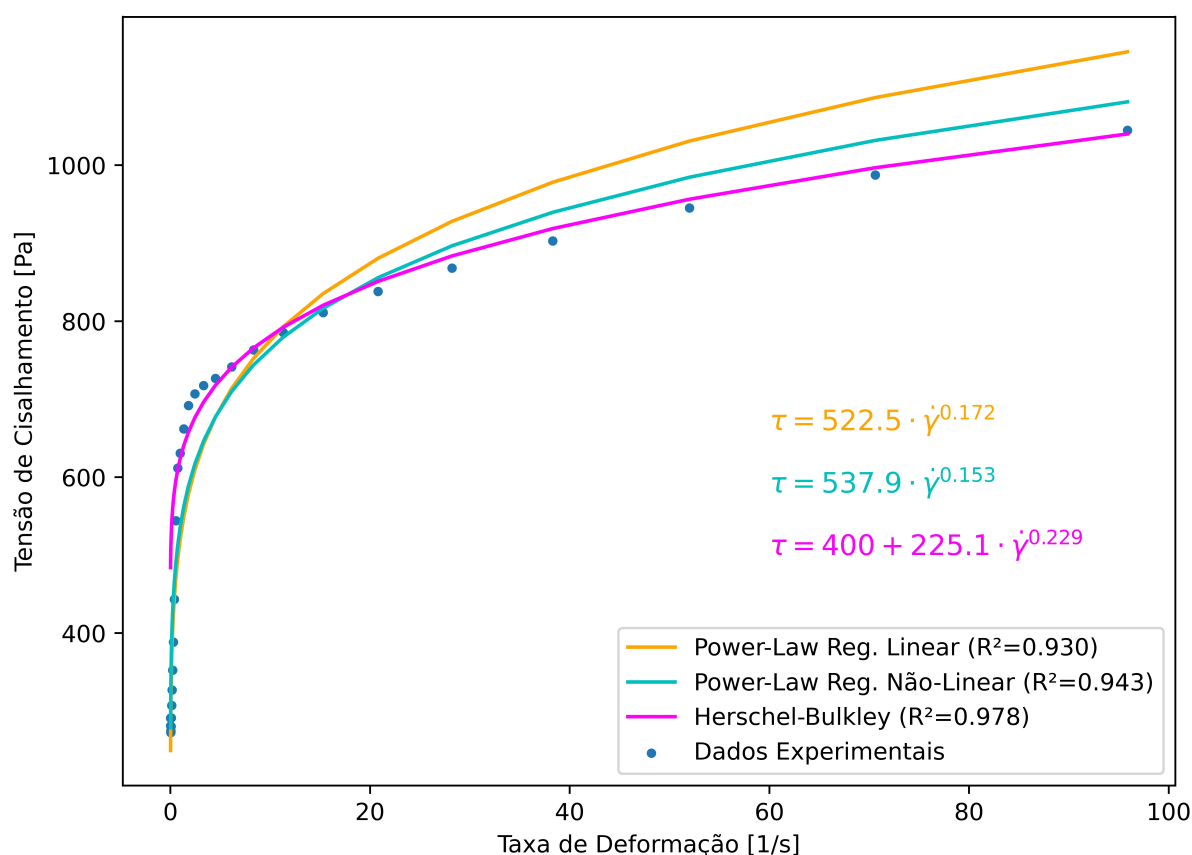


Quanto ao ensaio da viscosidade em função tensão de cisalhamento, os dados foram apresentados entre 300 e 1000 Pa para destacar a região de queda da viscosidade. A tensão de escoamento do Nivea Creme, $\tau_0 = 400 \text{ Pa}$, foi estimada no ponto de intersecção entre uma regressão linear na região de platô (vermelha) e uma reta, paralela ao eixo y, que representa a queda de viscosidade (verde), conforme apresentado na Figura 44. Observou-se um desvio-padrão muito grande neste ponto, da mesma ordem de grandeza que a variável viscosidade. Isso pode ser explicado pela instabilidade da medição associada ao ponto de escoamento, onde subitamente há uma variação muito grande da viscosidade.

O valor encontrado para a tensão de escoamento está dentro da ampla faixa relatada na literatura para o Nivea Creme, entre 72 e 563 Pa (Schulz; Siirro; Nijman, 2008; Paxton *et al.*, 2017; Tu *et al.*, 2022). A tensão de escoamento é influenciada por diversos fatores, como a composição do creme, a temperatura e as condições do experimento. A diferença entre a temperatura que os testes foram conduzidos nesses trabalhos foi insignificante (1°C), mas variações nos métodos de medição, dispositivos utilizados, procedimentos experimentais, diferentes lotes de Nivea Creme ou mesmo a variação na composição do produto ao longo do tempo devido a possíveis mudanças na formulação podem contribuir para essa diversidade de valores.

Uma vez que o Nivea Creme apresentou comportamento pseudoplástico, mas também tensão de escoamento, ambos os modelos Lei de Potência e Herschel Bulkley foram testados para ajustar à curva de escoamento. Os modelos estão apresentados na Figura 45 junto com os dados obtidos no ensaio de rampa de taxa de deformação.

Figura 45 – Curva de escoamento experimental do Nivea Creme, juntamente com as curvas de ajuste conforme os modelos Lei de Potência e Herschel-Bulkley.



Os dados experimentais foram ajustados ao modelo de Lei de Potência transformando a equação em uma forma linear para facilitar a determinação dos coeficientes por meio de técnicas tradicionais de regressão linear. Dessa forma, foi obtida a relação representada pela Equação 34.

$$\tau = 522,5\dot{\gamma}^{0,172} \quad (34)$$

Para uma estimativa mais precisa dos coeficientes, foi utilizada também a função "curve fit", em Python, que utiliza o método dos mínimos quadrados não-lineares para ajustar os parâmetros do modelo de Lei de Potência aos dados experimentais. A relação obtida através dessa abordagem está apresentada na Equação 35, que possui maior o coeficiente de determinação (R^2), como indicado na Figura 45.

$$\tau = 537,9\dot{\gamma}^{0,153} \quad (35)$$

O modelo Herschel Bulkley, apresentado na Equação 36, foi obtido por regressão linear utilizando os dados experimentais com tensão de cisalhamento superior a 400 Pa e, nessa região, mostrou excelente ajuste. O coeficiente de determinação calculado para toda a curva de escoamento foi igual a 0,704 e indicou que o ajuste global à curva não foi tão preciso, mas para a região específica onde $\tau > 400$ Pa foi calculado em R^2 igual a 0,978.

$$\tau = 400 + 225,1\dot{\gamma}^{0,229} \quad (36)$$

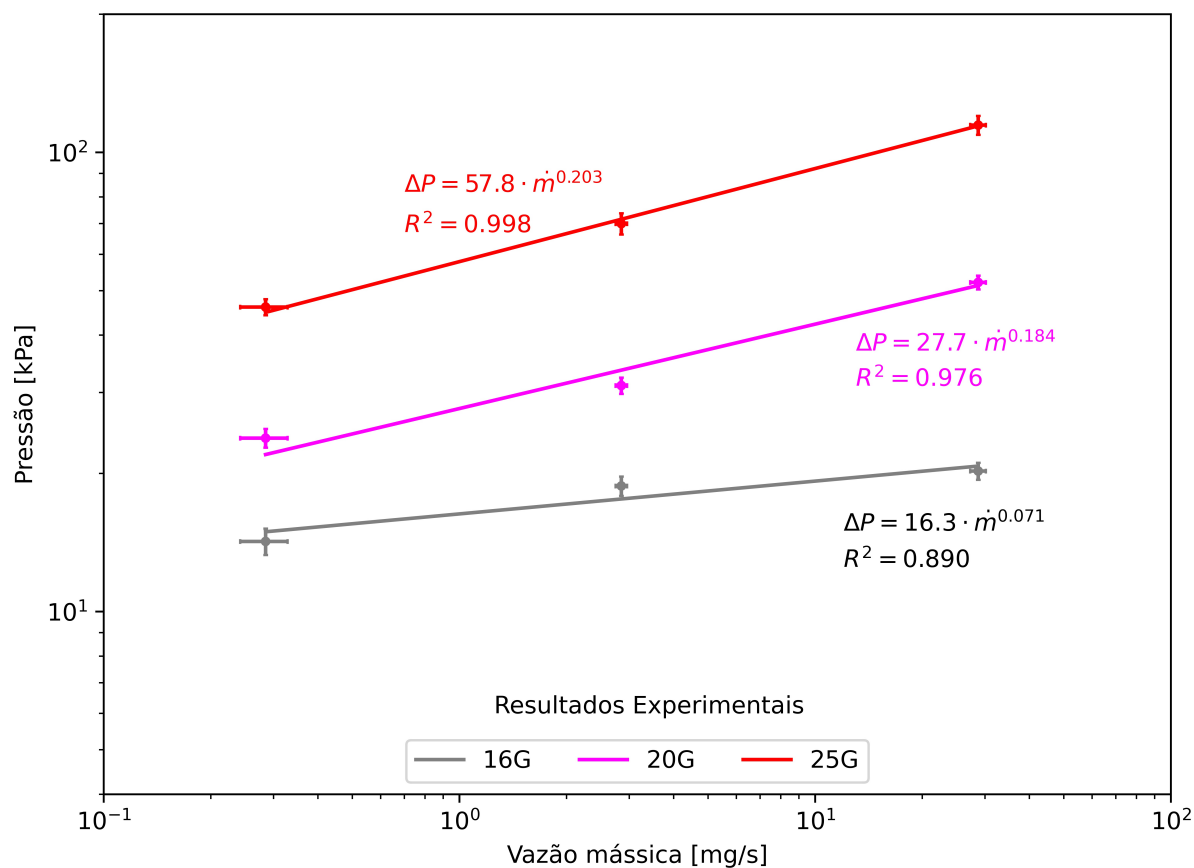
4.1.2 Teste de malha e validação

A vazão mássica de Nivea Creme foi calculada para cada configuração de extrusão (*G-code*) como a média dos valores obtidos experimentalmente utilizando bocais com diferentes diâmetros de saída e os resultados estão apresentados na Tabela 4. O número após o símbolo \pm é o valor numérico da incerteza expandida, estimado para ter um nível da confiança de 95%, conforme cálculo apresentado no Apêndice C.

Tabela 4 – Relação entre os comandos de extrusão utilizados e a vazão mássica.

Comando	Vazão mássica [kg/s]
G1 E50 F25	$(2,87 \pm 0,15) \times 10^{-5}$
G1 E50 F2.5	$(2,85 \pm 0,10) \times 10^{-6}$
G1 E50 F0.25	$(2,85 \pm 0,43) \times 10^{-7}$

A relação entre a vazão mássica e a pressão diferencial medida com manômetro para cada configuração de extrusão e bocal está apresentada na Figura 46, acompanhada da incerteza expandida, estimada para ter um nível da confiança de 95%, conforme cálculo apresentado no Apêndice D. Durante os experimentos, observou-se que a pressão indicada pelo manômetro começou a subir antes que o fluido começasse a escoar através da saída da agulha, indicando que há uma tensão de escoamento, como previsto no ensaio reológico.

Figura 46 – Pressão diferencial (Δp) medida experimentalmente em processo de extrusão livre de filamentos de Nivea Creme em relação à vazão mássica medida.

As linhas de tendência dos dados foram ajustadas em funções de potência com bons coeficientes de determinação (R^2). Observou-se o aumento significativo tanto da constante, quanto do expoente da função potência, principalmente em relação à geometria com a ponta 16G.

O número de Reynolds generalizado (Re) foi calculado para cada valor de vazão mássica e diâmetro do bocal e foi encontrado um valor máximo de 1,01 para o modelo Lei de Potência e 1,14 para o modelo Herschel Bulkley. Para o modelo de Lei de Potência obtido por regressão não-linear, tem-se $n = 0,153$ e o escoamento pode ser considerado laminar para $Re < 1945$, conforme o critério de Ryan e Johnson (1959). Para o modelo Herschel Bulkley, $n = 0,229$ e $Re < 2225$. Portanto, a suposição inicial de escoamento laminar está correta.

Uma vez que as condições de contorno do modelo numérico do escoamento de Nivea Creme foram definidas como pressão nula na entrada e vazão mássica na saída, o ponto mais representativo para o cálculo da incerteza numérica foi localizado próximo a saída (ponto 3, conforme mostrado item 3.6.5.2). A incerteza numérica dos resultados para pressão neste ponto foi calculada para as malhas 1 (418.944 elementos), 2 (104.832 elementos) e 3 (26.304 elementos). Em alguns casos, a ordem de convergência (p) calculada resultou em um valor menor que 1, como mostra a Tabela 5, sugerindo que os resultados não estão em convergência. Então, os valores de pressão no ponto 3, incluindo também a malha 4 (6600 elementos), foram traçados em função do número de elementos, para verificar se havia regime de convergência assintótica e por que o valor de p foi diferente do esperado.

Tabela 5 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 28,7 mg/s.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ε	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
LP	3	$6,80 \times 10^4$		-0,54						
	2	$6,47 \times 10^4$	$3,30 \times 10^3$		$7,53 \times 10^4$	$3,30 \times 10^3$	14,13%	$-1,33 \times 10^4$	-20,57%	$-6,65 \times 10^3$
	1	$6,95 \times 10^4$	$-4,78 \times 10^3$		$5,40 \times 10^4$	$4,78 \times 10^3$	28,55%	$-1,93 \times 10^4$	-27,76%	$-9,64 \times 10^3$
HB	3	$6,51 \times 10^4$		0,35						
	2	$6,71 \times 10^4$	$-2,07 \times 10^3$		$7,46 \times 10^4$	$2,07 \times 10^3$	10,07%	$9,40 \times 10^3$	14,00%	$4,70 \times 10^3$
	1	$6,55 \times 10^4$	$1,62 \times 10^3$		$5,96 \times 10^4$	$1,62 \times 10^3$	9,90%	$7,37 \times 10^3$	11,26%	$3,69 \times 10^3$

Nota: Modelo LP significa Lei de Potência e HB significa Herschel Bulkley. Resultados para pressão no ponto 3 (Δp), $\varepsilon_{21} = \phi_2 - \phi_1$, ordem de convergência (p), valores extrapolados (ϕ_{ext}), erro relativo aproximado (e_a), erro relativo extrapolado (e_{ext}), índice de convergência da malha (*Grid Convergence Index* - GCI) e incerteza numérica expandida com 95% de confiança (u_{num}).

Todos os resultados obtidos para a geometria com bocal 25G estão dentro da curva de convergência assintótica, mas para o bocal 16G foram observados valores fora da curva de convergência. Comparando-se os dois modelos testados, os resultados obtidos utilizando o modelo Lei de Potência, em geral, apresentaram maior convergência do que para o modelo Herschel Bulkley.

Com o modelo Lei de Potência, foram obtidos valores de p menor que 1 ao simular o escoamento com maior vazão (28,7 mg/s) utilizando os bocais 16G e 20G. Como mostrado na Figura 47, para o bocal 16G, o resultado da malha 2 (104.832 elementos) está fora da curva de convergência, ajustada com tendência exponencial. Para o bocal 20G, apesar do valor de p inesperado, foi verificada a convergência, como mostra a Figura 48.

Figura 47 – Teste de convergência de malha para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 28,7 mg/s utilizando o modelo Lei de Potência.

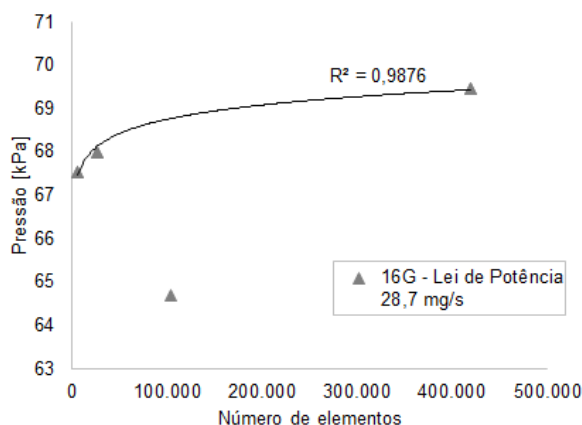
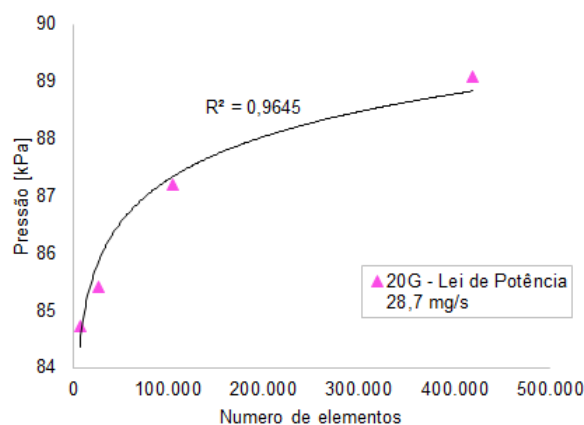


Figura 48 – Teste de convergência de malha para a geometria com bocal 20G e vazão igual a 28,7 mg/s utilizando o modelo Lei de Potência.



Comportamento similar foi observado ao avaliar a convergência dos resultados obtidos utilizando o modelo Herschel Bulkley, porém, com esse modelo, a ordem de convergência foi menor que 1 para todas as vazões utilizando a seringa 16G. Como mostram as Figuras 49 e 50, para vazões elevadas o resultado da malha 2 está fora da curva de convergência, mas para a vazões baixas todos os valores estavam dentro da curva convergência, ainda que o valor de p fosse menor que 1.

Figura 49 – Teste de convergência de malha para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 28,7 mg/s utilizando o modelo Herschel Bulkley.

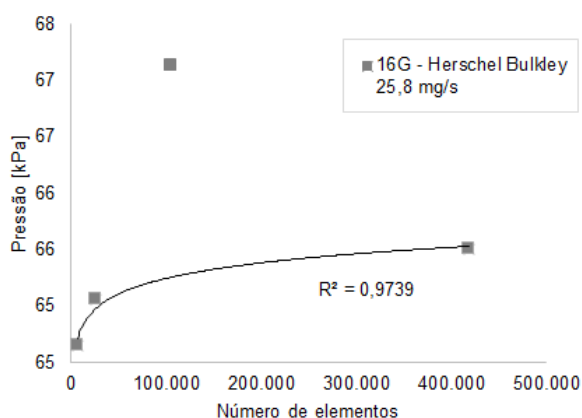
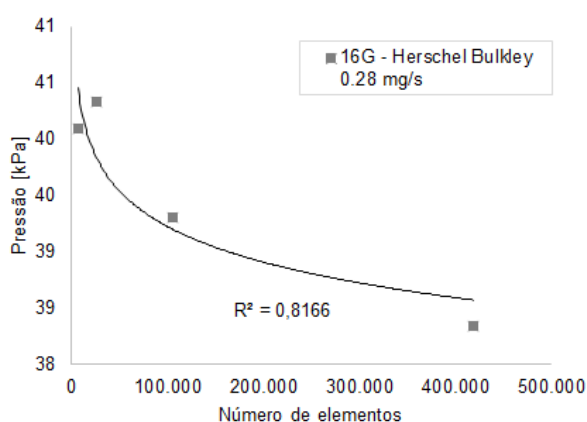


Figura 50 – Teste de convergência de malha para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 0,285 mg/s utilizando o modelo Herschel Bulkley.



De uma forma geral, o erro em relação a linha de tendência da convergência assintótica foi menor que 5%, por isso a ordem de convergência (p) foi assumida igual a 1,0 quando o cálculo resultou em valor inferior, conforme sugerido pela norma ASME V&V 20. Os cálculos da incerteza numérica expandida para os bocais 16G e 25G estão apresentados nas Tabelas 6 e 7. Para as demais vazões e bocais, o procedimento foi o mesmo e está apresentado no Apêndice E.

Tabela 6 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 28,7 mg/s para as malhas 3 (26.304 elementos), 2 (104.832 elementos) e 1 (418.944 elementos), detalhadas na metodologia.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ϵ	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
LP	3	$6,80 \times 10^4$		1,00						
	2	$6,47 \times 10^4$	$3,30 \times 10^3$		$6,14 \times 10^4$	$3,30 \times 10^3$	5,40%	$4,14 \times 10^3$	6,40%	$2,07 \times 10^3$
	1	$6,95 \times 10^4$	$-4,78 \times 10^3$		$7,43 \times 10^4$	$4,78 \times 10^3$	6,46%	$6,00 \times 10^3$	8,64%	$3,00 \times 10^3$
HB	3	$6,51 \times 10^4$		1,00						
	2	$6,71 \times 10^4$	$-2,07 \times 10^3$		$6,92 \times 10^4$	$2,07 \times 10^3$	3,00%	$2,59 \times 10^3$	3,86%	$1,30 \times 10^3$
	1	$6,55 \times 10^4$	$1,62 \times 10^3$		$6,39 \times 10^4$	$1,62 \times 10^3$	2,55%	$2,03 \times 10^3$	3,10%	$1,02 \times 10^3$

Tabela 7 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 25G e vazão igual a 0,285 mg/s.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ϵ	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
LP	3	$5,89 \times 10^4$		1,47						
	2	$5,94 \times 10^4$	$-5,45 \times 10^2$		$5,97 \times 10^4$	$5,45 \times 10^2$	0,52%	$3,87 \times 10^2$	0,65%	$1,93 \times 10^2$
	1	$6,09 \times 10^4$	$-1,50 \times 10^3$		$6,18 \times 10^4$	$1,50 \times 10^3$	1,38%	$1,07 \times 10^3$	1,75%	$5,34 \times 10^2$
HB	3	$6,79 \times 10^4$		1,00						
	2	$6,88 \times 10^4$	$-9,06 \times 10^2$		$6,97 \times 10^4$	$9,06 \times 10^2$	1,30%	$1,13 \times 10^3$	1,65%	$5,66 \times 10^2$
	1	$7,06 \times 10^4$	$-1,81 \times 10^3$		$7,24 \times 10^4$	$1,81 \times 10^3$	2,50%	$2,26 \times 10^3$	3,21%	$1,13 \times 10^3$

Apesar dos resultados excepcionais encontrados utilizando o bocal 16G e vazão de 28,5 mg/s, a malha 2 tem resultados próximos à curva de convergência e incerteza de medição semelhante à malha 1. Então, a malha 2 foi escolhida por não ter tomado tanto tempo computacional, exigindo menos iterações para alcançar a solução.

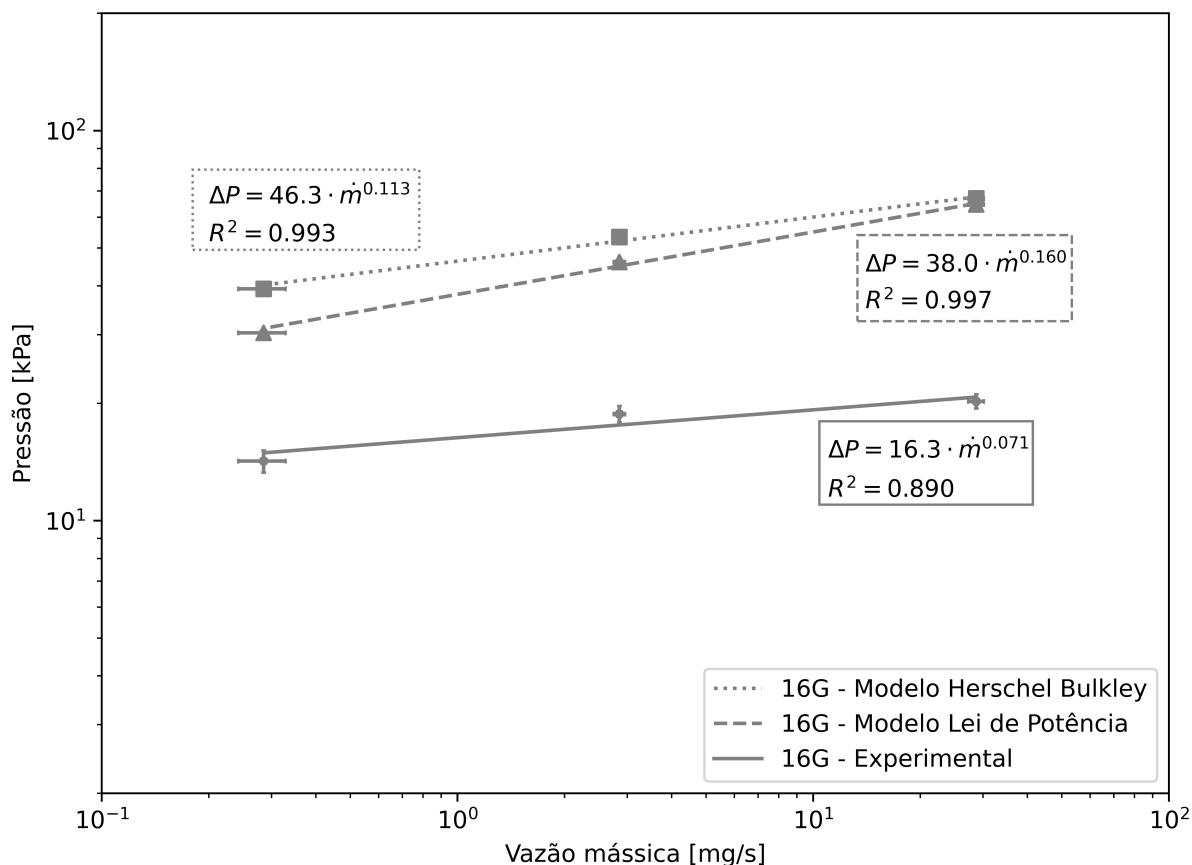
Os resultados para a pressão no ponto 3 obtidos para os modelos da Lei de Potência e Herschel Bulkley em todas as condições analisadas estão apresentados na Tabela 8, onde o número após o símbolo \pm é a incerteza numérica expandida para um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 8 – Resultados numéricos da pressão segundo os modelos Lei de Potência e Herschel Bulkley seguidos da incerteza numérica expandida com 95% de confiança, considerando os diferentes bocais utilizados (16G, 20G e 25G) e vazões mássicas medidas.

Bocal	Vazão Mássica [kg/s]	Pressão Ponto 3 [kPa]	
		Lei de Potência	Herschel Bulkley
16G	$2,87 \times 10^{-5}$	$64,69 \pm 2,07$	$67,12 \pm 1,30$
	$2,85 \times 10^{-6}$	$46,05 \pm 0,02$	$53,43 \pm 1,20$
	$2,85 \times 10^{-7}$	$30,34 \pm 0,23$	$39,31 \pm 0,64$
20G	$2,87 \times 10^{-5}$	$87,19 \pm 1,12$	$87,68 \pm 1,47$
	$2,85 \times 10^{-6}$	$60,85 \pm 0,29$	$67,32 \pm 0,58$
	$2,85 \times 10^{-7}$	$41,23 \pm 0,08$	$51,36 \pm 0,41$
25G	$2,87 \times 10^{-5}$	$122,56 \pm 0,38$	$121,78 \pm 0,10$
	$2,85 \times 10^{-6}$	$86,64 \pm 0,41$	$92,24 \pm 1,33$
	$2,85 \times 10^{-7}$	$59,40 \pm 0,19$	$68,79 \pm 0,57$

A relação entre a vazão mássica e a pressão no ponto 3 obtidos para os modelos da Lei de Potência e Herschel Bulkley em todas as condições analisadas foram comparadas com os resultados experimentais.

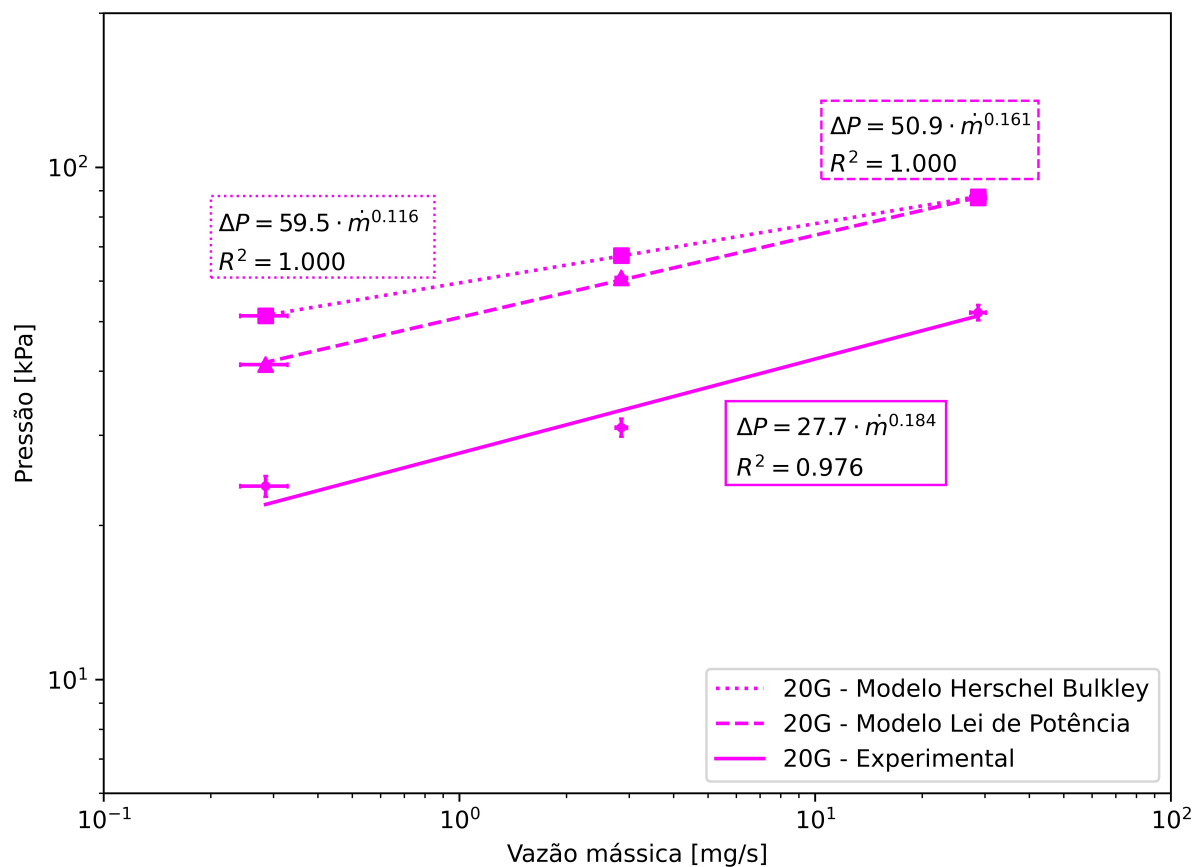
Figura 51 – Resultados numéricos e experimentais para variação da pressão durante o processo de extrusão usando bocal 16G, em função da vazão mássica.



Os resultados para os modelos Lei de Potência e Herschel Bulkley ao utilizar o bocal 16G, mostrados na Figura 51, mostraram uma diferença de apenas 4% para vazões altas, mas divergiram em cerca de 30% com a diminuição desse parâmetro. Em relação aos resultados experimentais, os modelos numéricos mostraram um desvio significativo chegando a ser mais de 3 vezes maior.

Comportamento similar foi observado ao analisar os resultados das simulações numéricas para a geometria com ponta 20G, apresentados na Figura 52. As diferenças entre os resultados numéricos e experimentais diminuíram em relação a discrepância observada anteriormente para o diâmetro maior, mas ainda são significativas.

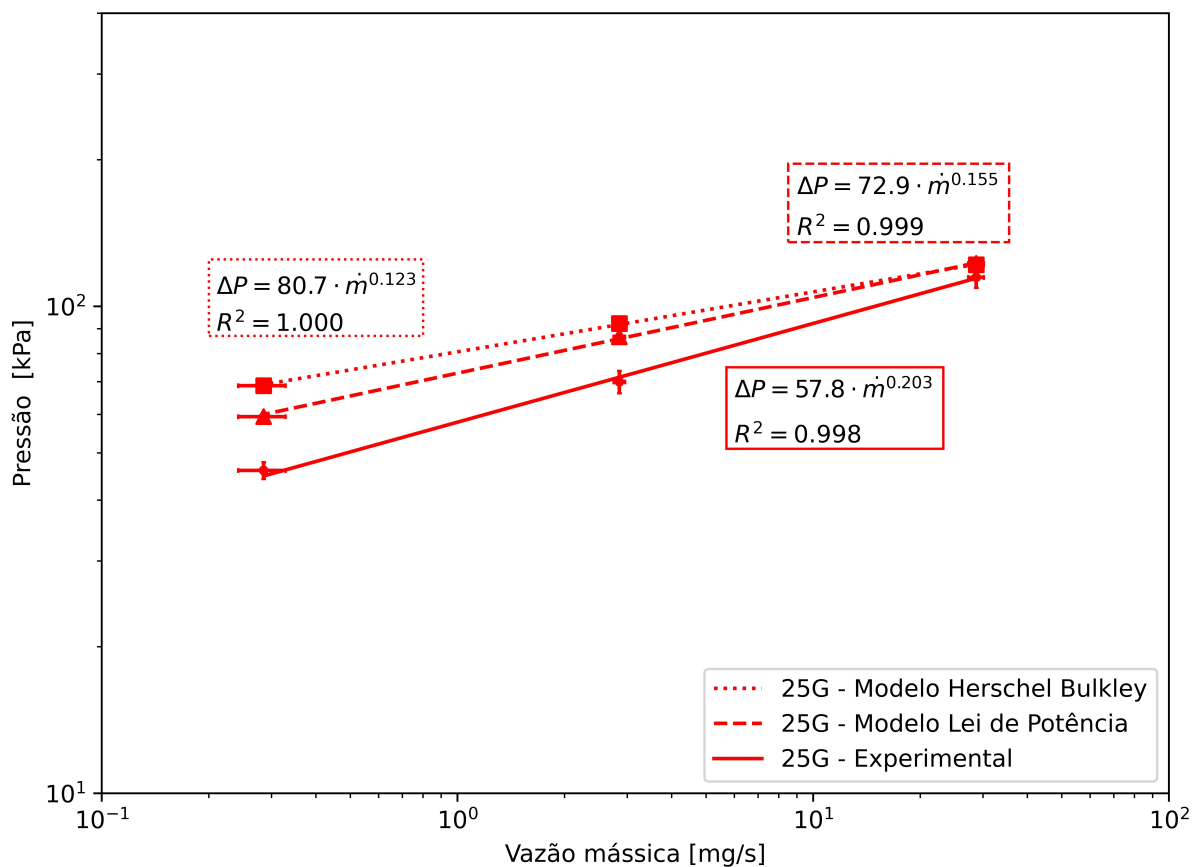
Figura 52 – Resultados numéricos e experimentais para variação da pressão durante o processo de extrusão usando bocal 20G, em função da vazão mássica.



Os melhores resultados de convergência do modelo numérico foram obtidos ao utilizar o bocal 25G, com menor diâmetro de saída, como mostra a Figura 53. Como para os outros bocais, diferenças irrelevantes foram observadas entre os modelos Lei de Potência e Herschel Bulkley para altas vazões e, com a diminuição da vazão, um aumento dessa diferença.

Em geral, os resultados numéricos superestimaram os valores de pressão e, ao diminuir o diâmetro do bocal, tiveram um aumento da constante da função potência ajustada às curvas, enquanto os expoentes apresentaram uma diferença entre si de, no máximo, 9% para o modelo Herschel Bulkley e 4% para o modelo Lei de Potência. Os expoentes encontrados têm valores próximos ao índice de potência usado para o modelo de viscosidade. Por outro lado, observou-se que as curvas experimentais tiveram funções de potência significativamente diferentes.

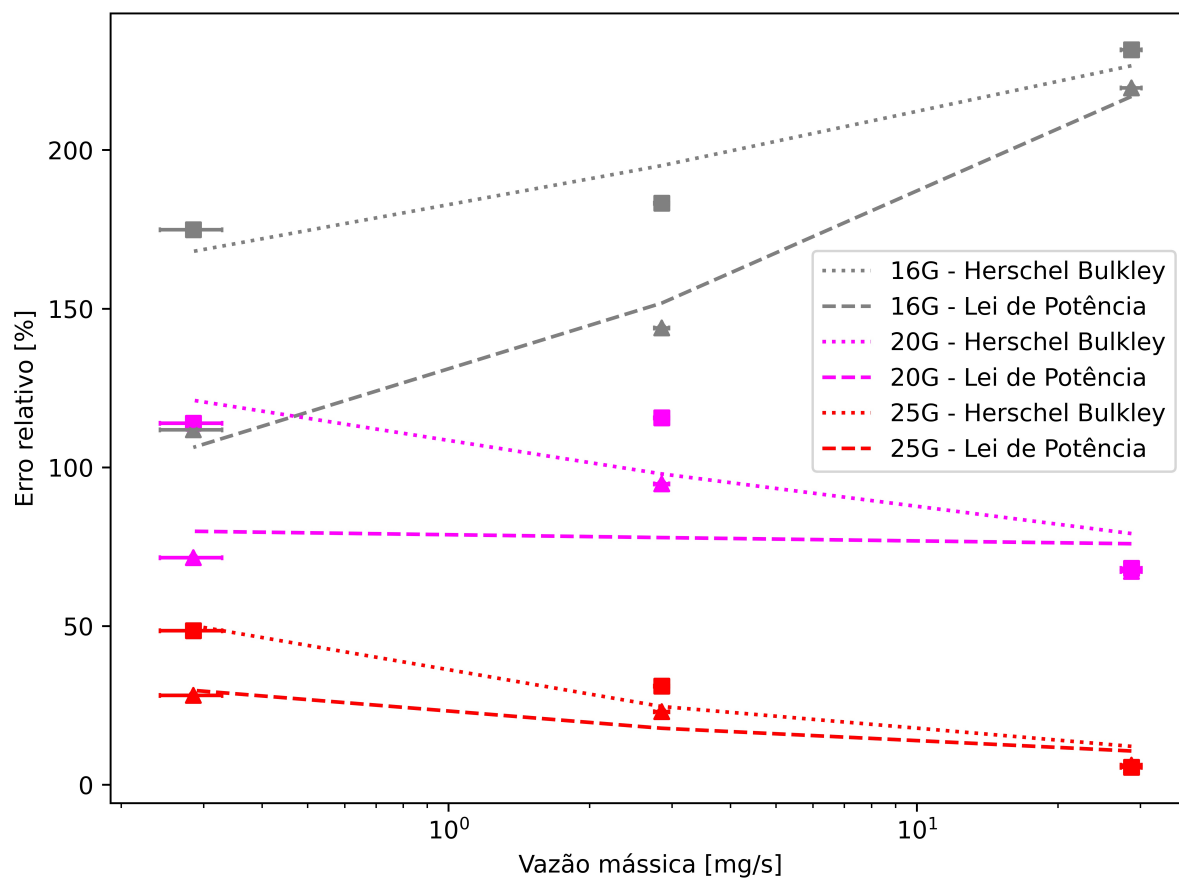
Figura 53 – Resultados numéricos e experimentais para variação da pressão durante o processo de extrusão usando bocal 25G, em função da vazão mássica.



Para melhor compreensão do erro de comparação da validação (E), os resultados do erro relativo ao resultado experimental (%) foram organizados no gráfico mostrado na Figura 54. O modelo de viscosidade Lei de Potência apresentou menor erro que o modelo Herschel Bulkley para todas as condições analisadas. Por outro lado, as linhas de tendência indicam que, para vazões maiores que as utilizadas neste trabalho, o modelo Herschel Bulkley apresentará erros menores.

Para o bocal 16G, os resultados numéricos apresentam erros expressivos e não permitem a validação dos modelos e, para o bocal 20G, apesar de esses erros diminuírem, eles também são significativos. A melhor condição foi encontrada para a simulação do escoamento utilizando bocal 25G a uma vazão igual a 28,5 mg/s, que teve erro relativo de validação de apenas 6%

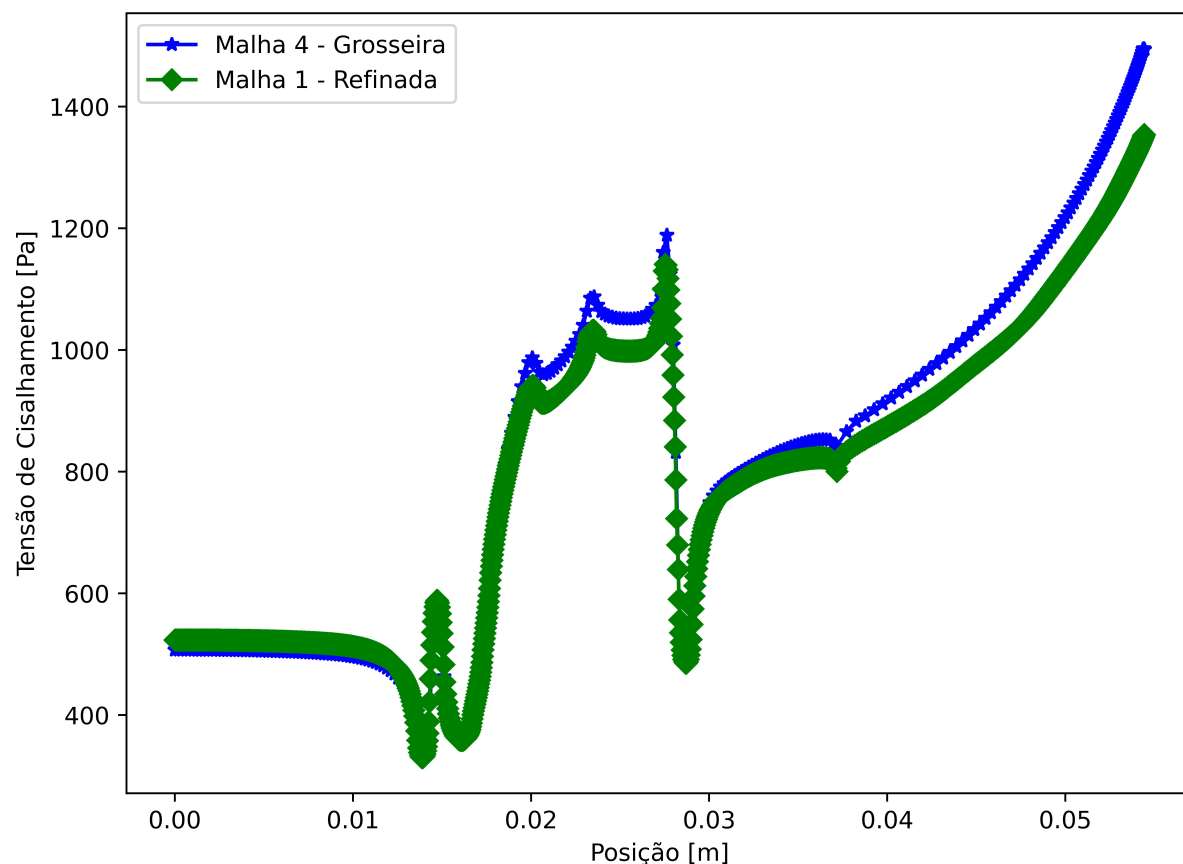
Figura 54 – Erro de validação relativo ao resultado experimental para os modelos viscosos e bocais utilizados.



Erros de simulações numéricas podem ser oriundos das hipóteses e simplificações adotadas para o modelo, da solução numérica e/ou aos parâmetros de entrada da simulação. O modelo foi, então, analisado com mais detalhes buscando possíveis singularidades ou erros que justificassem os erros de validação encontrados.

Como detalhado anteriormente, para gerar uma malha estruturada quadrilateral homogênea e obter uma solução estável, substituiu-se a o recuo entre a agulha e a seringa por uma borda de 45° e os vértices entre a seringa, a borda e a agulha arredondados. A função de interpolação upwind para o termo convectivo pode suavizar grandes gradientes que podem provocar difusão numérica. Entretanto, mesmo com esses ajustes, as regiões de arredondamento da seringa e, principalmente, de transição entre a seringa e a agulha mostraram-se críticas ao se analisar a tensão de cisalhamento em função da posição ao longo da parede do domínio, principalmente para a geometria do bocal 16G e vazão igual a 28 mg/s, como mostra a Figura 55.

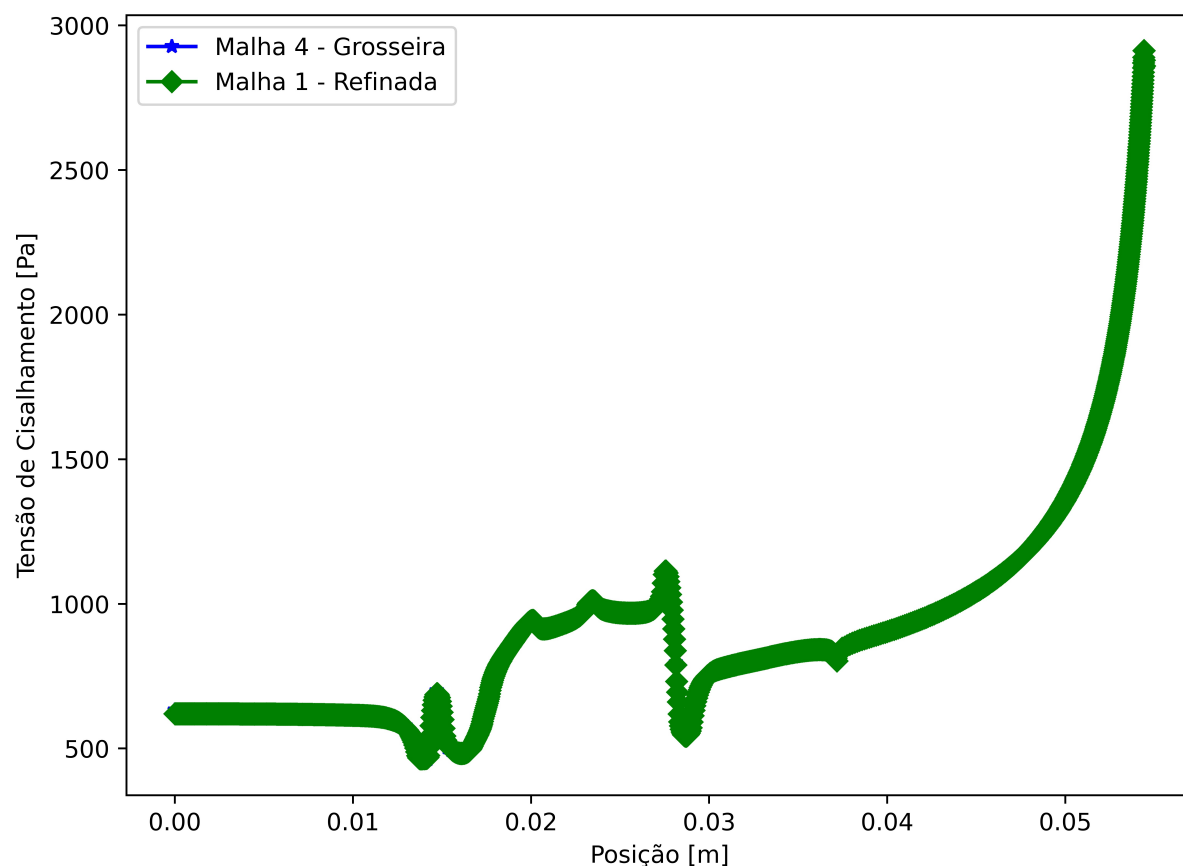
Figura 55 – Resultados numéricos para a distribuição da tensão de cisalhamento ao longo da parede da geometria com bocal 16G, considerando a malha mais refinada e mais grosseira utilizadas.



Nota-se nesse caso que o refinamento da malha ajudou a amenizar a singularidade na região de transição seringa-agulha, que se trata de uma região de variação repentina da pressão causada pelo aumento do diâmetro entre a seringa e a agulha de precisão.

Ao analisar os resultados para a geometria com bocal 25G com a mesma vazão, apresentados na Figura 56, observa-se que esse pico de tensão de cisalhamento não parece afetar a região crítica e se torna irrelevante em relação ao ponto de tensão máxima, na extremidade da agulha. Além disso, a convergência foi verificada nos testes de malha e diferentes vazões foram testadas como dado de entrada. Portanto, os resultados sugerem que o modelo constitutivo escolhido para caracterizar o comportamento do Nivea Creme não foi inadequado e, por isso, não foi possível validar experimentalmente o modelo numérico proposto.

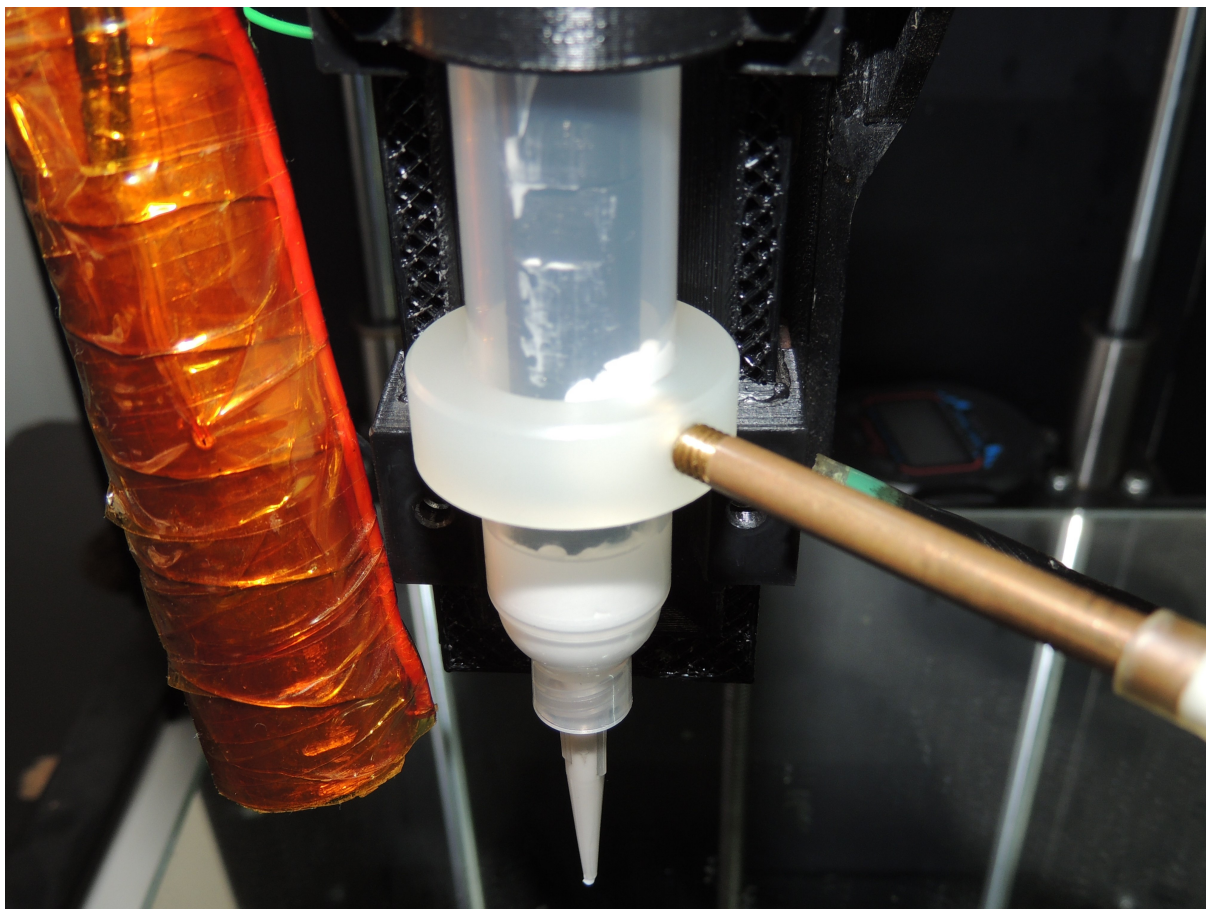
Figura 56 – Resultados numéricos para a distribuição da tensão de cisalhamento ao longo da parede da geometria com bocal 25G, considerando a malha mais refinada e mais grosseira utilizadas.



Resultados semelhantes foram relatados por Emmermacher *et al.* (2020) ao analisarem numérica e experimentalmente uma biotinta composta por alginato, metilcelulose e agarose. Os autores sugeriram que os efeitos elásticos são significativos no caso desse fluido e por isso os modelos puramente viscosos adotados não foram capazes de relacionar corretamente os parâmetros do escoamento, pressão e vazão, analisados na validação experimental.

Materiais viscoelásticos exibem simultaneamente características tanto de fluidos viscosos quanto de sólidos elásticos e, quando submetidos a tensão, exibem uma deformação viscosa, que permanece após a retirada da tensão, e uma deformação elástica, ou seja, uma recuperação parcial à sua posição inicial (Nascimento, 2007; Chhabra; Richardson, 2008). Esse comportamento foi observado durante as medições de pressão de Nivea Creme, principalmente para os testes sob vazões mais altas, como mostrado na Figura 57, quando parte do creme retornou para seringa após a passagem do êmbolo pela tomada de pressão e consequente retirada da tensão no ponto de medição.

Figura 57 – Conteúdo de Nivea Creme na tomada de pressão retornando para a seringa, após a retirada da tensão pela passagem do êmbolo.



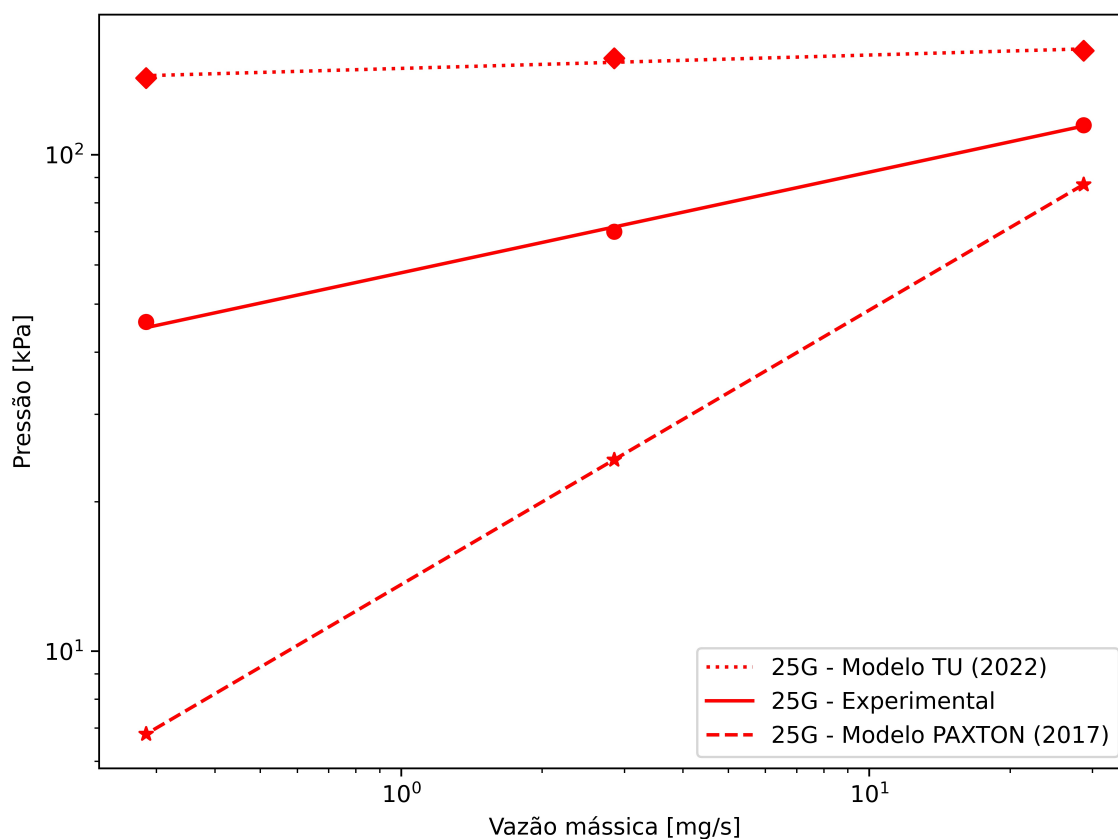
A natureza viscoelástica do Nivea Creme poderia, então, explicar a divergência entre as medições realizadas pelo manômetro e os valores previstos na simulação numérica, visto que antes de manifestar um aumento de pressão detectável pelo instrumento, o material absorve parte da energia como deformações elásticas. Além disso, fenômenos de fluência e relaxação são observados em fluidos viscoelásticos, que têm como característica essencial a variável tempo. Nesse sentido, ao analisar o escoamento do Nivea Creme para diferentes vazões, o erro de validação varia consideravelmente, indicando relação com o tempo de atuação da força feita pelo êmbolo.

O Nivea Creme pode ser considerado um material viscoelástico que exibe propriedades de pseudoplasticidade. Para melhor caracterização desse material, além dos ensaios reológicos aplicados neste trabalho, os ensaios oscilatórios são necessários para a determinação das propriedades viscoelásticas, como os ensaios de fluência, de varredura oscilatória de amplitude de tensões, para a determinação da faixa de viscoelasticidade linear, e de varredura de frequência, para medir os módulos de armazenamento e perda.

4.1.3 Comparação com a literatura

Modelos puramente viscosos já foram adotados anteriormente na literatura para descrever o comportamento reológico do Nivea Creme, conforme já discutido na subseção Modelos Constitutivos. O modelo Lei de Potência proposto por Paxton *et al.* (2017) e o modelo Herschel Bulkley encontrado por Tu *et al.* (2022) foram testados nas simulações numéricas para as condições de vazão e geometria analisadas. Como mostrado na Figura 58, as pressões obtidas para o bocal 25G divergiram ainda mais dos dados experimentais nos dois modelos. Resultados ainda mais discrepantes foram encontrados para os bocais 16G e 20G.

Figura 58 – Diferença de pressão em função da vazão mássica do escoamento de Nivea Creme considerando os modelos propostos na literatura.



Em todas as condições, o modelo proposto por Paxton *et al.* (2017) subestimou os resultados para pressão, enquanto o modelo de Tu *et al.* (2022) superestimou, assim como os modelos propostos neste trabalho. Com base em uma série de simplificações e aplicando a Lei da Potência combinada com a Lei Hagen-Poiseuille, Paxton *et al.* (2017) utilizaram um método analítico para calcular a velocidade de extrusão e as tensões de cisalhamento geradas pelo escoamento. Os autores apontaram que os testes de validação sugeriram que o modelo superestimou a velocidade de extrusão. Porém,

os dados de velocidade experimental foram baseados na velocidade de deslocamento da mesa e não no controle ou medição direta da velocidade de extrusão, que pode ser influenciada por diversos parâmetros de configuração dos *softwares* de impressão 3D.

Tu *et al.* (2022) propuseram o uso do modelo Herschel–Bulkley para descrever o comportamento do Nivea Creme em uma modelagem do filamento extrudado de forma livre, baseada em método de simulação computacional. Os autores afirmaram que o modelo de volume de fluido (VOF) que propuseram para o creme foi validado experimentalmente com erro máximo de 10% quanto à precisão da forma e do diâmetro dos perfis extrudados, porém os autores não analisaram a dinâmica do escoamento dentro dos bocais, não sendo possível comparar com as simulações numéricas realizadas neste trabalho.

A validação da simulação numérica utilizando Nivea Creme não foi possível com os modelos puramente viscosos propostos neste trabalho ou antes pela literatura. Contudo, em vistas de utilizar o modelo de simulação computacional desenvolvido para analisar o escoamento de tintas de biomateriais, a sua verificação foi realizada por meio da comparação com resultados da literatura já validados experimentalmente. Optou-se por simular o escoamento da tinta de metilcelulose dissolvida em água testada por Emmermacher *et al.* (2020), uma vez que esses autores apresentam de forma detalhada os dados e a metodologia adotada para a simulação numérica, bem como os resultados obtidos em validação experimental, permitindo a comparação como mostrado na Tabela 9 para as malhas 1 e 2.

Tabela 9 – Comparação dos resultados obtidos com o modelo numérico utilizado neste trabalho, considerando o fluido testado experimentalmente por Emmermacher *et al.* (2020).

Bocal	Pressão [kPa]	Malha 2		Malha 1	
		Pressão [kPa]	Erro	Pressão [kPa]	Erro
20G	40	35,44	12,9%	35,76	11,8%
22G	40	39,59	1,0%	39,92	0,2%
25G	40	37,75	6,0%	38,11	5,0%

Em geral, o modelo desenvolvido neste trabalho apresentou boa convergência com os dados disponibilizados por Emmermacher *et al.* (2020), com erros inferiores a 10% para as geometrias com bocais 22G e 25G. Nos testes de validação experimental e simulações numéricas, Emmermacher *et al.* (2020) utilizaram um bocal extrusor composto por uma seringa de 10 ml e diferentes agulhas cônicas da marca Globaco GmbH. O diâmetro de saída 22G (410 μm) e 25G (250 μm) dos bocais utilizados no

presente trabalho são idênticos aos empregados por esses autores, mas o bocal 20G está associado a um diâmetro de saída igual a 580 μm , enquanto eles usaram um bocal com 610 μm , o que poderia explicar o erro ligeiramente superior encontrado nesse caso.

4.1.4 Resultados para a biotinta CELLINK

Três vazões volumétricas foram escolhidas dentro da faixa de valores relatada na literatura para analisar a influência desse parâmetro nas tensões geradas durante o escoamento. Como mostrado na Tabela 10, o escoamento da tinta comercial CELLINK® Bioink simulado numericamente através de diferentes bocais com ponta cônica gerou tensões de cisalhamento menores que 400 Pa para todas as condições analisadas. Dessa confirmou-se que a CELLINK® Bioink é adequada para o procedimento com células.

Tabela 10 – Resultados numéricos da variação da pressão e da tensão de cisalhamento máxima para cada pressão e vazão testada com CELLINK® Bioink.

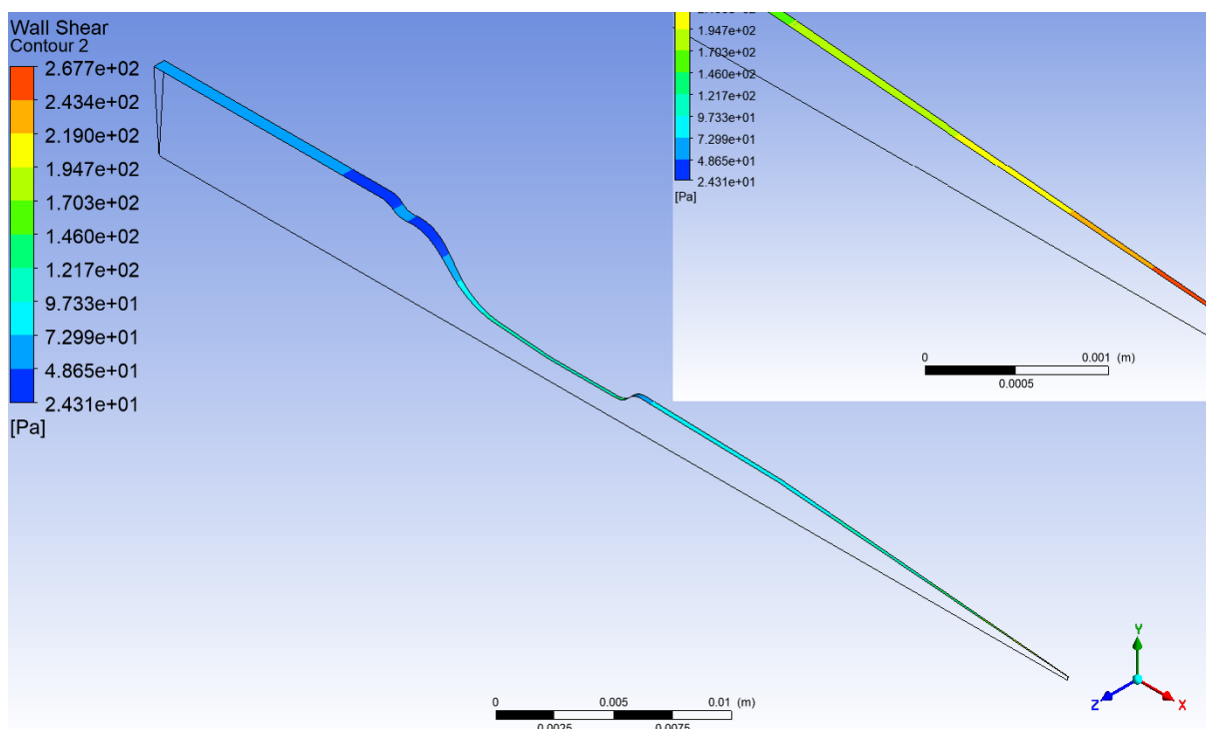
Bocal	Vazão [$\mu\text{l}/\text{min}$]	ΔP [kPa]	τ_{max} [Pa]
20G	1	4,24	114,52
	50	9,61	222,42
	100	10,87	250,15
22G	1	5,17	138,91
	50	11,31	267,85
	100	12,78	301,27
25G	1	6,43	175,14
	50	14,05	340,43
	100	15,88	382,93

A tensão de cisalhamento gerada durante o escoamento da CELLINK® Bioink apresentou um aumento constante de 20% com a diminuição o diâmetro de saída do bocal de 580 μm para 410 μm , e um aumento de 27% ao reduzir o diâmetro de 410 μm para 250 μm . A variação da pressão de extrusão seguiu a mesma relação.

O valor máximo de tensão foi encontrado apenas na extremidade da agulha para todos as condições analisadas com CELLINK® Bioink, conforme ilustra a Figura 59 para o bocal 22G e vazão 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. Esse resultado está em concordância com outros tra-

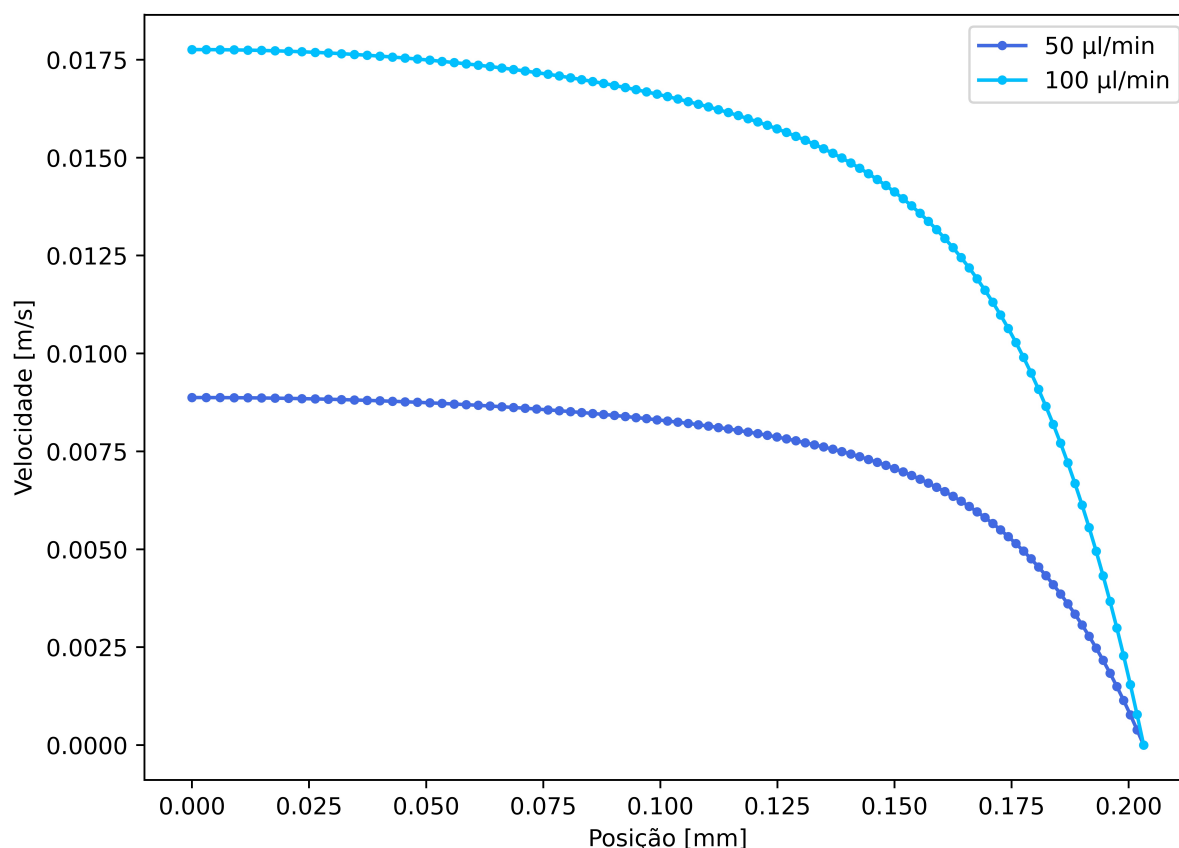
balhos de análise do escoamento de biotintas utilizando fluidodinâmica computacional (Liu *et al.*, 2017a; Emmermacher *et al.*, 2020).

Figura 59 – Distribuição da tensão de cisalhamento ao longo da parede para o modelo formado por uma seringa de 3cc e um bocal de 22G a uma vazão de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ de CELLINK® Bioink.



Observou-se que o perfil de escoamento na saída da agulha apresenta velocidade quase constante ao longo de grande parte do raio, diminuindo rapidamente somente ao se aproximar da parede, como mostrado na Figura 60 para o bocal 22G. Dessa forma, valores muito elevados de taxa de cisalhamento ocorrem em uma área pequena, muito perto da parede da agulha, e a maior parte das células contidas na biotinta não enfrentariam tensões de cisalhamento durante o processo de extrusão. Joas *et al.* (2018) e Emmermacher *et al.* (2020) relataram anteriormente que a pseudoplasticidade das formulações de biotintas tem um impacto direto no perfil da taxa de cisalhamento no bocal de impressão 3D e descreveram esse escoamento como tipo *plug*.

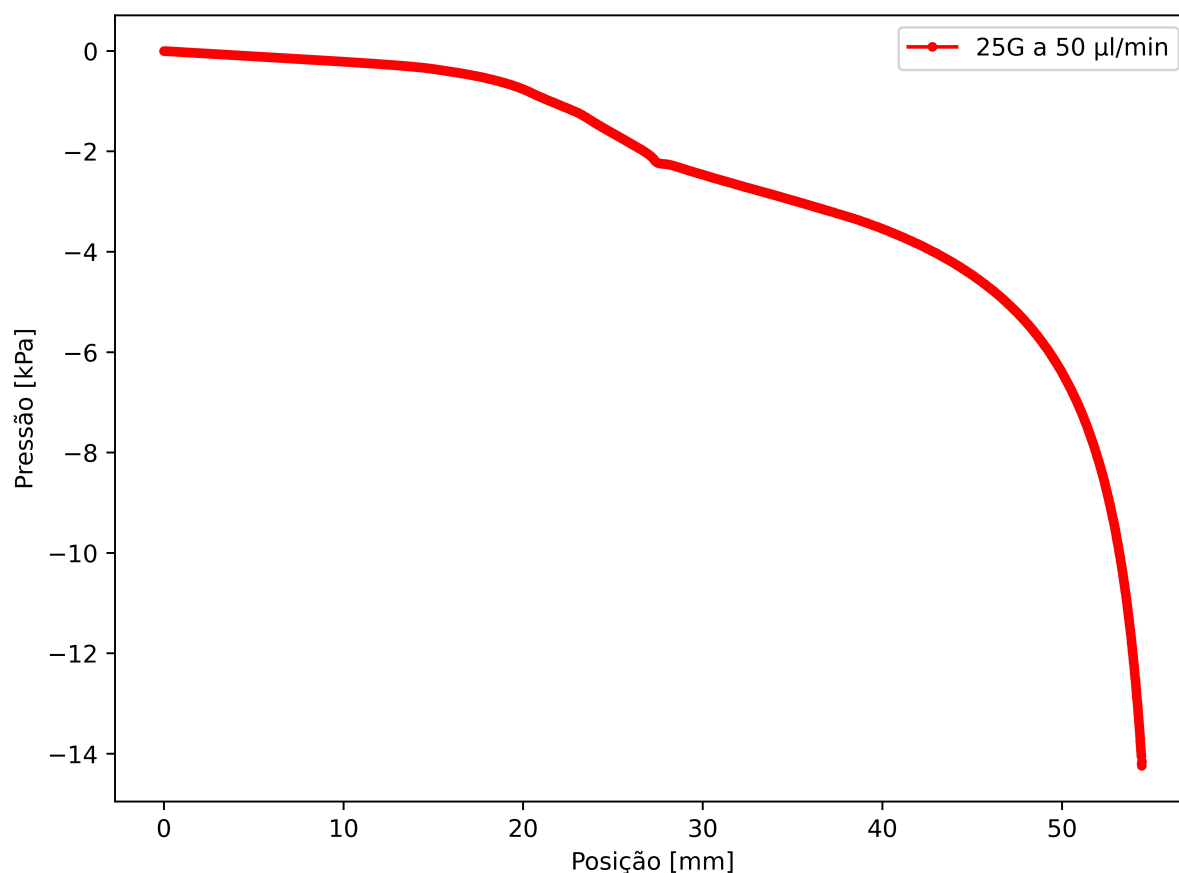
Figura 60 – Perfil de velocidade do escoamento de CELLINK® Bioink através do bocal 22G sob vazão de 50 e 100 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Os valores de tensão máxima encontrados para a CELLINK® Bioink neste trabalho divergem daqueles encontrados por Gómez-Blanco *et al.* (2020). Para simulações com a geometria do bocal 25G a temperatura de 25°C, vazão de 1,35 mm^3/s (81 $\mu\text{l}/\text{min}$) e variação de pressão de 13,3 kPa, esses autores encontraram tensão de cisalhamento máxima igual a 202 Pa, ao menos 70% menor. Para os bocais 20G e 22G, os autores relataram vazões elevadas demais para a comparação.

Neste trabalho, a solução numérica foi baseada no método dos volumes finitos e priorizou-se malhas estruturadas com elementos quadriláteros na direção do escoamento para evitar erros de difusão numérica, enquanto Gómez-Blanco *et al.* (2020) utilizaram elementos triangulares em *software* baseado no método dos elementos finitos. Além disso, as simulações numéricas desenvolvidas por esses autores envolveram apenas a agulha do bocal de impressão e não o cartucho completo, contendo a seringa. Em consonância com os resultados encontrados por Emmermacher *et al.* (2020) na região de redução do diâmetro da seringa, já há uma queda de pressão de quase 20% da pressão total, como mostra a Figura 61 para o bocal 25G e vazão de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Figura 61 – Resultados numéricos da queda de pressão ao longo do eixo para o modelo formado por seringa de 3 ml e bocal 25G a uma vazão de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$.



Nesse sentido, para uma variação de pressão de 6 kPa, Müller *et al.* (2017) encontraram tensões de cisalhamento iguais a 151,88 Pa e 150,09 Pa com os bocais cônicos 22G e 25G, respectivamente, sendo apenas 17% menor. Apesar de esses autores terem utilizado elementos triangulares em *software* baseado no método dos elementos finitos, todo o conjunto seringa-agulha foi considerado na criação do modelo, reforçando a importância de uma geometria mais realista.

4.2 Bioimpressão 3D

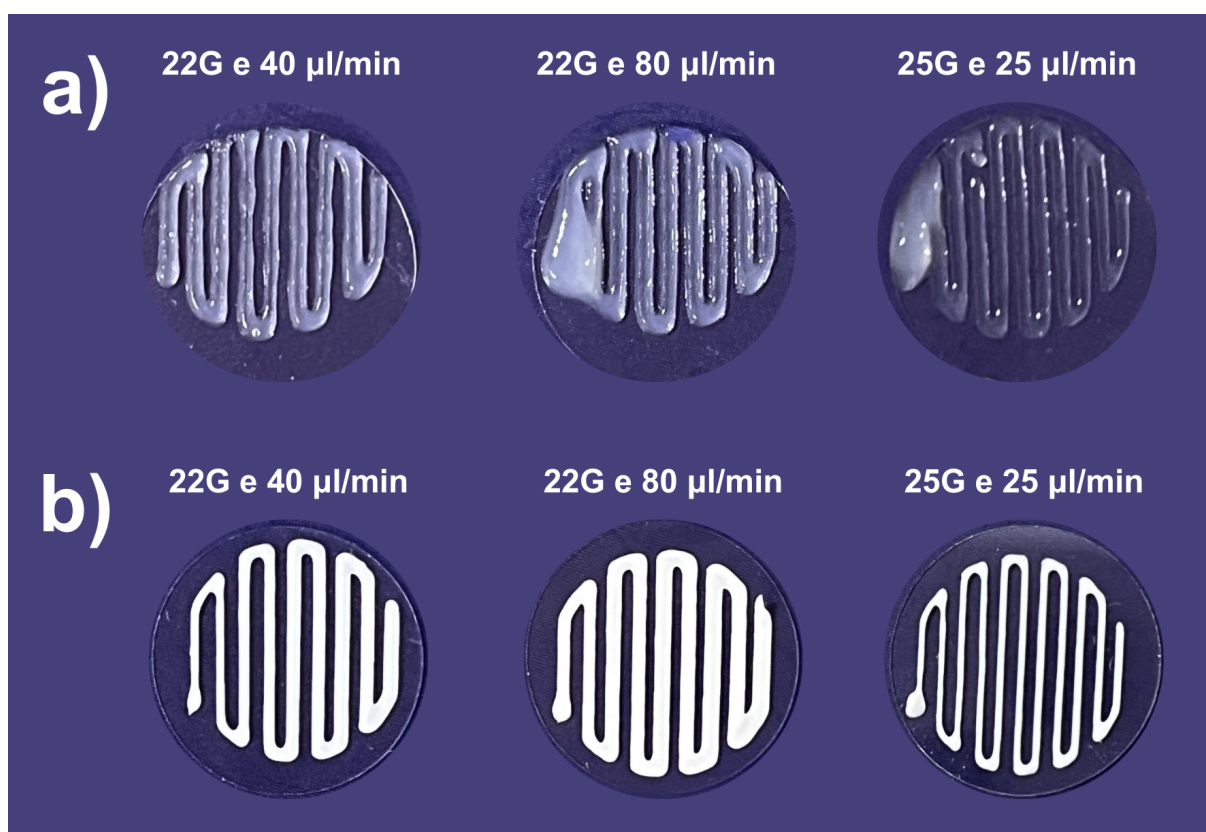
4.2.1 Printabilidade

Após os testes de extrusão com Nivea Creme, foram feitos testes de impressão analisando o movimento no plano XY e a printabilidade da CELLINK® Bioink carregada de células. O protótipo de bioimpressora desenvolvido em parceria com a empresa 3DLopes® nomeada 3D BioTower Pro, tem resolução de 0,30 mm para todos os eixos de movimentação. A printabilidade foi avaliada em relação a taxa de espalhamento

do material. Taxas de espalhamento mais baixas são desejáveis para permitir a bioimpressão de estruturas com alta precisão.

Além de comparar a printabilidade da biotinta com um material de referência, como Nivea Creme, foi analisada a influência dos parâmetros de impressão, vazão e diâmetro do bocal, como mostra a Figura 62. Para as configurações de impressão utilizando bocal 22G e velocidade de impressão de 5 mm/s, foi calculada uma vazão volumétrica de aproximadamente 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, enquanto para 15 mm/s foi encontrada vazão de cerca de 80 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para o bocal 25G com velocidade de 10 mm/s, calculou-se uma vazão de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Figura 62 – Comparação da capacidade de impressão em padrões gerados para diferentes medidores de ponta e vazões volumétricas usando a) Bioink CELLINK™ carregado com mioblastos de camundongo e b) Nivea Creme.

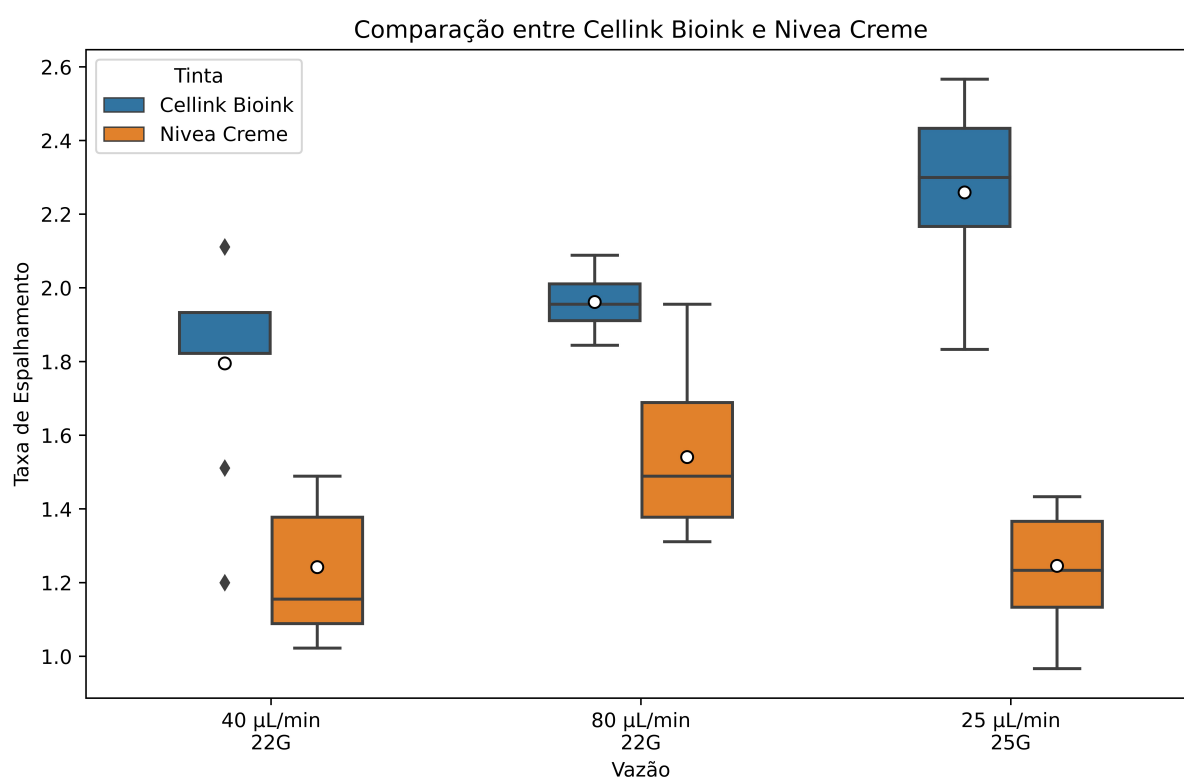


Em comparação com Nivea Creme, a biotinta CELLINK formou filamentos mais irregulares, apresentando maior dispersão das medidas, e apresentou regiões com excesso de deposição, que impossibilitaram a medição da espessura daqueles filamentos.

Excesso de material nas regiões inicial e final da camada impressa foi encontrado e atribuído ao curto intervalo de tempo que o bocal fica parado nesses pontos e o fluido não haver sido adequadamente tracionado de volta. Para lidar com esse problema, foi

configurado um movimento de retração ao final do processo, visando minimizar esse excesso produto. No entanto, ao iniciar a impressão, a retração não foi viável, por comprometer a formação inicial da estrutura, sendo necessário garantir a presença de tinta na saída da agulha antes do início do processo para evitar falhas na deposição inicial.

Figura 63 – Taxa de espalhamento pós-impressão (diâmetro do filamento/espessura de extrusão), (ANOVA, $p < 0,05$, Média \pm DP). Em azul está representada a biotinta CELLINK carregada de células, enquanto Nivea Creme está em laranja.



Conforme mostra a Figura 63, a taxa de espalhamento da CELLINK® Bioink carregada de células foi maior que de Nivea Creme para todas as condições analisadas, com diferenças significativas nas médias conforme ANOVA de duas vias. As análises post-hoc de Tukey indicam que a mudança de diâmetro de saída do bocal proporcionou diferenças significativas na taxa de espalhamento para a biotinta, enquanto o aumento da vazão para um mesmo bocal não gerou aumento significativo. Por outro lado, para o Nivea Creme o aumento da vazão de 40 para 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ provocou aumento significativo da taxa de espalhamento.

Além dos parâmetros analisados, observou-se durante os experimentos que o ajuste da distância do bocal à mesa no pré-processamento também interfere na taxa de espalhamento e deve ser sempre calibrado cuidadosamente ao trocar os bocais.

Figura 64 – Filamentos formados por uma camada impressa de CELLINK® Bioink carregada de células não mantêm forma estável em meio de cultura.

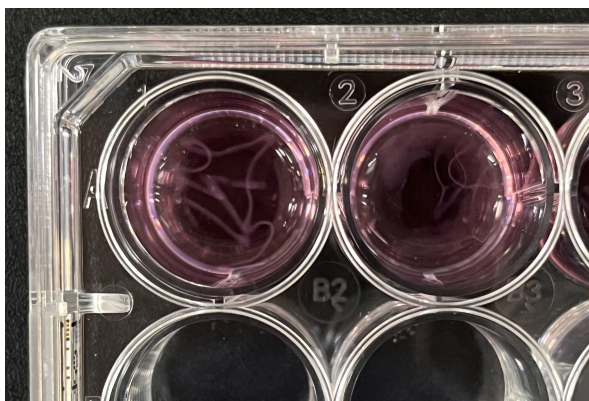
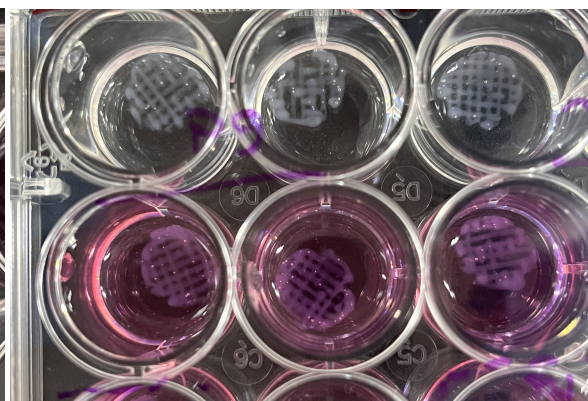


Figura 65 – Filamentos formados por duas camadas impressas de CELLINK® Bioink carregada de células mantêm forma estável em meio de cultura.



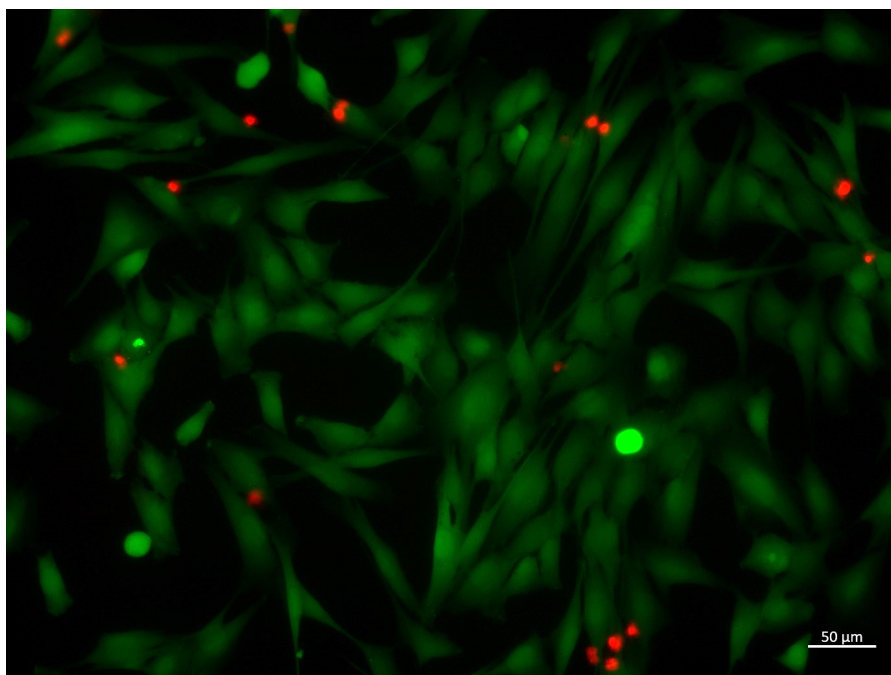
Buscando analisar a manutenção da printabilidade da biotinta, as lamínulas com a camada bioimpressa foram submersas em meio de cultura. Entretanto, os filamentos se desmancharam dentro da solução, impossibilitando a análise da taxa de espalhamento ou viabilidade celular, como mostra a Figura 64. Para que a estrutura mantenha uma rigidez mínima é necessário ao menos duas camadas e a atuação de agente reticulante, como mostra a Figura 65.

4.2.2 Viabilidade celular

A capacidade de imprimir células vivas preservando a viabilidade e estrutura celular é uma característica crucial na avaliação de qualquer plataforma ou sistema de bioimpressão 3D. Nesse sentido, para demonstrar a funcionalidade e validar o protótipo desenvolvido em parceria com a empresa 3DLopes® a bioimpressão de construções de CELLINK® Bioink carregada de células musculares de camundongos da linhagem C2C12 foi avaliada em ensaios de viabilidade após o procedimento.

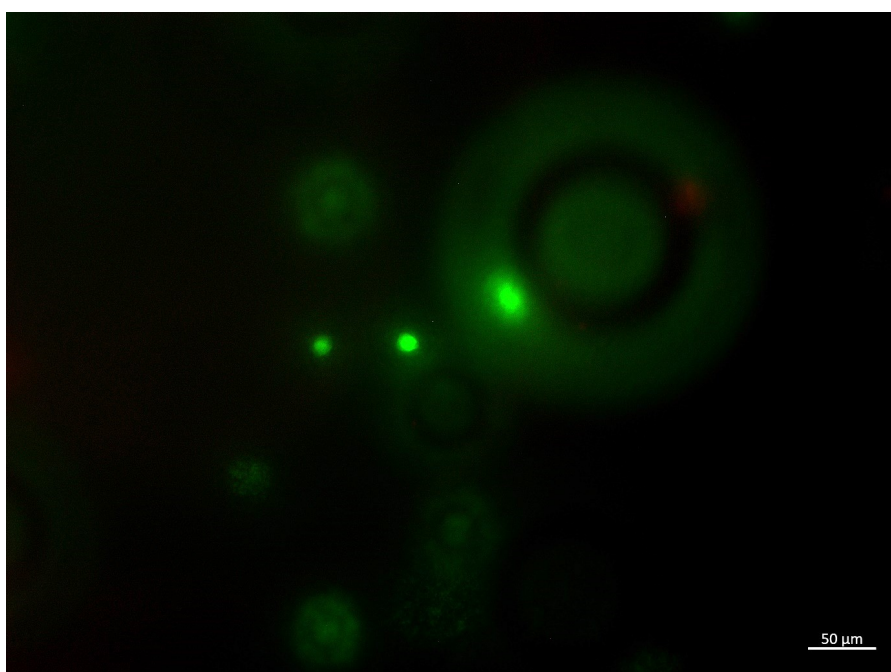
No grupo controle 2D, onde as células foram cultivadas em placas de vidro, as células C2C12 utilizadas no presente trabalho apresentaram as propriedades de adesão características, alongadas e com morfologia fusiforme que permite a fusão de células, como mostra a Figura 66. Observou-se a presença de algumas células mortas, marcadas em vermelho, mas a quantidade de células vivas, em verde, foi bastante superior e a cultura estava adequada para o processo de bioimpressão 3D.

Figura 66 – Viabilidade de células C2C12 no grupo controle 2D, onde as células foram cultivadas em placas de vidro e apresentam propriedades aderentes e morfologia fusiforme.



No grupo controle 3D não-impresso, mas com as células já misturadas à CELLINK® Bioink, observou-se uma diminuição da densidade celular devido à diluição da cultura inicial em 3 mL de biotinta. Conforme indicado em verde na Figura 67, verificou-se que a maioria das células se mantiveram vivas. Portanto, o processo de encapsulamento não comprometeu a viabilidade celular.

Figura 67 – Viabilidade de células C2C12 no grupo controle 3D, onde as células já estavam encapsuladas e diluídas na biotinta.



Pelo modelo de simulação numérica, os parâmetros de impressão adotados geraram baixas tensões de cisalhamento e não causaram danos significativos as células. E, conforme indicado em verde nas Figuras 68 e 69, observou-se através da fluorescência que a maioria das células nas construções 3D estavam vivas imediatamente após a bioimpressão. Sendo assim, é notável que a bioimpressora não comprometeu a viabilidade do processo em nenhuma etapa.

Figura 68 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso 2h após bioimpressão.

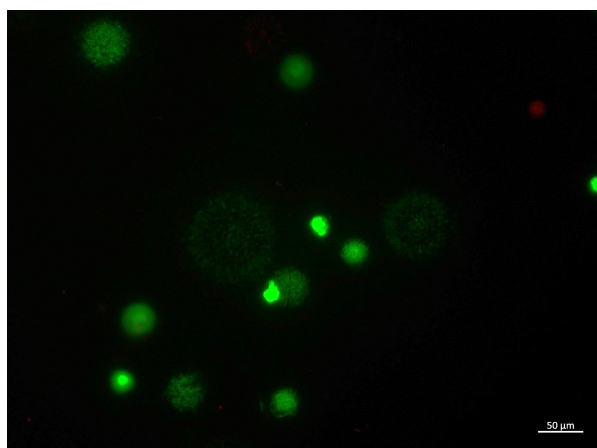
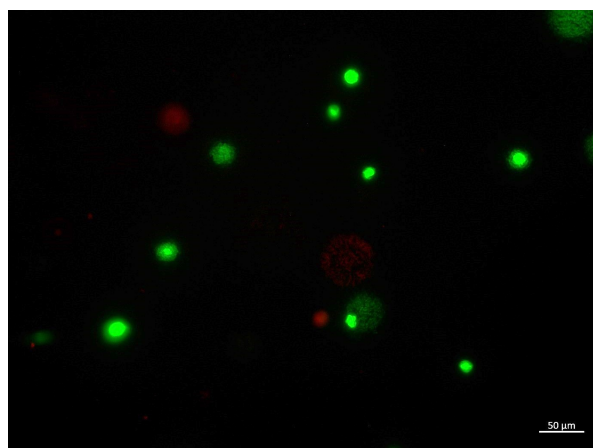


Figura 69 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso 2h após bioimpressão.



Apesar da manutenção da viabilidade, observou-se que os processos de encapsulamento das células na biotinta e extrusão afetaram a morfologia celular. Ao analisar as imagens de fluorescência das estruturas encapsuladas e bioimpressas 3 dias após a impressão, como mostram as Figuras 70 e 71 respectivamente, a maioria das células C2C12 ainda não havia se espalhado e manteve formato esférico, indicando que não aderiu ao meio proporcionado pela biotinta.

Figura 70 – Viabilidade de células C2C12 no grupo encapsulado, 3 dias após bioimpressão.

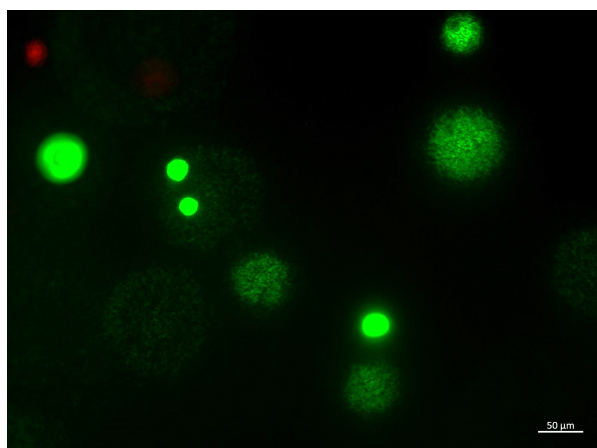
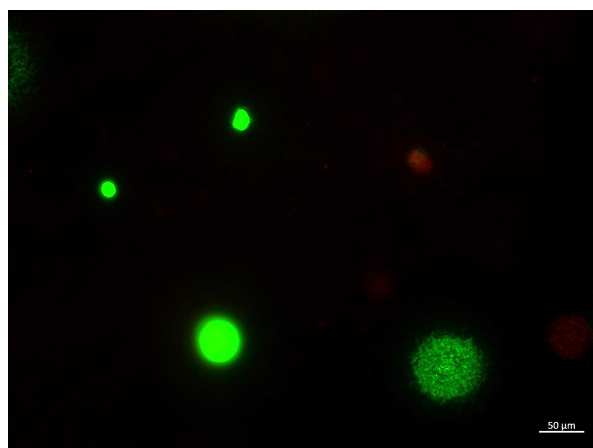


Figura 71 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso, 3 dias após bioimpressão.



No entanto, 6 dias após o processo de bioimpressão, ainda que a maioria ainda estivesse em formato esférico, algumas células na estrutura impressa começaram a ancorar e se espalhar, apresentando morfologia prolongada e fusiforme similar à cultura 2D, como mostra a Figura 72. Destaca-se na Figura 73 que esse comportamento foi encontrado nitidamente dentro da biotinta impressa, cuja estrutura se manteve estável.

Figura 72 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso 6 dias após bioimpressão.

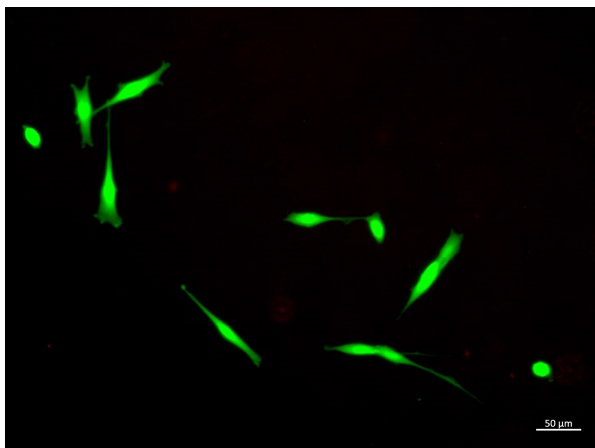


Figura 73 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso 6 dias após bioimpressão.



No dia 14, além de serem observadas mais células C2C12 com morfologia fusiforme, elas começaram a formar aglomerados e houve um considerável aumento da densidade celular, como mostram as Figuras 74 e 75, indicando proliferação celular.

Figura 74 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso, 14 dias após bioimpressão.

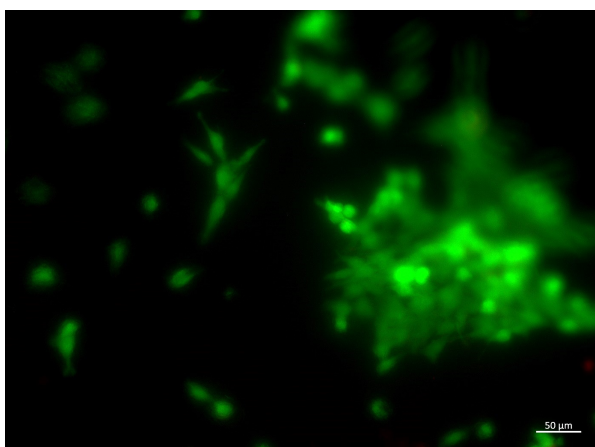
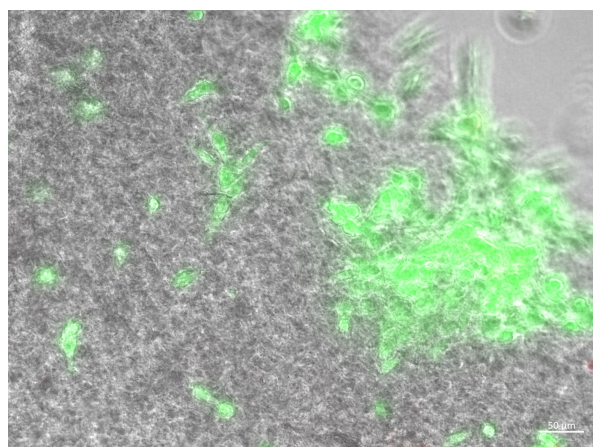


Figura 75 – Viabilidade de células C2C12 no grupo impresso, 14 dias após bioimpressão.



Em algumas regiões da estrutura impressa, foi possível observar a formação de imensos aglomerados celulares, como mostram as Figuras 76 e 77, sugerindo expressivo aumento das conexões célula-célula em 3D após 14 dias da bioimpressão.

Figura 76 – Aglomeração celular formada no dia 14 após a bioimpressão.

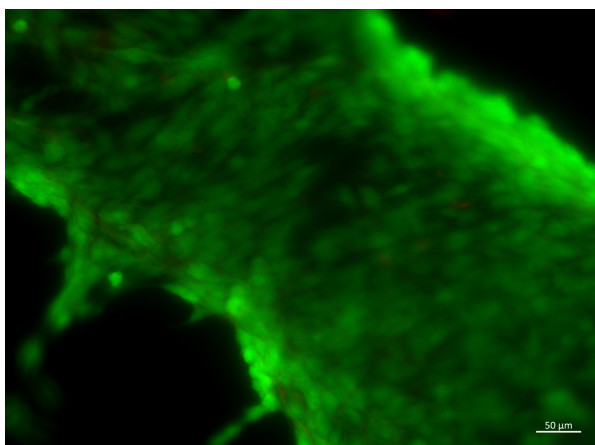
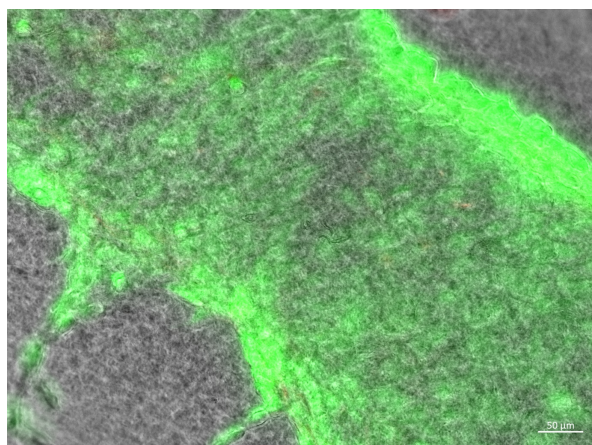


Figura 77 – Aglomeração celular formada no dia 14 após a bioimpressão.



Analisando a morfologia celular 14 dias após o processo de bioimpressão, foi confirmada proliferação celular significativa, e figuras de mitose foram evidentes em vários campos, como mostrado nas Figuras 78 e 79. Além disso, os mioblastos C2C12 exibiram uma morfologia alinhada em uma direção uniforme nas amostras bioimpressas. Este resultado é consistente com o comportamento das células musculares esqueléticas, uma vez que o alinhamento é essencial para o processo de miogênese.

Figura 78 – Células de morfologia C2C12 14 após bioimpressão exibiram alinhamento e mitose. As setas brancas indicam figuras de mitose.

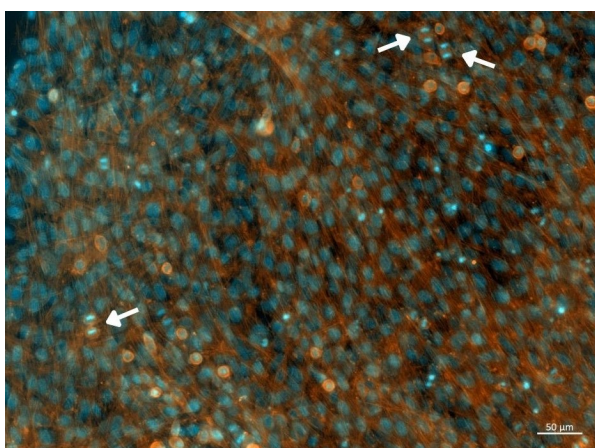
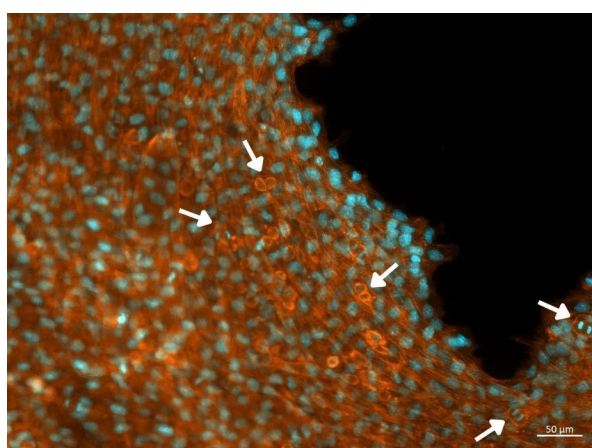


Figura 79 – Células de morfologia C2C12 14 após bioimpressão exibiram alinhamento e mitose. As setas brancas indicam figuras de mitose.



Portanto, em concordância com as descobertas de Boularaoui *et al.* (2020), que também avaliaram o efeito da bioimpressão na viabilidade de células musculares da linhagem C2C12 encapsuladas em CELLINK® Bioink, constatou-se que essa formulação suporta a adesão e disseminação de células C2C12 a longo prazo. Além disso, a bioimpressora 3D desenvolvida em parceria com a empresa 3DLopes® mostrou-se adequada para o uso em pesquisas na área de biofabricação.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, uma impressora 3D de filamento fundido foi adaptada e transformada em uma bioimpressora 3D com sucesso. As peças da unidade extrusora e do suporte da seringa no eixo móvel foram todas produzidas a partir da própria impressora 3D convencional. Por meio dessa abordagem, essa tecnologia se torna mais acessível aos grupos de pesquisa, uma vez que o custo de customização é significativamente menor que de uma bioimpressora 3D disponível comercialmente.

Os testes experimentais confirmaram a viabilidade do processo utilizando a bioimpressora desenvolvida e forneceram importantes informações quanto a morfologia e proliferação de células musculares C2C12 em biotintas compostas por nanocelulose e alginato. Após o encapsulamento, as células ficaram como em suspensão, em formato esférico, mas a partir do 6º dia após o processo de bioimpressão algumas células começaram a apresentar prolongamentos e morfologia fusiforme, consistente com o comportamento das células musculares esqueléticas. No 14º dia, grandes aglomerados celulares foram encontrados nas estruturas bioimpressas com CELLINK® Bioink e, ao analisar a morfologia das células C2C12 pela marcação com actina, confirmou-se uma proliferação significativa.

As simulações numéricas computacionais do escoamento da biotinta desempenharam um importante papel na etapa de pré-processamento, confirmando que a biotinta CELLINK® é adequada para o procedimento com células utilizando uma ampla faixa de vazões e agulhas com diferentes diâmetros de saída. A validação experimental das simulações numéricas utilizando Nivea Creme não foi possível com os modelos puramente viscosos propostos neste trabalho ou encontrados na literatura. Características de materiais viscoelásticos foram observadas para esse creme e podem explicar os erros numéricos encontrados no teste de validação. Portanto, para além dos ensaios reológicos aplicados neste trabalho, ensaios oscilatórios seriam necessários para melhor caracterização do Nivea Creme. Além disso, as simulações computacionais devem ser conduzidas em softwares mais adequados para análise do escoamento de materiais com comportamento tão complexo, como o software Ansys Polyflow, que possui modelos para materiais viscoelásticos implementados.

REFERÊNCIAS

- ABTO, Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2010-2017)**. 2017. RBT: Registro Brasileiro de Transplantes. Ano XXIII N° 4, 2017. Disponível em <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2017/rbt-imprensa-leitura-compressed.pdf>>. Acesso em 19 de junho de 2023.
- ABTO, Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2014-2021)**. 2021. RBT: Registro Brasileiro de Transplantes. Ano XXVIII N° 4, 2021. Disponível em <https://site.abto.org.br/wp-content/uploads/2022/03/leitura_compressed-1.pdf>. Acesso em 29 de julho de 2023.
- AHADIAN, Samad; KHADEMHOSEINI, Ali. A perspective on 3d bioprinting in tissue regeneration. **Bio-Design and Manufacturing**, Springer, v. 1, p. 157–160, 9 2018. ISSN 25228552.
- ANGELOPOULOS, Ioannis *et al.* Engineering inkjet bioprinting processes toward translational therapies. **Biotechnology and Bioengineering**, John Wiley and Sons Inc., v. 117, p. 272–284, 1 2020. ISSN 10970290.
- ANSYS, Inc. **Ansys Fluent User's Guide**. 2022. Disponível em: <<http://www.ansys.com>>.
- ASME. **Standard for Verification and Validation in Computational Fluid Dynamics and Heat Transfer**. Nova Iorque: American Society of Mechanical Engineering (ASME), 2009.
- AVILA, Héctor Martínez *et al.* 3d bioprinting of human chondrocyte-laden nanocellulose hydrogels for patient-specific auricular cartilage regeneration. **Bioprinting**, Elsevier B.V., v. 1-2, p. 22–35, 6 2016. ISSN 24058866.
- BAHRD, Anton. **Computational Fluid Dynamics and Quantitative Cell Viability Measurements in Dispensing-Based Biofabrication**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Física), Umea University, Umea, 2017.
- BEN-ARYE, Tom; LEVENBERG, Shulamit. Tissue engineering for clean meat production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, Frontiers Media S.A., v. 3, 6 2019. ISSN 2571581X.
- BLAESER, Andreas *et al.* Controlling shear stress in 3d bioprinting is a key factor to balance printing resolution and stem cell integrity. **Advanced Healthcare Materials**, Wiley-VCH Verlag, v. 5, p. 326–333, 2 2016. ISSN 21922659.
- BOULARAOUI, Selwa *et al.* An overview of extrusion-based bioprinting with a focus on induced shear stress and its effect on cell viability. **Bioprinting**, Elsevier B.V., v. 20, 12 2020. ISSN 24058866.
- BOULARAOUI, Selwa *et al.* Harnessing shear stress preconditioning to improve cell viability in 3d post-printed biostructures using extrusion bioprinting. **Bioprinting**, Elsevier B.V., v. 25, 3 2022. ISSN 24058866.

BOULARAOUI, Selwa *et al.* Nanocomposite conductive bioinks based on low-concentration gelma and mxene nanosheets/gold nanoparticles providing enhanced printability of functional skeletal muscle tissues. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, American Chemical Society, v. 7, p. 5810–5822, 12 2021. ISSN 23739878.

BOVE, Mary *et al.* Tissue engineering in musculoskeletal tissue: A review of the literature. **Surgeries (Switzerland)**, MDPI, v. 2, p. 58–82, 3 2021. ISSN 26734095.

CELLINK. **BIOPRINTING PROTOCOL CELLINK Bioink**. 2023. Disponível em: <https://www.cellink.com/wp-content/uploads/2023/02/Bioprinting-Protocol-CELLINK-Bioink_2-Jan-2023-2.pdf>.

CELLINK. **CELLINK Bioink**. 2023. Acessado em 11 de outubro de 2022. Disponível em: <<https://www.cellink.com/product/cellink-bioink/>>.

CELLINK. **Mixing cells and bioink Protocol**. 2023. Disponível em: <https://www.cellink.com/wp-content/uploads/2023/02/Mixing-cells-and-bioink-Protocol_5-Jan-2023-1.pdf>.

CHANDRA, Prafulla K.; SOKER, Shay; ATALA, Anthony. Tissue engineering: current status and future perspectives. In: **Principles of Tissue Engineering**. 5. ed. [S.l.]: Elsevier, 2020. p. 1–35.

CHANG, Robert; NAM, Jae; SUN, Wei. Direct cell writing of 3d microorgan for in vitro pharmacokinetic model. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, Mary Ann Liebert Inc., v. 14, p. 157–166, 2008. ISSN 19373392.

CHANG, Robert; NAM, Jae; SUN, Wei. Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. **Tissue Engineering - Part A**, Mary Ann Liebert Inc., v. 14, p. 41–48, 1 2008. ISSN 1937335X.

CHENG, Jie *et al.* Rheological properties of cell-hydrogel composites extruding through small-diameter tips. **Journal of Manufacturing Science and Engineering**, American Society of Mechanical Engineers(ASME), v. 130, p. 0210141–0210145, 2008. ISSN 10871357.

CHHABRA, R.P.; RICHARDSON, J.F. **Non-Newtonian Flow and Applied Rheology**. [S.l.]: Elsevier, 2008. ISBN 9780750685320.

COLOSI, Cristina *et al.* Microfluidic bioprinting of heterogeneous 3d tissue constructs using low-viscosity bioink. **Advanced Materials**, Wiley-VCH Verlag, v. 28, p. 677–684a, 1 2016. ISSN 15214095.

COOPER, Gregory M *et al.* Inkjet-based biopatterning of bone morphogenetic protein-2 to spatially control calvarial bone formation. **TISSUE ENGINEERING: Part A**, v. 16, n. 5, 2010.

CUI, Xiaofeng *et al.* Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. **Tissue Engineering - Part A**, Mary Ann Liebert Inc., v. 18, p. 1304–1312, 6 2012. ISSN 1937335X.

DALY, Andrew C. *et al.* A comparison of different bioinks for 3d bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 8, 10 2016. ISSN 17585090.

DHARMADASA, Varuna. **Investigation of cell-viability in the bioprinting process.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Mecânica), KTH Royal Institute of Technology, Estocolmo, 2016.

DISTLER, Thomas *et al.* Supplementary - 3d printed oxidized alginate-gelatin bioink provides guidance for c2c12 muscle precursor cell orientation and differentiation via shear stress during bioprinting. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 12, 10 2020. ISSN 17585090.

EMMERMACHER, Julia *et al.* Engineering considerations on extrusion-based bioprinting: interactions of material behavior, mechanical forces and cells in the printing needle. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 12, 2020. ISSN 17585090.

FROST, Brodya *et al.* Gradient poly(ethylene glycol) diacrylate and cellulose nanocrystals tissue engineering composite scaffolds via extrusion bioprinting. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Frontiers Media S.A., v. 7, 2019. ISSN 22964185.

GAO, Guifang; CUI, Xiaofeng. Three-dimensional bioprinting in tissue engineering and regenerative medicine. **Biotechnology Letters**, Springer Netherlands, v. 38, p. 203–211, 2 2016. ISSN 15736776.

GJERDE, Cecilie *et al.* Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. **Stem Cell Research and Therapy**, BioMed Central Ltd., v. 9, 8 2018. ISSN 17576512.

GÖHL, Johan *et al.* Simulations of 3d bioprinting: Predicting bioprintability of nanofibrillar inks. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 10, 6 2018. ISSN 17585090.

GÓMEZ-BLANCO, J. Carlos *et al.* Bioink temperature influence on shear stress, pressure and velocity using computational simulation. **Processes**, MDPI AG, v. 8, 7 2020. ISSN 22279717.

GONÇALVES, Marianna Vieira Sobral Juan Carlos Ramos. **Cultivo de Células: Da Teoria à Bancada.** João Pessoa: Editora UFPB, 2020. ISBN 978-65-5942-027-8.

GROLL, Jürgen *et al.* Biofabrication: Reappraising the definition of an evolving field. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 8, 1 2016. ISSN 17585090.

GROLL, J. *et al.* A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 11, 1 2019. ISSN 17585090.

GUILLOTIN, Bertrand *et al.* Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. **Biomaterials**, v. 31, p. 7250–7256, 10 2010. ISSN 01429612.

HEWES, Sarah; WONG, Andrew D.; SEARSON, Peter C. Bioprinting microvessels using an inkjet printer. **Bioprinting**, Elsevier B.V., v. 7, p. 14–18, 9 2017. ISSN 24058866.

HÖLZL, Katja *et al.* Bioink properties before, during and after 3d bioprinting. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 8, 9 2016. ISSN 17585090.

HUANG, Ying *et al.* 3d bioprinting and the current applications in tissue engineering. **Biotechnology Journal**, Wiley-VCH Verlag, v. 12, 8 2017. ISSN 18607314.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia. **Avaliação de dados de medição: Guia para a expressão de incerteza de medição – GUM 2008**. [S.l.]: ABNT: INMETRO, 2012. ISBN 850700251X.

IOANNIDIS, Konstantinos *et al.* A custom ultra-low-cost 3d bioprinter supports cell growth and differentiation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Frontiers Media S.A., v. 8, 11 2020. ISSN 22964185.

JIA, Weitao *et al.* Direct 3d bioprinting of perfusable vascular constructs using a blend bioink. **Biomaterials**, Elsevier Ltd, v. 106, p. 58–68, 11 2016. ISSN 18785905.

JOAS, Sebastian *et al.* Extrusion-based 3d printing of poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels containing positively and negatively charged groups. **Gels**, MDPI AG, v. 4, 9 2018. ISSN 23102861.

JONGPRASITKUL, Hatai *et al.* Two-step crosslinking to enhance the printability of methacrylated gellan gum biomaterial ink for extrusion-based 3d bioprinting. **Bioprinting**, Elsevier B.V., v. 25, 3 2022. ISSN 24058866.

KANG, Hyun Wook *et al.* A 3d bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. **Nature Biotechnology**, Nature Publishing Group, v. 34, p. 312–319, 3 2016. ISSN 15461696.

KERIQUEL, Virginie *et al.* In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 7, 12 2017. ISSN 20452322.

KHADEMHOSEINI, Ali; LANGER, Robert. A decade of progress in tissue engineering. **Nature Protocols**, Nature Publishing Group, v. 11, p. 1775–1781, 10 2016. ISSN 17502799.

LEE, Jung Seob *et al.* 3d printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 6, 2014. ISSN 17585090.

LI, Minggan *et al.* Modeling mechanical cell damage in the bioprinting process employing a conical needle. **Journal of Mechanics in Medicine and Biology**, World Scientific, v. 15, 10 2015. ISSN 02195194.

LI, Minggan *et al.* Effect of needle geometry on flow rate and cell damage in the dispensing-based biofabrication process. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 1777–1784, 11 2011. ISSN 87567938.

LI, Minggan *et al.* Modeling process-induced cell damage in the biodispensing process. **TISSUE ENGINEERING: Part C**, v. 16, 2010.

LIU, Wanjun *et al.* Extrusion bioprinting of shear-thinning gelatin methacryloyl bioinks. **Advanced Healthcare Materials**, Wiley-VCH Verlag, v. 6, 6 2017. ISSN 21922659.

LIU, Wanjun *et al.* Rapid continuous multimaterial extrusion bioprinting. **Advanced Materials**, Wiley-VCH Verlag, v. 29, 1 2017. ISSN 15214095.

MATAI, Ishita *et al.* Progress in 3d bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. **Biomaterials**, Elsevier Ltd, v. 226, 1 2020. ISSN 18785905.

MCCLELLAND, Randall *et al.* Tissue engineering. In: **Introduction to Biomedical Engineering**. 2. ed. [S.I.]: Elsevier, 2005. p. 313–402.

MENASCHÉ, Philippe *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: First clinical case report. **European Heart Journal**, Oxford University Press, v. 36, p. 2011–2017, 8 2015. ISSN 15229645.

Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde garante 90% dos transplantes de órgãos pelo SUS**. 2022. Acesso em: 29 de junho de 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/dezembro/ministerio-da-saude-garante-90-dos-transplantes-de-orgaos-pelo-sus>.

Ministério da Saúde. **Sistema Nacional de Transplantes**. 2023. Acesso em: 29 de outubro de 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/saes/snt>.

MIRONOV, V. *et al.* Biofabrication: A 21st century manufacturing paradigm. **Biofabrication**, v. 1, 2009. ISSN 17585082.

MOORE, Caitlyn A. *et al.* 3d bioprinting and stem cells. In: **Methods in Molecular Biology**. [S.I.]: Humana Press Inc., 2018. v. 1842, cap. 7, p. 93–103.

MÜLLER, Michael *et al.* Alginate sulfate–nanocellulose bioinks for cartilage bioprinting applications. **Annals of Biomedical Engineering**, Springer New York LLC, v. 45, p. 210–223, 1 2017. ISSN 15739686.

MURPHY, Sean Vincent; ATALA, Anthony. Organ engineering - combining stem cells, biomaterials, and bioreactors to produce bioengineered organs for transplantation. **BioEssays**, v. 35, p. 163–172, 3 2013. ISSN 02659247.

MURPHY, Sean V.; ATALA, Anthony. 3d bioprinting of tissues and organs. **Nature Biotechnology**, Nature Publishing Group, v. 32, p. 773–785, 2014. ISSN 15461696.

NAIR, Kalyani *et al.* Characterization of cell viability during bioprinting processes. **Biotechnology Journal**, v. 4, p. 1168–1177, 2009. ISSN 18606768.

NASCIMENTO, Christine Rabello. Ensaio em reômetro rotacional tipo cilindros coaxiais. In: **Tratamento de Minérios: Práticas Laboratoriais**. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2007. p. 425–447.

NGO, Tran B. *et al.* Three-dimensional bioprinted hyaluronic acid hydrogel test beds for assessing neural cell responses to competitive growth stimuli. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, American Chemical Society, v. 6, p. 6819–6830, 12 2020. ISSN 23739878.

NGUYEN, Q D; BOGER, D V. Measuring the flow properties of yield stress fluids. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 24, p. 47–88, 1 1992. ISSN 0066-4189.

PATI, Falguni *et al.* Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. **Nature Communications**, Nature Publishing Group, v. 5, 6 2014. ISSN 20411723.

PAXTON, Naomi *et al.* Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 9, 11 2017. ISSN 17585090.

POLEY, Isabela Magalhães. **DESENVOLVIMENTO DE PRECURSORES DE BIOTINTAS PARA A BIOFABRICAÇÃO POR EXTRUSÃO DE TECIDOS CARTILAGINOSOS**. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

RYAN, N.W.; JOHNSON, M.M. Transition from laminar to turbulent flow in pipes. **AIChE Journal**, p. 433–435, 1959.

SAKAGUCHI, Katsuhisa *et al.* Bioengineering of a scaffold-less three-dimensional tissue using net mould. **Biofabrication**, IOP Publishing Ltd, v. 13, 10 2021. ISSN 17585090.

SARKER, Md; CHEN, X. B. Modeling the flow behavior and flow rate of medium viscosity alginate for scaffold fabrication with a three-dimensional bioplotter. **Journal of Manufacturing Science and Engineering, Transactions of the ASME**, American Society of Mechanical Engineers (ASME), v. 139, 8 2017. ISSN 15288935.

SCHULZ, Ulrich; SIERRA, Philippe; NIJMAN, Jint. Innovations in rheometer controlled-rate control loop design: Ultra low angular speed control and new applications. In: CO, A.; LEAL, L. G.; GIACOMM, R. H. Colby A. J. (Ed.). [S.l.]: American Institute of Physics, 2008. ISBN 9780735405493.

SEOL, Young Joon *et al.* Bioprinting technology and its applications. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, European Association for Cardio-Thoracic Surgery, v. 46, p. 342–348, 2014. ISSN 1873734X.

SILVA, Theyllon Gomes da; FILHO, Antonio Castelo. Desenvolvimento da técnica vof para o sistema hig-flow. **Proceeding Series of the Brazilian Society of Computational and Applied Mathematics**, v. 6, 2018. Disponível em: <<http://hmf.enseeiht.fr/travaux/CD0809/bei/beiep/9/html/vof/vof.html>>.

SILVEIRA, Rodrigo Santos. **PROJETO CONCEITUAL DE UM SISTEMA EXTRUSOR PARA UMA BIOIMPRESSORA 3D**. Trabalho de Conclusão de Curso — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2019.

SUNTORNOND, Ratima *et al.* A mathematical model on the resolution of extrusion bioprinting for the development of new bioinks. **Materials**, v. 9, p. 756, 9 2016. ISSN 1996-1944.

TARASSOLI, Sam P. *et al.* Candidate bioinks for extrusion 3d bioprinting—a systematic review of the literature. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Frontiers Media S.A., v. 9, 10 2021. ISSN 22964185.

TASHMAN, Joshua W.; SHIWARSKI, Daniel J.; FEINBERG, Adam W. Development of a high-performance open-source 3d bioprinter. **Scientific Reports**, v. 12, p. 22652, 12 2022. ISSN 2045-2322.

TRUCCO, Diego *et al.* Modeling and fabrication of silk fibroin-gelatin-based constructs using extrusion-based three-dimensional bioprinting. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, American Chemical Society, v. 7, p. 3306–3320, 7 2021. ISSN 23739878.

TU, Yongqiang *et al.* Modeling and evaluation of freeform extruded filament based on numerical simulation method for direct ink writing. **International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, v. 120, p. 3821–3829, 5 2022. ISSN 14333015.

WANG, Zongjie *et al.* A simple and high-resolution stereolithography-based 3d bioprinting system using visible light crosslinkable bioinks. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 7, 12 2015. ISSN 17585090.

WANG, Zongjie *et al.* A novel, well-resolved direct laser bioprinting system for rapid cell encapsulation and microwell fabrication. **Advanced Healthcare Materials**, Wiley-VCH Verlag, v. 7, 5 2018. ISSN 21922659.

WANG, Zhen *et al.* Tissue-specific engineering: 3d bioprinting in regenerative medicine. **Journal of Controlled Release**, Elsevier B.V., v. 329, p. 237–256, 1 2021. ISSN 18734995.

WHITE, Frank M. **Mecânica dos Fluidos**. 6. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2011. ISBN 9788580550092.

WILLIAMS, David *et al.* A perspective on the physical, mechanical and biological specifications of bioinks and the development of functional tissues in 3d bioprinting. **Bioprinting**, Elsevier B.V., v. 9, p. 19–36, 3 2018. ISSN 24058866.

ZHANG, Jianhua *et al.* 3d bioprinting of human tissues: Biofabrication, bioinks and bioreactors. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, v. 22, 4 2021. ISSN 14220067.

ZHANG, Shiqing; WANG, Haibin. Current progress in 3d bioprinting of tissue analogs. **SLAS Technology**, SAGE Publications Inc., v. 24, p. 70–78, 2 2019. ISSN 24726311.

ZHANG, Xiaoying; ZHANG, Yangde. Tissue engineering applications of three-dimensional bioprinting. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Humana Press Inc., v. 72, p. 777–782, 7 2015. ISSN 10859195.

ZHANG, Zhengyi *et al.* Effects of living cells on the bioink printability during laser printing. **Biomicrofluidics**, American Institute of Physics Inc., v. 11, 5 2017. ISSN 19321058.

ZHAO, Yu *et al.* The influence of printing parameters on cell survival rate and printability in microextrusion-based 3d cell printing technology. **Biofabrication**, Institute of Physics Publishing, v. 7, 11 2015. ISSN 17585090.

ZHOU, Xuan *et al.* 3d bioprinting a cell-laden bone matrix for breast cancer metastasis study. **ACS Applied Materials and Interfaces**, American Chemical Society, v. 8, p. 30017–30026, 11 2016. ISSN 19448252.

APÊNDICE A – G-code para Bioimpressão 3D

O G-code apresentado abaixo foi gerado no *software* PrusaSlicer para bioimpressão 3D de uma geometria cilíndrica com padrão retilíneo formado por duas camadas de CELLINK® Bioink contendo células C2C12.

```

; external perimeters extrusion width = 0.45mm
; perimeters extrusion width = 0.45mm
; infill extrusion width = 0.45mm
; solid infill extrusion width = 0.45mm
; top infill extrusion width = 0.45mm
; first layer extrusion width = 0.45mm

;TYPE:Custom
M900 k0
G90 ; absolute positioning
M104 S25 ; set extruder temp
M140 S25 ; set bed temp
G28 ; home all axes
G29 ; start the automatic bed sequence (calibration)
M190 S25 ; wait for bed temp
M109 S25 ; wait for extruder temp
G1 X1.0 Y12.0 F3000.0 ; go outside print area
G1 Z0.0 F200 ; set current position to Z = 0
G92 Z0.3 ; offset
G92 E0.0 ;
G1 X30.0 E0.1 F100 ; intro line
G92 E0.0 ;
G21 ; set units to millimeters
G90 ; use absolute coordinates
M82 ; use absolute distances for extrusion
G92 E0

; Filament gcode
M107

;LAYER_CHANGE
;Z:0.4

```

;HEIGHT:0.4

G1 E-.1 F2400

G92 E0

G1 Z1 F3600

G1 X40.124 Y47.396

G1 Z.4

G1 E.11 F2400

;TYPE:Internal infill

;WIDTH:0.45

G1 F300

G1 X42.147 Y49.419 E.11577

G1 X42.529 Y49.648 E.11667

G1 X43.029 Y49.881 E.11778

G1 X43.46 Y50.034 E.1187

G1 X43.996 Y50.167 E.11981

G1 X44.542 Y50.244 E.12092

G1 X44.802 Y50.255 E.12144

G1 X39.747 Y45.2 E.13586

G1 X39.736 Y44.999 E.13627

G1 X39.756 Y44.542 E.13719

G1 X39.833 Y43.996 E.1383

G1 X39.938 Y43.574 E.13918

G1 X46.426 Y50.062 E.15768

G1 X47.057 Y49.845 E.15903

G1 X47.532 Y49.615 E.16009

G1 X47.697 Y49.515 E.16048

G1 X40.487 Y42.305 E.18104

G1 X40.636 Y42.056 E.18163

G1 X40.923 Y41.67 E.1826

G1 X41.278 Y41.278 E.18367

G1 X48.722 Y48.722 E.2049

G1 X49.092 Y48.312 E.20601

G1 X49.363 Y47.944 E.20693

G1 X49.513 Y47.695 E.20752

G1 X42.304 Y40.486 E.22808

G1 X42.528 Y40.352 E.22861

G1 X43.029 Y40.119 E.22972

G1 X43.574 Y39.938 E.23088

G1 X50.062 Y46.426 E.24938

```
G1 X50.167 Y46.004 E.25026
G1 X50.244 Y45.458 E.25137
G1 X50.264 Y45.001 E.25229
G1 X50.254 Y44.8 E.2527
G1 X45.199 Y39.746 E.26712
G1 X45.55 Y39.765 E.26783
G1 X46.095 Y39.851 E.26894
G1 X46.538 Y39.966 E.26986
G1 X47.058 Y40.155 E.27098
G1 X47.47 Y40.352 E.2719
G1 X47.853 Y40.581 E.2728
G1 X49.874 Y42.602 E.27856
```

```
;LAYER_CHANGE
```

```
;Z:0.7
```

```
;HEIGHT:0.3
```

```
G1 E.17856 F2400
G92 E0
G1 Z1.4 F3600
G1 X42.624 Y40.104
G1 Z.7
G1 E.11 F2400
G1 F300
G1 X40.554 Y42.174 E.11469
G1 X40.386 Y42.443 E.1152
G1 X40.17 Y42.881 E.11598
G1 X39.984 Y43.37 E.11682
G1 X39.84 Y43.904 E.11771
G1 X39.761 Y44.385 E.11849
G1 X39.732 Y44.814 E.11918
G1 X44.811 Y39.735 E.13068
G1 X45.064 Y39.726 E.13109
G1 X45.551 Y39.754 E.13187
G1 X46.097 Y39.841 E.13276
G1 X46.434 Y39.93 E.13332
G1 X39.929 Y46.435 E.14805
G1 X40.109 Y46.975 E.14896
G1 X40.343 Y47.477 E.14985
G1 X40.477 Y47.705 E.15027
```

```
G1 X47.704 Y40.478 E.16664
G1 X47.949 Y40.627 E.1671
G1 X48.391 Y40.959 E.16799
G1 X48.727 Y41.273 E.16873
G1 X41.273 Y48.727 E.18561
G1 X41.61 Y49.041 E.18635
G1 X42.051 Y49.374 E.18724
G1 X42.295 Y49.523 E.1877
G1 X49.523 Y42.295 E.20407
G1 X49.657 Y42.523 E.20449
G1 X49.891 Y43.025 E.20538
G1 X50.071 Y43.565 E.20629
G1 X43.564 Y50.072 E.22103
G1 X43.903 Y50.159 E.22159
G1 X44.385 Y50.239 E.22237
G1 X44.908 Y50.274 E.22321
G1 X45.189 Y50.264 E.22366
G1 X50.267 Y45.186 E.23516
G1 X50.235 Y45.644 E.2359
G1 X50.16 Y46.097 E.23664
G1 X50.045 Y46.541 E.23737
G1 X49.855 Y47.062 E.23826
G1 X49.658 Y47.475 E.23899
G1 X49.45 Y47.821 E.23964
G1 X47.376 Y49.896 E.24434
G1 E.14434 F2400
G92 E0
G1 Z1.7 F3600
M107
;TYPE:Custom
; Filament-specific end gcode
;END gcode for filament
M104 S0 ; turn off extruder temperature
M140 S0 ; turn off bed temperature
G91 ; relative positioning
G1 X0 Y150 F3600 ; move to the back
G1 Z+5.0 F60 ; move Z up a bit and retract filament even more
G90 ; absolute positioning
M84 ; steppers motors off
```

```
; filament used [mm] = 0.42
; filament used [cm3] = 0.03
; filament used [g] = 0.03
; total filament used [g] = 0.03
; total filament cost = 0.00
; estimated printing time (normal mode) = 55s
; estimated printing time (silent mode) = 55s
; estimated first layer printing time (normal mode) = 35s
; estimated first layer printing time (silent mode) = 35s

; prusaslicer_config = begin
; autoemit_temperature_commands = 1
; avoid_crossing_curled_overhangs = 0
; avoid_crossing_perimeters = 0
; avoid_crossing_perimeters_max_detour = 0
; bed_custom_model =
; bed_custom_texture =
; bed_shape = 0x0,150x0,150x200,0x200
; bed_temperature = 25
; before_layer_gcode =
; between_objects_gcode =
; bottom_fill_pattern = monotonic
; bottom_solid_layers = 0
; bottom_solid_min_thickness = 0
; bridge_acceleration = 0
; bridge_angle = 0
; bridge_fan_speed = 100
; bridge_flow_ratio = 1
; bridge_speed = 5
; brim_separation = 0
; brim_type = outer_only
; brim_width = 0
; color_change_gcode = M600
; complete_objects = 0
; cooling = 0
; cooling_tube_length = 5
; cooling_tube_retraction = 91.5
; default_acceleration = 0
; default_filament_profile =
```

```
; default_print_profile =
; deretract_speed = 0
; disable_fan_first_layers = 3
; dont_support_bridges = 1
; draft_shield = disabled
; duplicate_distance = 6
; elephant_foot_compensation = 0
; enable_dynamic_fan_speeds = 0
; enable_dynamic_overhang_speeds = 0
; end_filament_gcode = "; Filament-specific end gcode \n;END
  gcode for filament\n"
; end_gcode = M104 S0 ; turn off extruder temperature\nM140 S0
  ; turn off bed temperature\nG91 ; relative positioning\nG1
  X0 Y150 F3600 ; move to the back\nG1 Z+5.0 F[travel_speed] ;
  move Z up a bit and retract filament even more\nG90 ;
  absolute positioning\nM84 ; steppers motors off\n
; external_perimeter_acceleration = 0
; external_perimeter_extrusion_width = 0.45
; external_perimeter_speed = 3
; external_perimeters_first = 0
; extra_loading_move = -2
; extra_perimeters = 1
; extra_perimeters_on_overhangs = 0
; extruder_clearance_height = 20
; extruder_clearance_radius = 20
; extruder_colour = ""
; extruder_offset = 0x0
; extrusion_axis = E
; extrusion_multiplier = 1
; extrusion_width = 0.45
; fan_always_on = 0
; fan_below_layer_time = 60
; filament_colour = #29B2B2
; filament_cooling_final_speed = 3.4
; filament_cooling_initial_speed = 2.2
; filament_cooling_moves = 4
; filament_cost = 0
; filament_density = 0.9722
; filament_diameter = 9.59
```

```
; filament_load_time = 0
; filament_loading_speed = 28
; filament_loading_speed_start = 3
; filament_max_volumetric_speed = 10
; filament_minimal_purge_on_wipe_tower = 15
; filament_notes = ""
; filament_ramming_parameters = "120 100 6.6 6.8 7.2 7.6 7.9
  8.2 8.7 9.4 9.9 10.0| 0.05 6.6 0.45 6.8 0.95 7.8 1.45 8.3
  1.95 9.7 2.45 10 2.95 7.6 3.45 7.6 3.95 7.6 4.45 7.6 4.95
  7.6"
; filament_settings_id = 3DBioTowerPro
; filament_soluble = 0
; filament_spool_weight = 0
; filament_toolchange_delay = 0
; filament_type = SCAFF
; filament_unload_time = 0
; filament_unloading_speed = 90
; filament_unloading_speed_start = 100
; filament_vendor = (Unknown)
; fill_angle = 45
; fill_density = 30%
; fill_pattern = rectilinear
; first_layer_acceleration = 0
; first_layer_acceleration_over_raft = 0
; first_layer_bed_temperature = 25
; first_layer_extrusion_width = 0.45
; first_layer_height = 0.4
; first_layer_speed = 100%
; first_layer_speed_over_raft = 30
; first_layer_temperature = 25
; full_fan_speed_layer = 0
; fuzzy_skin = none
; fuzzy_skin_point_dist = 0.8
; fuzzy_skin_thickness = 0.3
; gap_fill_enabled = 1
; gap_fill_speed = 5
; gcode_comments = 0
; gcode_flavor = marlin2
; gcode_label_objects = 0
```

```
; gcode_resolution = 0.0125
; gcode_substitutions =
; high_current_on_filament_swap = 0
; host_type = prusalink
; infill_acceleration = 0
; infill_anchor = 600%
; infill_anchor_max = 50
; infill_every_layers = 1
; infill_extruder = 1
; infill_extrusion_width = 0.45
; infill_first = 0
; infill_overlap = 0
; infill_speed = 5
; interface_shells = 0
; ironing = 0
; ironing_flowrate = 15%
; ironing_spacing = 0.1
; ironing_speed = 15
; ironing_type = top
; layer_gcode =
; layer_height = 0.3
; machine_limits_usage = time_estimate_only
; machine_max_acceleration_e = 10000,5000
; machine_max_acceleration_extruding = 1500,1250
; machine_max_acceleration_retracting = 1500,1250
; machine_max_acceleration_travel = 1500,1250
; machine_max_acceleration_x = 9000,1000
; machine_max_acceleration_y = 9000,1000
; machine_max_acceleration_z = 500,200
; machine_max_feedrate_e = 120,120
; machine_max_feedrate_x = 500,200
; machine_max_feedrate_y = 500,200
; machine_max_feedrate_z = 12,12
; machine_max_jerk_e = 2.5,2.5
; machine_max_jerk_x = 10,10
; machine_max_jerk_y = 10,10
; machine_max_jerk_z = 0.2,0.4
; machine_min_extruding_rate = 0,0
; machine_min_travel_rate = 0,0
```



```
; max_fan_speed = 100
; max_layer_height = 0.6
; max_print_height = 65
; max_print_speed = 30
; max_volumetric_extrusion_rate_slope_negative = 0
; max_volumetric_extrusion_rate_slope_positive = 0
; max_volumetric_speed = 10
; min_bead_width = 85%
; min_fan_speed = 35
; min_feature_size = 25%
; min_layer_height = 0.07
; min_print_speed = 10
; min_skirt_length = 0
; mmu_segmented_region_max_width = 0
; notes =
; nozzle_diameter = 0.41
; only_retract_when_crossing_perimeters = 0
; ooze_prevention = 0
; output_filename_format = [input_filename_base].gcode
; overhang_fan_speed_0 = 0
; overhang_fan_speed_1 = 0
; overhang_fan_speed_2 = 0
; overhang_fan_speed_3 = 0
; overhang_speed_0 = 15
; overhang_speed_1 = 15
; overhang_speed_2 = 20
; overhang_speed_3 = 25
; overhangs = 1
; parking_pos_retraction = 92
; pause_print_gcode = M601
; perimeter_acceleration = 0
; perimeter_extruder = 1
; perimeter_extrusion_width = 0.45
; perimeter_generator = arachne
; perimeter_speed = 3
; perimeters = 0
; physical_printer_settings_id =
; post_process =
; print_settings_id = 3DBioTowerPro
```

```
; printer_model =
; printer_notes =
; printer_settings_id = 3DBioTowerPro
; printer_technology = FFF
; printer_variant =
; printer_vendor =
; raft_contact_distance = 0.1
; raft_expansion = 1.5
; raft_first_layer_density = 90%
; raft_first_layer_expansion = 3
; raft_layers = 0
; remaining_times = 0
; resolution = 0
; retract_before_travel = 0
; retract_before_wipe = 0%
; retract_layer_change = 1
; retract_length = 0.1
; retract_length_toolchange = 10
; retract_lift = 1
; retract_lift_above = 0
; retract_lift_below = 0
; retract_restart_extra = 0.01
; retract_restart_extra_toolchange = 0
; retract_speed = 40
; seam_position = aligned
; silent_mode = 1
; single_extruder_multi_material = 0
; single_extruder_multi_material_priming = 1
; skirt_distance = 6
; skirt_height = 1
; skirts = 0
; slice_closing_radius = 0.049
; slicing_mode = close_holes
; slowdown_below_layer_time = 5
; small_perimeter_speed = 3
; solid_infill_acceleration = 0
; solid_infill_below_area = 70
; solid_infill_every_layers = 0
; solid_infill_extruder = 1
```

```
; solid_infill_extrusion_width = 0.45
; solid_infill_speed = 20
; spiral_vase = 0
; staggered_inner_seams = 0
; standby_temperature_delta = -5
; start_filament_gcode = "; Filament gcode\n"
; start_gcode = M900 k0\nG90 ; absolute positioning \nM104 S[
  first_layer_temperature] ; set extruder temp\nM140 S[
  first_layer_bed_temperature] ; set bed temp\nG28 ; home all
  axes\nG29 ; start the automatic bed sequence (calibration) \
  nM190 S[first_layer_bed_temperature] ; wait for bed temp\
  nM109 S[first_layer_temperature] ; wait for extruder temp\
  nG1 X1.0 Y12.0 F3000.0 ; go outside print area\nG1 Z0.0 F200
  ; set current position to Z = 0 \nG92 Z0.3 ; offset\nG92 E0
  .0 ; \nG1 X30.0 E0.1 F100 ; intro line\nG92 E0.0 ; \n
; support_material = 0
; support_material_angle = 0
; support_material_auto = 1
; support_material_bottom_contact_distance = 0
; support_material_bottom_interface_layers = -1
; support_material_buildplate_only = 0
; support_material_closing_radius = 2
; support_material_contact_distance = 0.2
; support_material_enforce_layers = 0
; support_material_extruder = 1
; support_material_extrusion_width = 0
; support_material_interface_contact_loops = 0
; support_material_interface_extruder = 1
; support_material_interface_layers = 3
; support_material_interface_pattern = rectilinear
; support_material_interface_spacing = 0
; support_material_interface_speed = 100%
; support_material_pattern = rectilinear
; support_material_spacing = 2.5
; support_material_speed = 5
; support_material_style = grid
; support_material_synchronize_layers = 0
; support_material_threshold = 0
; support_material_with_sheath = 1
```

```
; support_material_xy_spacing = 50%
; support_tree_angle = 40
; support_tree_angle_slow = 25
; support_tree_branch_diameter = 2
; support_tree_branch_diameter_angle = 5
; support_tree_branch_diameter_double_wall = 3
; support_tree_branch_distance = 1
; support_tree_tip_diameter = 0.8
; support_tree_top_rate = 15%
; temperature = 25
; template_custom_gcode =
; thick_bridges = 1
; thin_walls = 1
; threads = 8
; thumbnails =
; thumbnails_format = PNG
; toolchange_gcode =
; top_fill_pattern = monotonic
; top_infill_extrusion_width = 0
; top_solid_infill_acceleration = 0
; top_solid_infill_speed = 15
; top_solid_layers = 0
; top_solid_min_thickness = 0
; travel_acceleration = 0
; travel_speed = 60
; travel_speed_z = 0
; use_firmware_retraction = 0
; use_relative_e_distances = 0
; use_volumetric_e = 0
; variable_layer_height = 1
; wall_distribution_count = 1
; wall_transition_angle = 10
; wall_transition_filter_deviation = 25%
; wall_transition_length = 100%
; wipe = 0
; wipe_into_infill = 0
; wipe_into_objects = 0
; wipe_tower = 0
; wipe_tower_bridging = 10
```

```
; wipe_tower_brim_width = 2
; wipe_tower_cone_angle = 0
; wipe_tower_extra_spacing = 100%
; wipe_tower_extruder = 0
; wipe_tower_no_sparse_layers = 0
; wipe_tower_rotation_angle = 0
; wipe_tower_width = 60
; wipe_tower_x = 180
; wipe_tower_y = 140
; wiping_volumes_extruders = 70,70
; wiping_volumes_matrix = 0
; xy_size_compensation = 0
; z_offset = 0
; prusaslicer_config = end
```

APÊNDICE B – Dados de medição da densidade do Nivea Creme

Foram feitas 10 medições da massa da seringa vazia e preenchida com Nivea Creme até a marca de 10 ml, conforme apresentado na Tabela 11. O cálculo da incerteza de medição indireta associada a medida de densidade está apresentado na Tabela 12.

Tabela 11 – Dados das medições de massa para seringa vazia e com Nivea Creme.

Massa [g]	
Seringa vazia	Seringa cheia
6,42	16,15
6,47	16,10
6,41	16,31
6,49	16,11
6,46	16,13
6,44	16,26
6,47	16,30
6,47	16,27
6,45	15,95
6,44	16,16
Valor médio [g]	
6,45	16,17
Desvio-padrão [g]	
0,02	0,11

Tabela 12 – Cálculo da incerteza de medição associado a medida da densidade.

Densidade $\rho = \frac{m_t - m_s}{V_s}$						
Grandeza	Fonte de Erro	Estimativa de Erro	Distribuição Estatística	Graus de Liberdade	Incerteza Padrão	Coefficiente de Sensibilidade
Massa [g]	Resolução da balança	0,005	Uniforme	∞	0,003	0,100
	Repetitividade (seringa vazia) Tipo A	0,024	<i>t-Student</i>	9	0,007	-0,100
	Repetitividade (seringa cheia) Tipo A	0,107	<i>t-Student</i>	9	0,034	0,100
Volume [ml]	Resolução da seringa	0,100	Triangular	∞	0,041	-0,097
Incerteza Combinada [g/ml]				0,005		
Graus de Liberdade Efetivos				54		
Incerteza Expandida [g/ml]				0,011		
Incerteza Expandida [kg/m³]				10,60		

APÊNDICE C – Dados da medição da vazão mássica de Nivea Creme

Primeiro, foram feitas 5 medições da massa do prato da placa de Petri vazia, conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 – Dados das medições de massa da placa de Petri vazia.

Massa prato[g]
6,7723
6,7699
6,7718
6,7717
6,7721
Valor médio [g]
6,7716
Desvio-padrão [g]
0,0010

Tabela 14 – Resultados de vazão dos testes com diferentes configurações de extrusão. A massa medida inclui o Nivea Creme e o prato da placa de Petri.

Bocal	Setup: G1 E50 F25		Setup: G1 E50 F2.5		Setup: G1 E50 F0.25	
	Massa [g]	Tempo total [s]	Massa [g]	Tempo total [s]	Massa [g]	Tempo total [s]
16G	10,441	124	9,8443	1052	8,7201	6602
	9,9577	109	10,1291	1154	8,8576	7200
	9,9786	110	10,3086	1218	8,5298	6000
	10,0198	112	10,2565	1211	8,1156	4800
	10,3178	123	10,1597	1195	9,1155	8100
20G	9,9115	108	9,8373	1081	8,4996	6001
	9,5849	96	10,1556	1162	8,5027	6003
	9,9679	112	10,2917	1214	8,8021	7203
	9,9524	111	10,3361	1243	8,1432	4802
	10,3894	125	10,0894	1196	9,4031	9300
25G	9,9659	113	9,9234	1147	8,7951	7200
	9,8733	109	9,9905	1143	8,2713	5401
	9,8873	109	9,8663	1115	8,5809	6600
	9,8399	111	10,1001	1209	9,3576	9300
	10,0855	120	9,9972	1125	8,9897	7800
Média [g]	10,0115	113	10,0857	1164	8,7123	6821
Desvio-padrão [g]	0,2227	8	0,1707	55	0,3949	1404
Vazão mássica [kg/s]	$2,87 \times 10^{-5}$		$2,85 \times 10^{-6}$		$2,85 \times 10^{-7}$	
Incerteza expandida [kg/s]	$1,46 \times 10^{-6}$		$1,05 \times 10^{-7}$		$4,34 \times 10^{-8}$	

Com as medidas de massa e tempo após cada procedimento de extrusão, a vazão mássica foi obtida para cada configuração de extrusão. Os dados das medições estão apresentados na Tabela 14.

O cálculo da incerteza de medição da vazão mássica da configuração G1 E50 F25 está apresentado na Tabela 15. As incertezas para as outras configurações foram calculadas para as mesmas fontes de erro.

Tabela 15 – Cálculo da incerteza de medição associada à medida da Vazão mássica para a configuração de extrusão G1 E50 F25.

Grandeza	Fonte de Erro	Estimativa de Erro	Distribuição Estatística	Graus de Liberdade	Incerteza Padrão	Coefficiente de Sensibilidade
Massa [g]	Resolução da balança	0,00005	Uniforme	∞	0,00003	0,00887
	Repetitividade (prato) Tipo A	0,00096	<i>t-Student</i>	4	0,00043	-0,00887
	Repetitividade (total) Tipo A	0,22265	<i>t-Student</i>	14	0,05749	0,00887
Tempo [s]	Resolução do cronômetro	0,00500	Uniforme	∞	0,00289	0,00025
	Tempo de reação	0,50000	Uniforme	∞	0,28868	0,00025
	Repetitividade Tipo A	7,53279	<i>t-Student</i>	14	1,94496	0,00025
Incerteza Combinada [kg/s]			0,00071			
Graus de Liberdade Efetivos			29			
Incerteza Expandida - [g/s]			0,00146			
Incerteza Expandida - [kg/s]			$1,46 \times 10^{-6}$			

APÊNDICE D – Dados da medição de pressão de Nivea Creme

O manômetro digital diferencial foi calibrado utilizando como referência as medições da diferença da altura da coluna de mercúrio de um tubo em U. Os dados estão obtidos estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados das medições de pressão do manômetro diferencial digital e do tubo em U preenchido com mercúrio.

Manômetro [mmHg]	Tubo em U com Mercúrio [mm]							
	1	2	3	4	5	Média	Desvio-padrão	Incerteza
31	33	31	32	30	33	31,8	1,3	1,7
49	48	49	48	51	51	49,4	1,5	2,0
69	69	68	70	69	69	69,0	0,7	0,9
91	91	92	93	93	93	92,4	0,9	1,1
130	133	133	134	133	132	133,0	0,7	0,9
168	171	173	170	171	172	171,4	1,1	1,5
211	212	213	214	212	213	212,8	0,8	1,0
231	234	235	236	236	234	235,0	1,0	1,3
260	264	263	264	263	265	263,8	0,8	1,0
327	328	327	326	327	324	326,4	1,5	2,0

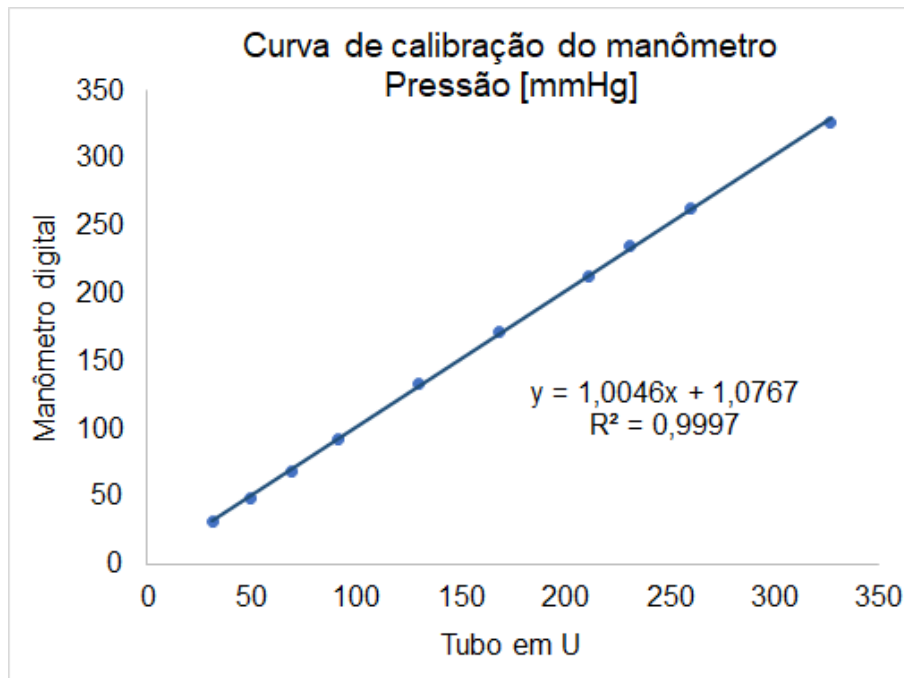
A incerteza de calibração do manômetro foi calculada considerando a resolução da régua e a repetitividade da medição, como apresentado na Tabela 17.

Tabela 17 – Incerteza de calibração (Pressão manômetro digital = 327 mmHg).

Grandeza	Fonte de Erro	Estimativa de Erro	Distribuição Estatística	Graus de Liberdade	Incerteza Padrão	Coefficiente de Sensibilidade
Pressão [mmHg]	Resolução da régua	0,25	Triangular	∞	0,10	1
	Repetitividade Tipo A	1,52	<i>t-Student</i>	4	0,68	1
Incerteza Combinada [mmHg]				0,69		
Graus de Liberdade Efetivo				4		
Incerteza Expandida [mmHg]				2,0		
Incerteza Expandida [mBar]				2,6		

Os resultados de pressão foram ajustados conforme a curva de calibração obtida para o manômetro digital, apresentada na Figura 80.

Figura 80 – Curva de calibração do manômetro.



A compatibilidade entre os valores de pressão apresentados em diferentes unidades pelo instrumento foi verificada e mostrou-se adequada, permitindo a simples conversão de unidades da função da curva de calibração (mmHg para mBar). Portanto, a Equação 37 foi obtida como função de ajuste para as medidas de pressão, obtidas em mBar, para validação do modelo numérico utilizando Nivea Creme.

$$P_{\text{ajustada}} = 1,0046 \cdot P_{\text{medida}} + 1,4355 \quad (37)$$

Os valores de pressões obtidos em mBar, unidade de referência do manômetro, para cada uma das condições analisadas estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Pressão Diferencial para diferentes configurações de vazão e bocal.

Bocal	Pressão Diferencial [mBar]		
	G1 E50 F25	G1 E50 F2.5	G1 E50 F0.25
16G	204	183	153
	200	195	137
	193	198	138
	204	184	149
	209	189	144
	Média [mBar]		
	202	190	144
	Desvio-padrão [mBar]		
	6	7	7
	Incerteza Expandida [mBar]		
9	9	9	
20G	498	309	256
	528	304	237
	527	330	232
	517	310	243
	537	316	240
	Média [mBar]		
	521	314	241
	Desvio-padrão [mBar]		
	15	10	9
	Incerteza Expandida [mBar]		
18	13	11	
25G	1095	715	469
	1158	737	485
	1177	703	466
	1130	712	460
	1210	657	442
	Média [mBar]		
	1154	705	464
	Desvio-padrão [mBar]		
	44	29	15
	Incerteza Expandida [mBar]		
55	37	18	

O cálculo da incerteza de medição da pressão utilizando o bocal 16G e a configuração G1 E50 F25 está apresentado na Tabela 19. As demais incertezas de medição foram calculadas para as mesmas fontes de erro.

Tabela 19 – Incerteza de Medição para Pressão 16G (G1 E50 F25).

Grandeza	Fonte de Erro	Estimativa de Erro	Distribuição Estatística	Graus de Liberdade	Incerteza Padrão	Coefficiente de Sensibilidade
Pressão [mmHg]	Resolução do manômetro	0,5	Uniforme	∞	0,3	1
	Repetitividade Tipo A	6,0	<i>t-Student</i>	4	2,7	1
	Calibração	-	Normal	4	2,6	1
Incerteza Combinada					3,7	
Grau de Liberdade Efetivo					8	
Incerteza Expandida - [mBar]					8,6	
Incerteza Expandida - [kPa]					0,86	

Os resultados da pressão diferencial convertidos para kPa, unidade padrão SI, e acompanhados da incerteza expandida, estimada para ter um nível da confiança de 95%, estão apresentadas na Tabela 20 para cada configuração de extrusão e bocal.

Tabela 20 – Relação entre Vazão Mássica e Pressão (ΔP).

Bocal	Vazão Mássica [kg/s]	Pressão (ΔP) [kPa]
16G	$2,87 \times 10^{-5}$	$20,24 \pm 0,86$
	$2,85 \times 10^{-6}$	$18,78 \pm 0,91$
	$2,85 \times 10^{-7}$	$14,22 \pm 0,94$
20G	$2,87 \times 10^{-5}$	$52,12 \pm 1,81$
	$2,85 \times 10^{-6}$	$31,08 \pm 1,27$
	$2,85 \times 10^{-7}$	$23,88 \pm 1,12$
25G	$2,87 \times 10^{-5}$	$114,72 \pm 5,49$
	$2,85 \times 10^{-6}$	$70,00 \pm 3,70$
	$2,85 \times 10^{-7}$	$46,06 \pm 1,84$

APÊNDICE E – Incerteza numérica conforme norma ASME V&V 20

A incerteza numérica foi calculada, conforme sugerido pela norma ASME V&V 20, para as malhas 1, 2 e 3, apresentadas no item 3.7.5.2 da Metodologia. A ordem de convergência (p) foi assumida igual a 1,0 quando o cálculo resultou em valor inferior, após verificar o regime de convergência graficamente utilizando 4 malhas.

O cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 28,7 mg/s foi apresentado em Resultados, na Tabela 6. Para as demais vazões, o cálculo da incerteza está apresentado nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 2,85 mg/s para as malhas 3 (26.304 elementos), 2 (104.832 elementos) e 1 (418.944 elementos), detalhadas na metodologia.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ϵ	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
LP	3	$4,58 \times 10^4$		3,56						
	2	$4,61 \times 10^4$	$-2,85 \times 10^2$		$4,61 \times 10^4$	$2,85 \times 10^2$	0,06%	$3,33 \times 10^1$	0,07%	$1,67 \times 10^1$
	1	$4,94 \times 10^4$	$-3,34 \times 10^3$		$4,97 \times 10^4$	$3,34 \times 10^3$	0,63%	$3,90 \times 10^2$	0,79%	$1,95 \times 10^2$
HB	3	$5,15 \times 10^4$		1,00						
	2	$5,34 \times 10^4$	$-1,91 \times 10^3$		$5,53 \times 10^4$	$1,91 \times 10^3$	3,46%	$2,39 \times 10^3$	4,47%	$1,20 \times 10^3$
	1	$5,12 \times 10^4$	$2,18 \times 10^3$		$4,91 \times 10^4$	$2,18 \times 10^3$	4,45%	$2,74 \times 10^3$	5,34%	$1,37 \times 10^3$

Nota: Modelo LP significa Lei de Potência e HB significa Herschel Bulkley. Resultados para pressão no ponto 3 (Δp), $\epsilon_{21} = \phi_2 - \phi_1$, ordem de convergência (p), valores extrapolados (ϕ_{ext}), erro relativo aproximado (e_a), erro relativo extrapolado (e_{ext}), índice de convergência da malha (*Grid Convergence Index* - GCI) e incerteza numérica expandida com 95% de confiança (u_{num}).

Tabela 22 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 16G e vazão igual a 0,285 mg/s.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ϵ	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
LP	3	$2,97 \times 10^4$		1,47						
	2	$3,03 \times 10^4$	$-6,48 \times 10^2$		$3,07 \times 10^4$	$6,48 \times 10^2$	1,20%	$4,60 \times 10^2$	1,52%	$2,30 \times 10^2$
	1	$3,21 \times 10^4$	$-1,79 \times 10^3$		$3,31 \times 10^4$	$1,79 \times 10^3$	3,07%	$1,27 \times 10^3$	3,96%	$6,35 \times 10^2$
HB	3	$4,03 \times 10^4$		1,00						
	2	$3,93 \times 10^4$	$1,02 \times 10^3$		$3,83 \times 10^4$	$1,02 \times 10^3$	2,67%	$1,28 \times 10^3$	3,25%	$6,39 \times 10^2$
	1	$3,83 \times 10^4$	$9,69 \times 10^2$		$3,74 \times 10^4$	$9,69 \times 10^2$	2,60%	$1,22 \times 10^3$	3,17%	$6,08 \times 10^2$

O cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 20G está apresentado nas Tabelas 23, 24 e 25.

Tabela 23 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 20G e vazão igual a 28,7 mg/s.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ϵ	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
[LP]	3	$8,54 \times 10^4$		1,00						
	2	$8,72 \times 10^4$	$-1,78 \times 10^3$		$8,90 \times 10^4$	$1,78 \times 10^3$	2,01%	$2,23 \times 10^3$	2,56%	$1,12 \times 10^3$
	1	$8,91 \times 10^4$	$-1,89 \times 10^3$		$9,10 \times 10^4$	$1,89 \times 10^3$	2,09%	$2,37 \times 10^3$	2,66%	$1,19 \times 10^3$
[HB]	3	$8,53 \times 10^4$		1,00						
	2	$8,77 \times 10^4$	$-2,34 \times 10^3$		$9,00 \times 10^4$	$2,34 \times 10^3$	2,61%	$2,93 \times 10^3$	3,35%	$1,47 \times 10^3$
	1	$8,58 \times 10^4$	$1,86 \times 10^3$		$8,39 \times 10^4$	$1,86 \times 10^3$	2,23%	$2,34 \times 10^3$	2,72%	$1,17 \times 10^3$

Tabela 24 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 20G e vazão igual a 2,85 mg/s.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ϵ	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
LP	3	$5,99 \times 10^4$		1,57						
	2	$6,09 \times 10^4$	$-9,12 \times 10^2$		$6,13 \times 10^4$	$9,12 \times 10^2$	0,76%	$5,80 \times 10^2$	0,95%	$2,90 \times 10^2$
	1	$6,36 \times 10^4$	$-2,71 \times 10^3$		$6,49 \times 10^4$	$2,71 \times 10^3$	2,12%	$1,72 \times 10^3$	2,71%	$8,60 \times 10^2$
HB	3	$6,54 \times 10^4$		1,63						
	2	$6,73 \times 10^4$	$-1,93 \times 10^3$		$6,82 \times 10^4$	$1,93 \times 10^3$	1,35%	$1,16 \times 10^3$	1,72%	$5,78 \times 10^2$
	1	$7,33 \times 10^4$	$-5,99 \times 10^3$		$7,61 \times 10^4$	$5,99 \times 10^3$	3,74%	$3,57 \times 10^3$	4,87%	$1,79 \times 10^3$

Tabela 25 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 20G e vazão igual a 0,285 mg/s.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ϵ	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
LP	3	$4,09 \times 10^4$		1,81						
	2	$4,12 \times 10^4$	$-3,37 \times 10^2$		$4,14 \times 10^4$	$3,37 \times 10^2$	0,33%	$1,70 \times 10^2$	0,41%	$8,48 \times 10^1$
	1	$4,24 \times 10^4$	$-1,17 \times 10^3$		$4,29 \times 10^4$	$1,17 \times 10^3$	1,10%	$5,91 \times 10^2$	1,39%	$2,95 \times 10^2$
HB	3	$5,07 \times 10^4$		1,02						
	2	$5,14 \times 10^4$	$-6,80 \times 10^2$		$5,20 \times 10^4$	$6,80 \times 10^2$	1,27%	$8,24 \times 10^2$	1,60%	$4,12 \times 10^2$
	1	$5,00 \times 10^4$	$1,38 \times 10^3$		$4,86 \times 10^4$	$1,38 \times 10^3$	2,75%	$1,67 \times 10^3$	3,35%	$8,37 \times 10^2$

O cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 25G e vazão igual a 0,285 mg/s foi apresentado em Resultados, na Tabela 7. Para as demais vazões, o cálculo da incerteza está apresentado nas Tabelas 26 e 27.

Tabela 26 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 25G e vazão igual a 28,7 mg/s.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ϵ	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
LP	3	$1,22 \times 10^5$		1,31						
	2	$1,23 \times 10^5$	$-8,99 \times 10^2$		$1,23 \times 10^5$	$8,99 \times 10^2$	0,50%	$7,64 \times 10^2$	0,62%	$3,82 \times 10^2$
	1	$1,25 \times 10^5$	$-2,22 \times 10^3$		$1,26 \times 10^5$	$2,22 \times 10^3$	1,20%	$1,89 \times 10^3$	1,51%	$9,44 \times 10^2$
HB	3	$1,22 \times 10^5$		1,76						
	2	$1,22 \times 10^5$	$3,69 \times 10^2$		$1,22 \times 10^5$	$3,69 \times 10^2$	0,13%	$1,93 \times 10^2$	0,16%	$9,66 \times 10^1$
	1	$1,23 \times 10^5$	$-1,25 \times 10^3$		$1,24 \times 10^5$	$1,25 \times 10^3$	0,42%	$6,54 \times 10^2$	0,53%	$3,27 \times 10^2$

Tabela 27 – Cálculo da incerteza numérica do resultado da variação da pressão (Δp) para a geometria com bocal 25G e vazão igual a 2,85 mg/s.

Modelo	Malha	Δp [Pa]	ϵ	p	ϕ_{ext}	e_a	e_{ext}	GCI [Pa]	GCI [%]	u_{num} [Pa]
LP	3	$8,55 \times 10^4$		1,46						
	2	$8,66 \times 10^4$	$-1,16 \times 10^3$		$8,73 \times 10^4$	$1,16 \times 10^3$	0,76%	$8,27 \times 10^2$	0,95%	$4,13 \times 10^2$
	1	$8,98 \times 10^4$	$-3,18 \times 10^3$		$9,16 \times 10^4$	$3,18 \times 10^3$	1,98%	$2,27 \times 10^3$	2,53%	$1,14 \times 10^3$
HB	3	$8,96 \times 10^4$		1,18						
	2	$9,22 \times 10^4$	$-2,68 \times 10^3$		$9,44 \times 10^4$	$2,68 \times 10^3$	2,25%	$2,65 \times 10^3$	2,88%	$1,33 \times 10^3$
	1	$9,83 \times 10^4$	$-6,08 \times 10^3$		$1,03 \times 10^5$	$6,08 \times 10^3$	4,65%	$6,01 \times 10^3$	6,11%	$3,00 \times 10^3$

Apesar dos resultados excepcionais encontrados utilizando o bocal 16G e vazão de 28,5 mg/s, a malha 2 tem resultados próximos à curva de convergência e incerteza de medição semelhante à malha 1. Então, a malha 2 foi escolhida para calcular o erro e comparar com os resultados experimentais, por não ter tomado tanto tempo computacional, exigindo menos iterações para alcançar a solução.

Tabela 28 – Erro de comparação dos resultados numéricos em relação aos resultados experimentais para diferentes bocais e vazões.

Bocal	Vazão Mássica [kg/s]	$\Delta P_{\text{experimental}}$ [kPa]	Lei de Potência		Herschel Bulkley	
			ΔP [kPa]	Erro de comparação (E)	ΔP [kPa]	Erro de comparação (E)
16G	$2,87 \times 10^{-5}$	$20,2 \pm 0,9$	$64,7 \pm 2,1$	$44,5 \pm 2,2$	$67,1 \pm 1,3$	$46,9 \pm 1,6$
	$2,85 \times 10^{-6}$	$19,0 \pm 1,0$	$46,1 \pm 0,0$	$27,0 \pm 0,9$	$53,4 \pm 1,2$	$34,4 \pm 1,5$
	$2,85 \times 10^{-7}$	$14,4 \pm 0,9$	$30,3 \pm 0,2$	$15,9 \pm 1,0$	$39,3 \pm 0,6$	$24,9 \pm 1,1$
20G	$2,87 \times 10^{-5}$	$52,1 \pm 1,8$	$87,2 \pm 1,1$	$35,1 \pm 2,1$	$87,7 \pm 1,5$	$35,6 \pm 2,3$
	$2,85 \times 10^{-6}$	$31,4 \pm 1,3$	$60,9 \pm 0,3$	$29,5 \pm 1,3$	$67,3 \pm 0,6$	$36,0 \pm 1,4$
	$2,85 \times 10^{-7}$	$24,1 \pm 1,1$	$41,2 \pm 0,1$	$17,1 \pm 1,1$	$51,7 \pm 0,4$	$27,2 \pm 1,2$
25G	$2,87 \times 10^{-5}$	$115,4 \pm 5,5$	$122,6 \pm 0,4$	$7,2 \pm 5,5$	$121,8 \pm 0,1$	$6,4 \pm 5,5$
	$2,85 \times 10^{-6}$	$70,47 \pm 3,70$	$86,64 \pm 0,41$	$16,17 \pm 3,72$	$92,24 \pm 1,33$	$21,78 \pm 3,93$
	$2,85 \times 10^{-7}$	$46,42 \pm 1,84$	$59,40 \pm 0,19$	$12,98 \pm 1,85$	$68,79 \pm 0,57$	$22,37 \pm 1,93$

O erro de comparação da validação (E) e a incerteza padrão da validação foram então calculados conforme proposto no item 3.7.5.4. Os resultados estão organizados na Tabela 28.